

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA FONTE PROTÉICA DURANTE O CULTIVO  
NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**LIGIANE DE OLIVEIRA LEME**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA / DF  
AGOSTO / 2008**

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

**EFEITO DA FONTE PROTÉICA DURANTE O CULTIVO  
NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**LIGIANE DE OLIVEIRA LEME**

**ORIENTADOR: Dr. Rodolfo Rumpf**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Margot Alves Nunes Dode**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 309/2008**

**BRASÍLIA/DF  
AGOSTO / 2008**

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

**EFEITO DA FONTE PROTÉICA DURANTE O CULTIVO  
NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**LIGIANE DE OLIVEIRA LEME**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

---

***Margot Alves Nunes Dode, PhD – CO-ORIENTADORA***

EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia

CPF: 395.928.980-49

E-mail: [margot@cenargen.embrapa.br](mailto:margot@cenargen.embrapa.br)

**APROVADA POR:**

---

***Rodolfo Rumpf, PhD – ORIENTADOR***

EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia

CPF: 295.718.049 - 91

E-mail: [rodolfo@cenargen.embrapa.br](mailto:rodolfo@cenargen.embrapa.br)

---

***Jairo Pereira Neves, PhD – Examinador Interno***

Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

CPF: 065.863.509-30

E-mail: [jpneves@unb.br](mailto:jpneves@unb.br)

---

***Hélio Blume, Dr – Examinador Externo***

UPIS (União Pioneira de Integração Social) – Faculdades Integradas

CPF: 190.272.300-72

E-mail: [helio01682@upis.br](mailto:helio01682@upis.br)

**BRASÍLIA/DF, 18 de Agosto de 2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### **LEME, Ligiane de Oliveira**

Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. / Ligiane de Oliveira Leme; orientação de Rodolfo Rumpf – Brasília, 2008.

82p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. Embrião, 2. Bovino, 3. SFB, 4. BSA, 5. Criotolerância, 6. Qualidade embrionária. I. Rumpf, R. II. PhD.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

LEME, LO. **Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, xxp. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Ligiane de Oliveira Leme

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Efeito da fonte protéica durante o cultivo na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

GRAU: Mestre

ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília, permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. Ao autor, reservam-se outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

**Ligiane de Oliveira Leme**

CPF: 277.682.678-85

E-mail: [lemeligiane@gmail.com](mailto:lemeligiane@gmail.com)

Brasília / DF – Brasil

*“Chamamos de complexo aquilo que não  
compreendemos, mas isso significa que não  
encontramos um bom meio de pensar no assunto.”*

*(Tsutomu Shimomura)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades surgidas nos momentos necessários e oportunos, pela vontade de aprender e por ser refúgio nas incertezas.

Aos meus pais, Graça e Ricardo, por terem “ensinado a criança em que Caminho seguir”... E aos meus irmãos, Marliene e Gerson, pelo exemplo de autoconfiança e determinação. Aos meus queridos tios “*paidrinhos*”, Lutero e Álvaro, pelo apoio incondicional, e a toda *família* pelo carinho e amor que sempre tiveram por mim.

Ao Dr Rodolfo Rumpf, pela oportunidade de ingressar nesta equipe e ambiente que tanto me ensinou.

À Dra Margot Dode, querida e amiga, que sempre esteve disposta a ensinar, orientar e auxiliar nos momentos de decisões da rotina que aprendi a amar.

Ao Amigo e Professor Afrânio Márcio Vieira, do departamento de Estatística da UnB, por me auxiliar com os inúmeros dados gerados nestes experimentos, dando um “significado” a todos eles...

Aos amigos-irmãos e “*PIVetes*”, Katlen, Ester, Grazieli e Zé (José Neto), pelos momentos intensos, pelas grandes risadas, pelos escapes e desabafos na hora do estresse...

Aos amigos e colegas da Embrapa que estiveram presentes neste período e colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desta etapa da minha vida. Alguns de forma mais intensa, outros apenas nas palavras de apoio e torcida para que tudo acontecesse da melhor forma... Vocês: Dr. Maurício, Dr. Roberto e Dr. Ivo (Grandes exemplos!!), Dr. Eduardo, Rosângela (carinho imenso!!), Georgia, Urias, Regivaldo, Valquíria (FUNDAMENTAL!!), Renata, Rafael, Alexandre, Ana Cláudia, Tatiana, Emivaldo, Michelle, Tatiane, Edylaine, Clarice, Monique, Marcelo, Jeferson, Marcela, Stéfan, Lilian, Aline, Marquinhos, Antônio, Fred, Teco, Walliston, Vandrê, Aninha, Karine, Andréa – foram muito importantes, não tenham dúvida!

Aos estimados, Arnes, Gerson e Doris pelo sufrágio em qualquer instante e outros tantos valiosos (S2 e amigos) que conheci e ganhei em Brasília. Vocês já são *essenciais* na minha vida!

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte para que esse experimento pudesse ser realizado e apoio financeiro durante o curso.

À Universidade de Brasília e todos os seus professores e funcionários.

*“Com seu exemplo de vida e conduta, você prega um  
melhor sermão do que com suas palavras.”  
(Oliver Goldsmith)*

**A todos, MUITO OBRIGADA!! ☺**

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

### Unidades de Medida

$\mu\text{L}$  = microlitros

$\mu\text{m}$  = micrometros

G = Giros

kDa = kilo Dalton

mL = mililitros

mm = milímetros

qsp = quantidade suficiente para

UI = Unidades Internacionais

### Relativos a Meios e Reagentes para cultivo celular

BSA = Bovine Serum Albumine, do inglês (Albumina Sérica Bovina)

BSA-faf = Albumina Sérica Bovina – Fat Acid Free

BSA-v = Albumina Sérica Bovina – Fração V

$\beta$ -ME =  $\beta$ -mercaptoetanol

CR-1 ou -2 = Charles Rosenkrans -1 ou -2

FPM = Fator Promotor de Maturação

FSH = Folicle Stimulating Hormone, do inglês (Hormônio Folículo Estimulante)

GnRH = Gonadotrophines Release Hormone, do inglês (Hormônio liberador de gonadotrofinas)

KSOM = Potassium Simplex Optimization Medium

KSR = Knockout Serum Replacer

LH = Hormônio Luteinizante

PBS = Phosphate-buffered Saline (solução modificada)

PVA = Álcool Polivinílico

PVP = Polivinipirrolidona

RT = Transcriptase Reversa

SFB = Soro Fetal Bovino

SOF = Synthetic Oviduct Fluid, do inglês (Fluído Sintético do Oviduto)

SSS = Substituto Sérico Sintético

SVE = Soro de Vaca em Estro

### Relativos à Expressão Genética

ACAT-2 = Acetyl-Coenzyme A Acetyl-Transferase 2

Bax = B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X

BCL-2 = B-cell Lymphoma Protein 2

cDNA = Ácido Desoxirribonucléico complementar

CGA-II = Chromaffin granule ATPase II

CIRP-b = Cold Inducible RNA-binding Protein B

CSPs = Cold Shock Proteins

Cu/Zn-SOD = Cobre/Zinco Superóxido Desmutase

Cx-43 = Conexina 43

GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HSP-70 = Heat Shock Protein 70

HSPs = Heat Shock Proteins

MnSOD = Magnésio Superóxido Desmutase

RNAm = Ácido Ribonucléico mensageiro

RT-PCR = Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa

### Outros

A-I = Anáfase I

BE = Blastocisto Eclodido

BL = Blastocisto

BX = Blastocisto Expandido

CCOs = Complexos *cumulus*-ovócitos

CIV = Cultivo *in vitro*

CO<sub>2</sub> = Dióxido de Carbono

CV = Coeficiente de Variação

FIV = Fecundação *in vitro*

HDLs = Lipoproteínas de alta densidade

IA = Inseminação Artificial  
LCAT = Lecitina Colesterol Acyl-Transferase  
M-I = Metáfase I  
M-II = Metáfase II  
MIV = Maturação *in vitro*  
MLG = Modelo Linear Generalizado  
MZT = Transição materno-zigótica  
N<sub>2</sub>L = Nitrogênio Líquido  
O<sub>2</sub> = Oxigênio  
OPS = Open Pulled Straw  
*pi* = pós inseminação  
PIV = Produção *in vitro*  
RA = Reação Acrossômica  
ROS = Espécies Oxigênio Reativas  
SOV = Superovulação  
TE = Transferência de Embriões  
T-I = Telófase I  
VLDLs = Lipoproteínas de muito baixa densidade  
*vs.* = *versus*  
ZP = Zona Pelúcida

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Suplementação protéica aplicada na PIV de embriões nos tratamentos do experimento realizado.....	39
<b>Tabela 2:</b> Seqüência e condições de reação dos <i>primers</i> utilizados.....	44
<b>Tabela 3:</b> Avaliação do efeito do tratamento na produção de blastocistos, baseado na clivagem (D2 - 48h <i>pi</i> ) e na taxa de blastocisto em D6,5 (156h <i>pi</i> ), D7,5 (180h <i>pi</i> ), D8,5 (204h <i>pi</i> ).....	49
<b>Tabela 4:</b> Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V) às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	52
<b>Tabela 5:</b> Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões BL e BX, dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	54
<b>Tabela 6:</b> Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões em D6,5 e D7,5, dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	55
<b>Tabela 7:</b> Taxas de <u>re-expansão em 24 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	56
<b>Tabela 8:</b> Taxas de <u>re-expansão em 48 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	56
<b>Tabela 9:</b> Taxas de <u>re-expansão em 72 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	57
<b>Tabela 10:</b> Taxas de <u>eclosão em 24 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	57
<b>Tabela 11:</b> Taxas de <u>eclosão em 48 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	57
<b>Tabela 12:</b> Taxas de <u>eclosão em 72 horas</u> de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos <i>Controle</i> (C) e <i>Vitrificado</i> (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).....	58

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema das gotas na placa de CIV.....	<b>39</b>
<b>Figura 2:</b> Esquema da seqüência dos banhos dados nos embriões no processo de vitrificação pelo método OPS.....	<b>40</b>
<b>Figura 3:</b> Comportamento geral dos embriões PIV, nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3), quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação.....	<b>50</b>
<b>Figura 4:</b> Comportamento geral dos embriões dos <i>grupos Controle (C) e Vitrificado (V)</i> , quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação.....	<b>51</b>
<b>Figura 5:</b> Comportamento geral dos estágios dos embriões submetidos ao processo de criopreservação. Avaliação quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação.....	<b>53</b>
<b>Figura 6:</b> Comportamento geral dos embriões submetidos à criopreservação em dias diferentes (D6,5 – 156h <i>pi</i> e D7,5 – 180h <i>pi</i> ), quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação.....	<b>54</b>
<b>Figura 7:</b> Quantidade relativa de RNAm dos genes <i>Magnésio Superóxido Desmutase (MnSOD)</i> , <i>Chromaffin Granule ATPase II (ATP8A1)</i> e <i>Cold Inducible RNA-binding Protein B (CIRP-b)</i> em embriões eclodidos em D8, cultivados nos diferentes tratamentos.....	<b>58</b>
<b>Figura 8:</b> Quantidade relativa de RNAm do gene <i>B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X (Bax)</i> e <i>Heat Shock Protein – 70 (HSP-70)</i> em embriões eclodidos em D8, cultivados nos diferentes tratamentos.....	<b>59</b>
<b>Figura 9:</b> Quantidade relativa de RNAm do gene <i>Acetyl-Coenzyme A Acetyl-Transferase 2 (ACAT-2)</i> em embriões eclodidos em D8, cultivados nos diferentes tratamentos.....	<b>59</b>
<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose, representando os amplicons para os genes propostos no estudo.....	<b>60</b>

# SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv

## EFEITO DA FONTE PROTÉICA DURANTE O CULTIVO NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 – PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	3
2.1.1 – Colheita e Seleção dos ovócitos.....	3
2.1.2 – Maturação <i>in vitro</i> .....	4
2.1.3 – Fecundação <i>in vitro</i> .....	7
2.1.4 – Cultivo <i>in vitro</i> .....	10
2.2 – SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA PARA MIV E CIV.....	14
2.2.1 – Uso de SFB e/ou BSA no desenvolvimento embrionário.....	16
2.3 – CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO EMBRIÃO PIV BOVINO..	18
2.3.1 – <i>Criotolerância do embrião PIV</i> .....	19
2.3.2 – Expressão de genes do embrião PIV.....	22
• Genes ligados à <i>Apoptose Celular</i> – <i>Bax</i> e <i>BCL-2</i> .....	24
• Gene ligado ao <i>Estresse Oxidativo</i> – <i>MnSOD</i> .....	26
• Genes ligados ao <i>Estresse de Temperatura</i> – <i>HSP-70</i> e <i>CIRP-b</i> .....	27
• Gene ligado ao <i>Metabolismo de Lipídeos</i> – <i>ACAT-2</i> .....	30
• Gene ligado ao <i>Transporte de Fosfolipídeos</i> – <i>ATP8A1</i> .....	31
3. OBJETIVO GERAL.....	35
3.1 – Objetivos Específicos.....	35
4. HIPÓTESE.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 – Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	36
5.1.1 – Recuperação dos ovócitos.....	36
5.1.2 – Maturação <i>in vitro</i> de ovócitos (MIV).....	37
5.1.3 – Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	38
5.1.4 – Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV).....	38
5.2 – Criopreservação dos embriões.....	40
5.3 – Cultivo pós-criopreservação.....	41

5.4 – Avaliação da expressão gênica.....	42
6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL da PIV.....	45
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
8. RESULTADOS.....	49
9. DISCUSSÃO.....	61
10. CONCLUSÃO.....	75
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

# EFEITO DA FONTE PROTÉICA DURANTE O CULTIVO NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.

## RESUMO

O sucesso da PIV está relacionado ao conhecimento das necessidades dos gametas e embriões em diferentes fases do desenvolvimento. É conhecido que embriões PIV são diferentes dos embriões *in vivo* em vários aspectos. As diferenças entre os dois modelos têm sido pesquisadas na tentativa de tornar os meios artificiais o mais próximo possível ao ambiente natural do embrião. Para tanto, a viabilidade desses embriões (*in vivo* ou *in vitro*, oriundos de distintos sistemas de produção) pode ser mensurada por ferramentas diversas, tais como a criotolerância, a análise do metabolismo, os níveis e a expressão de genes. A suplementação protéica dos meios de cultivo tem sido amplamente discutida, na busca pela utilização de meios definidos, onde há o conhecimento da sua composição, possibilitando a eliminação ou acréscimo de produtos benéficos ao embrião, sem que ocorra influência de fatores inerentes desconhecidos do meio – características normalmente atribuídas aos componentes séricos, os quais são mais comumente utilizados, em especial o Soro Fetal Bovino (SFB) e a Albumina Sérica Bovina (BSA). Neste estudo, os efeitos do SFB e da BSA-faf durante a PIV de embriões bovinos, foram investigados quanto à quantidade na produção de blastocistos e em termos de qualidade, quando submetidos à vitrificação e análise de expressão gênica. Foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro* 2.171 ovócitos, oriundos de abatedouro. Em cada réplica, os CCOs foram distribuídos em três tratamentos (T1: suplementação com SFB; T2: suplementação com BSA; T3: suplementação inicial com BSA e final com SFB.). Quanto à taxa de clivagem (D2), não houve diferença entre os tratamentos; porém quanto às taxas de blastocisto, T1 foi superior aos T2 e T3 nos dias 6,5 a 8,5 de avaliação ( $P < 0.001$ ). Os embriões de todos os tratamentos que alcançaram estágio de BL e/ou BX (total de 507 embriões) nos dias 6,5 e 7,5 foram separados e, 50% deles, vitrificados pelo método da OPS, descongelados, retornando então ao CIV, e observados às 24, 48 e 72 horas pós-vitrificação; os outros 50% dos embriões permaneceram como grupo controle. Para esta análise, foram consideradas *re-expansão* e *eclosão* das estruturas analisadas como parâmetro de avaliação, mediante os fatores *tratamento* (T1 vs. T2 e T3), *grupo* (C vs. V), *estágio embrionário* (BL vs. BX) e *tempo* (D6,5 vs. D7,5). Em suma, os resultados para o teste de

criotolerância foram: T1=T2>T3; C>V; BX>BL; D6,5>D7,5. Quatro *pools* com 9 blastocistos eclodidos do grupo controle em D8,5, de cada tratamento, foram formados para avaliação da expressão dos genes MnSOD, Bax, BCL-2, HSP-70, CIRP-b, ACAT-2 e ATP8A1. Para normalização dos dados, foram utilizados os genes constitutivos Actina e GAPDH. A expressão da maioria dos genes não foi significativamente diferente entre T1 e T2, exceto para o ACAT-2 – o qual se diferenciou devido à composição protéica do meio. A menor expressão significativa no T3, pode indicar uma condição sub-ótima deste meio à PIV de embriões. A suplementação com SFB produziu mais embriões e com qualidade semelhante a aqueles produzidos em suplementação de BSA-faf. É possível, portanto, concluir que os componentes séricos presentes no soro não afetaram os parâmetros analisados neste estudo. Possíveis efeitos no desenvolvimento embrionário avançado e fetal, bem como a variação entre as partidas de soro, devem ser analisados em outros experimentos.

**Palavras-chave:** Embrião, Bovino, SFB, BSA, Criotolerância, Qualidade embrionária.

## EFFECT OF DIFFERENT SOURCES OF PROTEIN ON QUALITY AND QUANTITY DURING THE CULTURE OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS.

### ABSTRACT

The embryo IVP success is related to the knowledge of main requirements from gametes and embryos in different stages of development. It is well known that IVP embryos are quite different of those counterparts *in vivo* in many aspects. Dissimilarity between both has been studied in attempting to turn artificial media mostly similar to embryo natural environment. For that, viability of these embryos (*in vivo* or *in vitro*, from diverse systems of production) may be measured by a variety of tools, such as cryotolerance, metabolism analysis, gene levels and expression. Protein medium supplementation in culture has been largely discussed as well, aiming the substitution for defined components, where there is comprehension of its composition, eliminating or adding beneficial products to the embryo in this way, without existing unknown factors in it – characteristics usually attributed to serum components, whose most used are Bovine Calf Serum (FCS) and Bovine Serum Albumin (BSA). In this study, the effects of FCS being substituted total or partially by BSA during bovine embryos IVP, were investigated to quantity (blastocyst rate) and quality, when submitted to vitrification and gene expression analysis. Two thousand one hundred seventy one (2.171) oocytes obtained from abattoir ovary were matured, fertilized and cultured *in vitro*. In each replicate, CCOs were distributed in three treatments: (T1: supplementation with FCS on IVM and IVC; T2: supplementation with BSA on IVM and IVC; T3: supplementation with BSA on IVM and at the beginning of IVC and FCS, at the end of IVC). For cleavage rates (D2), there were no difference among treatments; therefore for blastocyst rates, T1 was superior to T2 and T3 on days 6.5 to 8.5 of development evaluation ( $P < 0.001$ ). Embryos from all treatments which have reached BL and/or BX stage (507 embryos, in total) were separated and, 50% of them, vitrified by OPS method, post-thawed, returning then to IVC, and observed at 24, 48 and 72 hours post-vitrification; other 50% remaining embryos were preserved as control group. For these analyses, were considered structures *re-expansion* and *hatching* rates as a parameter to evaluate factors as *treatment* (T1 vs. T2 and T3), *groups* (C vs. V), *embryo development stage* (BL vs. BX) and *time* (D6.5 vs. D7.5). At a glance, results for cryotolerance test related to these parameters were: T1=T2>T3; C>V; BX>BL; D6.5>D7.5. Four *pools* with 9 hatched blastocysts from Control group on D8.5, from each

treatment, were formed to evaluate the expression of genes MnSOD, Bax, BCL-2, HSP-70, CIRP-b, ACAT-2 and ATP8A1. To standardize data, the constitutive genes, Actina and GAPDH, were taken. The majority genes expressions were not significantly different between T1 and T2, except for ACAT-2 – who might be due to the medium protein source composition. The smaller and significant expression on T3, should indicate a suboptimal condition of this medium to embryo IVP. The supplementation with FCS produced more embryos with similar quality to those originated from BSA-faf supplementation. It is possible therefore, to conclude that serum components do not affected the parameters analyzed here, in this working environment. Possible effects in late embryo and fetal development, as well as variation among serum batches, should be verified in other experiments.

**Key-words:** Embryo, Bovine, BCS, BSA, Cryotolerance, Embryo quality.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Com o avanço da tecnologia da produção *in vitro* (PIV) de embriões associado à técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som, novas ferramentas estão disponíveis para otimizar o uso de fêmeas com alto potencial genético. Todavia, o sucesso da PIV está relacionado ao conhecimento das necessidades dos gametas e embriões em diferentes fases do desenvolvimento. É sabido que embriões PIV são diferentes dos embriões *in vivo* em vários aspectos. As diferenças entre os dois modelos têm sido pesquisadas na tentativa de tornar os meios artificiais o mais próximo possível ao ambiente natural do embrião.

A morfologia e a taxa de blastocisto têm sido critérios utilizados para avaliação da competência do desenvolvimento embrionário (ALIKANI *et al.*, 2002). Entretanto, com o advento de algumas biotecnologias, tem-se tornado claro que a competência embrionária pode ser severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis. Logo, este não é um critério extremamente confiável, mesmo para avaliar embriões *in vivo*. A viabilidade do embrião pode ser mensurada por outras formas, tais como a criotolerância, a análise do metabolismo, os níveis e a expressão de genes – pela transcrição do RNAm pela técnica do RT-PCR (WRENZYCKI *et al.*, 2004).

Na tentativa de melhorar a qualidade e conseqüente viabilidade do embrião produzido *in vitro*, estudos têm afirmado que o co-cultivo determina a secreção de fatores embriotróficos e fatores de crescimento, e que a suplementação dos meios de cultivo com aminoácidos em concentrações semelhantes às encontradas no oviduto e útero das fêmeas bovinas melhora a taxa de desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000). O autor ainda enfoca que a inclusão de fontes de proteína como a albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultura também favorece o desenvolvimento embrionário agindo como quelantes de cátions, prevenindo a adesão do embrião em superfícies, servindo como fonte de energia e auxiliando no metabolismo de carboidratos.

Embriões PIV na ausência de proteínas exibem diferenças na atividade metabólica, diminuição na capacidade de desenvolvimento, menor conteúdo protéico e menor número de células, quando comparados aos cultivados na presença de proteína. O soro e a albumina sérica são os mais utilizados como fontes protéicas para o cultivo de embriões mamíferos (GOMEZ & DIEZ, 2000 e WRENZYCKI *et al.*, 2001), embora persistam muitos questionamentos em relação aos possíveis efeitos colaterais.

Um dos fatores limitantes da utilização da PIV é a alta sensibilidade ao resfriamento e baixa tolerância à criopreservação, quando comparados à produção *in vivo* (GEORGE *et al.*, 2006). A criopreservação em animais de importância pecuária é uma ferramenta valiosa para manter a diversidade genética e para fins de reprodução. Apesar das intensivas pesquisas que têm sido conduzidas em escala mundial, a criopreservação de embriões PIV de várias espécies ainda não apresenta resultados satisfatórios (DINNYÉS *et al.*, 2006), mas tem-se obtido progressos com métodos de vitrificação. Segundo ENRIGHT *et al.* (2000), os embriões PIV apresentam maior sensibilidade à crioinjúrias em relação aos embriões produzidos *in vivo*. Tal diferença pode ser devido a alterações na expressão gênica embrionária (WRENZYCKI *et al.*, 1999).

O estudo de genes e de suas funções em ovócitos e embriões tem sido mais lento em relação a outros tipos de células e tecidos. Isto ocorre principalmente, pela limitada disponibilidade de material de ovócito e embriões. Entretanto, nos últimos anos novas técnicas têm surgido possibilitando utilizar quantidades mínimas de material para avaliação da expressão gênica (DODE, 2006) por um lado, e por outro, com as tecnologias *in vitro* disponíveis permitem produzir grande quantidade de embriões bovinos com um custo relativamente baixo (MUCCI *et al.*, 2006).

Portanto, há necessidade de se aperfeiçoar os sistemas de cultivo de embriões bovinos para a obtenção de embriões de alta qualidade. O desafio para o futuro é usar este conhecimento para estabelecer condições de cultivo que levam em consideração as mudanças necessárias para o desenvolvimento embrionário e permitam que os genes presentes sejam expressos de uma maneira similar à que são expressos *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2006), produzindo embriões de qualidade superior *in vitro* (RIZOS *et al.*, 2002-a).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A produção *in vitro* de embriões, em si, compreende a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos, a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* embrionário (CIV). Entretanto, uma das etapas iniciais diz respeito à colheita de ovócitos, que podem ser obtidos *in vitro* por punção folicular ou dissecação folicular (quando o número de ovários é reduzido), em ovários provenientes de abatedouros ou *in vivo*, por laparotomia, laparoscopia via flanco ou transvaginal e ainda pela ultra-sonografia transvaginal (GONÇALVES, *et al.*, 2002).

#### 2.1.1 – Colheita e Seleção dos ovócitos

A habilidade de um embrião bovino se desenvolver até o estágio de blastocisto, para implantar e gerar um produto saudável não é um processo simples (SIRARD, *et al.*, 2006). De acordo com DODE (2006), um ovócito competente difere de um incompetente por sua capacidade de sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

A qualidade do ovócito é um fator determinante para que ele tenha condições de formar embrião após a fecundação (SIRARD & BLONDIN, 1996). Para ECKERT & NIEMANN (1995), tanto ovócitos de qualidade I quanto os de qualidade II não mostraram diferença na taxa de blastocisto. Ovócitos puncionados de folículos grandes, > 6 mm, são mais competentes em relação a ovócitos de folículos pequenos, 2-6 mm e possuem maior probabilidade de gerar embrião (LONERGAN *et al.*, 1994; LEQUARRE *et al.*, 2005).

DODE (2006) afirma que somente ovócitos competentes têm a capacidade de sofrer a maturação completa. Essa competência é progressivamente adquirida durante os

estágios finais da foliculogênese, através de várias mudanças celulares e moleculares que conferem ao ovócito a capacidade de completar a divisão meiótica, garantir uma fecundação monospermica, descondensar a cabeça do espermatozóide, transpor a transição materno-zigótica (MZT) e prosseguir o seu desenvolvimento.

Quando blastocistos são oriundos de folículos grandes, boa parte dos embriões possui uma transição rápida de 5-8 células para 9-16 células. Folículos pequenos originam embriões com atraso na formação de cavidade, indicando qualidade embrionária ruim (LEQUARRE *et al.*, 2005). A qualidade do ovócito pode ser influenciada pelo ambiente dentro do folículo de acordo com a estimulação hormonal do ovário no momento da aspiração do ovócito, quer seja *in vivo* ou de abatedouro (LONERGAN *et al.*, 2003). Tendo em vista que ovócitos maturados *in vitro* apresentam menores taxas de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro*, quando comparados aos *in vivo*, pode-se de antemão presumir que o baixo desenvolvimento embrionário deve-se à deficiência do ovócito, seja na maturação nuclear, citoplasmática ou molecular (DODE, 2006). O texto ainda afirma que a diferença entre ovócitos competentes e incompetentes é o resultado da expressão diferenciada de genes. Se os estoques de RNAm maternos contribuem para a competência, mudanças qualitativas e quantitativas devem existir entre RNAs dessas duas categorias de ovócitos. Portanto, a variação na expressão gênica permite a identificação e o isolamento de genes associados com o grau de competência do ovócito, o que forneceria informações valiosas dos mecanismos moleculares envolvidos na maturação ovocitária completa.

### **2.1.2 – Maturação *in vitro***

Durante a ovogênese, os ovócitos de mamíferos permanecem retidos no estágio de diplóteno da prófase da primeira divisão meiótica, desde a vida fetal até pouco antes da ovulação. A retomada da meiose pode ser mediada por um estímulo hormonal *in vivo*, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, ou pela retirada do ovócito de dentro do folículo, quando há quebra da vesícula germinativa. O processo segue então até a metáfase II, para depois ocorrer à expulsão do 1º corpúsculo polar. O período da maturação é o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação (DODE, 2006; LONERGAN *et al.*, 2003).

Durante a maturação do ovócito ocorrem mudanças estruturais e bioquímicas, tanto em nível nuclear quanto citoplasmática do ovócito. Os ovócitos aumentam seu diâmetro até quando o folículo atinge 3 mm de diâmetro. Entre 3 e 15 mm de diâmetro folicular, o ovócito não altera mais o seu tamanho (MERTON *et al.*, 2003). Os ovócitos que atingem o seu crescimento total completam a maturação nuclear, mesmo na ausência de qualquer agente estimulador como, por exemplo, as gonadotrofinas (DODE & ADONA, 2001; ALI & SIRARD, 2005). Acredita-se que maturação citoplasmática de ovócitos maturados *in vivo* seja mais eficiente do que ovócitos maturados *in vitro* (SIRARD & BLONDIN, 1996), justificando a diferença de taxa de blastocistos ao final da produção dos dois sistemas (46,5% de blastocisto de ovócitos cultivados *in vitro* vs. 58,2% de blastocisto de ovócitos cultivados *in vivo* – RIZOS *et al.*, 2002-b).

O processo final de maturação de ovócito *in vivo* tem duração, aproximadamente 5 dias que é quando o folículo cresce de 4 para 15 mm e se torna dominante, pronto para ser fertilizado e desenvolver um embrião (PAVLOK *et al.*, 1992). No entanto, no processo de maturação *in vitro*, os ovócitos possuem entre 22 e 24 horas para finalizar todo seu processo de maturação e são provenientes de folículos de 2 a 6 mm (SIRARD *et al.*, 1992). Assim, é possível que ovócitos maturados *in vitro* não adquiram uma competência máxima devido à incompleta capacitação do ovócito, um processo no qual estão sendo sintetizadas proteínas, RNA e outras moléculas (HYTELL *et al.*, 1997), que são alterações ultra-estruturais importantes para que se tenha sucesso no desenvolvimento embrionário (SENBON *et al.*, 2004). Logo, quando um ovócito imaturo é removido do folículo, ele deve ser capaz de sofrer não só a maturação nuclear e citoplasmática, mas também a maturação molecular (SIRARD *et al.*, 2006).

Durante a maturação nuclear, as enzimas das famílias quinases e fosfatases desencadeiam uma cascata de fosforilação e defosforilação que atuam no fator promotor de maturação (FPM), que é responsável pela retomada da meiose e o término da maturação de ovócitos de mamíferos (NURSE, 1990; GONÇALVES *et al.*, 2002). O FPM aparece em nível baixo quando o ovócito está em vesícula germinativa, ocorrendo um aumento gradativo no decorrer da meiose, atingindo o valor máximo no estágio de metáfase I (MI). Após este pico a atividade de FPM cai abruptamente, nos estágios de anáfase I (AI) e telófase I (TI). No momento da metáfase II (MII), há um aumento da atividade de FPM que são mantidos por várias horas após a maturação do ovócito e,

gradativamente, diminuem após 30 horas de maturação ou logo depois da fecundação (GONÇALVES *et al.*, 2002).

A retomada da meiose induz a inativação da transcrição e imediatamente limita o programa molecular do ovócito requerido para passar a MZT. Portanto, ações para modificar o programa molecular do ovócito devem ocorrer antes do rompimento da vesícula germinativa (DODE, 2006).

Durante este processo, também ocorrem significativas alterações nas células somáticas que circundam o ovócito – as células especializadas da granulosa, o complexo *cumulus* ovócitos (CCOs), iniciam um processo de expansão, tornado-se suspensas em uma matriz gelatinosa, permanecendo separadas em consequência do acúmulo da secreção de ácido hialurônico (GONÇALVES *et al.*, 2002). A presença e aparência do CCOs são de fundamental importância para o sucesso da maturação do ovócito. O CCOs bloqueia a retomada da meiose do ovócito favorecendo uma correta maturação citoplasmática, possuem um papel essencial nas primeiras horas de maturação (MERTON *et al.*, 2003) e protegem o ovócito do estresse oxidativo induzido pela apoptose de célula da granulosa durante o processo de maturação (YUAN *et al.*, 2005). A remoção da célula do cumulus também prejudica a retomada da meiose (SIRARD & FIRST, 1988). Os CCOs estão intimamente em contato com ovócito por junções intercomunicantes, do tipo *gap*, que permitem a passagem de nutrientes para suplementação do ovócito, como o piruvato de sódio – importante para maturação nuclear do ovócito (NAGAI, 2001) e alguns componentes químicos reguladores da maturação do ovócito. A presença de um inibidor das junções *gap*, durante o período inicial da maturação, causa uma diminuição drástica na taxa de blastocisto em bovinos (ALI & SIRARD, 2005). As junções tipo *gap* supracitadas, segundo estudos, diminuem progressivamente durante a maturação (PALMA, 2001).

Para a maturação *in vitro* de ovócito de bovino normalmente utiliza-se o meio base para cultivo de tecido (TCM 199) com sais de EARLE's (AYOUB & HUNTER, 1993, GONÇALVES *et al.*, 2002 e DODE *et al.*, 2002). Este meio pode ser modificado de acordo com os protocolos de cada laboratório, podendo ser suplementado com fontes energéticas, tais como glicose e piruvato; fontes protéicas, como SFB, BSA ou macromoléculas sintéticas, como PVA, PVP – (ALI & SIRARD, 2002); bicarbonato de sódio, L-glutamina, HEPES e hormônios LH e FSH (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Somando-se às tentativas de melhorar a composição dos meios MIV, NAGAI (2001) salienta que, para se obter sucesso na maturação de ovócitos é necessário, também, que o meio esteja com pH, osmolaridade e composição iônica adequados; a temperatura da estufa (39°C); e adequado balanceamento de gases (CO<sub>2</sub>, 5% e O<sub>2</sub>, 20% - em cultivo de alta tensão de O<sub>2</sub>) devem ser verificados e ajustados rotineiramente.

### **2.1.3 – Fecundação *in vitro***

A fecundação resume os eventos relacionados à união dos gametas masculinos e femininos para formação de um novo indivíduo, produto. Esses eventos iniciam-se pela passagem do espermatozóide através das diferentes camadas celulares e acelulares que circundam o ovócito, culminando com a penetração no citoplasma, formação dos pronúcleos feminino e masculino (PALMA, 2001) e singamia.

Os espermatozóides atravessam a camada das células do *cumulus*, que estão embebidas em ácido hialurônico, com auxílio da enzima hialuronidase – encontrada na membrana plasmática do gameta masculino – que digere esse conteúdo intercelular. O movimento de hiperativação permite a migração dos gametas masculinos em direção à zona pelúcida (ZP). Uma vez alcançada a ZP, o espermatozóide liga-se a uma proteína que induzirá a reação acrossômica (RA), ocorrendo então fusão das membranas cromossômicas e exocitose do conteúdo do acrossoma. Na passagem do espermatozóide pela membrana plasmática (ou vitelina) do ovócito no momento da fecundação, iniciam-se intensas reações locais para ativação do ovócito e bloqueio aos demais espermatozóides. A ativação faz com que o ovócito retome sua atividade metabólica e conclua a segunda divisão meiótica (MII), com a expulsão do 2º corpúsculo polar. Segue-se, então, a descondensação da cromatina haplóide dos gametas feminino e masculino, ocorrendo formação e aposição dos pronúcleos masculino e feminino. Depois, dissolução da membrana nuclear, condensação dos cromossomos e ordenamento em um plano equatorial (singamia) até o fim da mitose (PALMA, 2001).

*In vitro*, entretanto, é preciso realizar seleção e capacitação dos espermatozóides viáveis, uma vez que estes se encontram congelados, e no processo de criopreservação espermática ocorrem muitos danos celulares a muitos deles.

As técnicas de seleção espermática são realizadas com objetivo de remover o plasma seminal, o crioprotetor e aumentar a concentração de espermatozóide de boa qualidade (PARRISH *et al.*, 1995), para separação dos espermatozóides vivos dos mortos, de modo a evitar que os mortos exerçam efeitos deletérios sobre os vivos, o que é de fundamental importância para a FIV (QUEIROZ, 1994). Devido o plasma seminal conter fatores que inibem a capacidade de fecundação, é essencial que os espermatozóides sejam separados rápida e eficientemente (MORTIMER, 1994). Baseado nisto, as técnicas de separação espermática dos componentes do sêmen e dos crioprotetores, ou para preparação do sêmen, mais utilizadas são:

- Lavado espermático: o método mais simples para lavagem dos espermatozóides é a centrifugação, visto tratar-se apenas de diluição do sêmen com um excesso de volume de meio e separação de espermatozóides. Entretanto, na população espermática final permanecem ainda presentes os mortos, anormais e outros elementos celulares. É aconselhado que pellets seminais não selecionados sejam abandonados no uso para tecnologias de reprodução assistida e suas aplicações (MORTIMER, 1994), apesar de AVERY & GREVE (1995) e DODE *et al.* (2002-b) afirmarem que a técnica tem sido utilizada sem afetar as taxas de clivagem e produção de blastocistos.

- Swim-up: fundamenta-se na motilidade ascendente dos espermatozóides. Há inclinação dos tubos em ângulo de 45°, em ambiente de 39°C; alguns laboratórios incubam o sêmen em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada, permitindo que os espermatozóides migrem para a porção superior do meio e os demais constituintes do sêmen permaneçam no fundo do tubo. O sobrenadante é então aspirado, transferindo-se essa amostra para outro tubo, para centrifugação. Posteriormente, despreza-se o sobrenadante, adicionam-se meio Sp-TALP, procedendo novamente o mesmo tipo de centrifugação. Ao pellet resultante da segunda centrifugação, acrescenta-se FERT-TALP para obter a concentração final de 1 a 2 x 10<sup>6</sup> espermatozóides/ml necessária para fecundação (GONÇALVES *et al.*, 2002).

- Gradiente de Percoll: baseado na diferença de densidade. O Percoll é licenciado apenas para o uso *in vitro* (MORTIMER, 1994). É preparado em diferentes concentrações, formando um gradiente necessário de separação espermática. GONÇALVES *et al.* (2002) descrevem o uso da solução de Percoll 90%; e a partir desta solução, prepara-se o

Percoll 45%, diluindo na proporção de 1:1, com meio indicado por cada laboratório. Em um tubo de ensaio cônico é colocado 2ml de solução de Percoll 90% e, lentamente, adiciona-se sobre a primeira camada 2ml da solução 45%, sem permitir homogeneização entre as duas soluções. Descongela-se a palheta de sêmen e o conteúdo é depositado sobre o gradiente. Centrifuga-se a solução em rotação e tempo determinados, removendo o sobrenadante em seguida, e os espermatozóides são suspensos em meio FERT-TALP para suceder a FIV.

O método de gradiente de Percoll com duas camadas tem sido satisfatório para a maioria das amostras. No entanto, para amostras astenozoospermica os resultados podem ser desapontadores, preferindo-se então adotar outros métodos para separação espermática, como o gradiente de Nycodenz ou a técnica do 'mini-Percoll', que possuem quatro camadas descontínuas do gradiente e camadas de volume e concentrações reduzidos (45%, 63% e 85.5%, respectivamente) - (MORTIMER, 1994). Mesmo proporcionando uma taxa de recuperação de espermatozóides maior quando comparado ao *swim-up*, o Percoll tem a desvantagem de apresentar variação entre partidas, sendo algumas deletérias aos espermatozóides – o que afeta resultados de FIV (AVERY & GREVE, 1995 e DODE *et al.*, 2002-b). O último grupo de pesquisadores não encontrou diferença no método de seleção para as três técnicas utilizadas, sendo o gradiente Percoll, *swim-up* e lavagem em relação à taxa de penetração e clivagem, ao contrário de MENDES *et al.* (2003), que obtiveram melhores resultados com a utilização do gradiente Percoll. Possivelmente, a explicação para os resultados satisfatórios entre as várias técnicas de seleção seja a concentração do sêmen utilizada na FIV, que pode ter superado as diferenças na qualidade do mesmo (DODE *et al.*, 2002-b).

A Capacitação Espermática pode ser definida, segundo RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al.* (2001), como um processo gradual, de passos múltiplos, que modifica a arquitetura da membrana plasmática do espermatozóide intrinsecamente estável. Somente o espermatozóide capacitado tem habilidade de ligar-se à zona pelúcida do ovócito, pois somente ele consegue sofrer RA (GONÇALVES *et al.*, 2002). *In vitro*, a heparina é o que desencadeia a capacitação dos espermatozóides, finaliza a reação acrossômica e permite a penetração espermática na ZP (MENDES *et al.*, 2003).

Para FIV, os espermatozóides e ovócitos maduros são co-incubados em meio específico (FERT-TALP), por um período de aproximadamente 18 (DODE & RUMPF, 2002) a 22

horas, a uma temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (GONÇALVES *et al.*, 2002), em grande parte dos sistemas de cultivo adotados para o processo. A adição dos aminoácidos penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) ao meio FERT-TALP tem sido utilizada pela maioria dos laboratórios com a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, melhorando os índices de fecundação (PALMA, 2001 e GONÇALVES *et al.*, 2002).

#### **2.1.4 – Cultivo *in vitro***

O ponto final convencionalmente usado para medir a eficácia de um sistema de cultivo *in vitro* (CIV) embrionário é a porcentagem de formação de embrião. E isto tem se tornado rotina na seleção de blastocistos, seguindo o padrão do período de cultivo para seguir à criopreservação ou à transferência (NEDAMBALE *et al.*, 2004-b; PALMA, 2001 e DODE & RUMPF, 2002).

É preciso conhecer os requerimentos bioquímicos dos embriões durante esta fase transicional do seu desenvolvimento baseando-se nos processos *in vivo*. O uso de sistemas de cultivo *in vivo*, implantando-se os embriões em estado inicial de clivagem em ovidutos de um hospedeiro intermediário (cobaias, ovelhas e coelhas) foi largamente adotado até as décadas de 60 e 70, objetivando ultrapassar a fase de ocorrência do bloqueio celular no desenvolvimento embrionário que acontecia em embriões de 8 a 16 células em bovinos. Entretanto, essa é uma metodologia pouco prática, de alto custo por exigir manutenção desses animais e procedimentos cirúrgicos para transferir e retirar embriões da receptora intermediária (GONÇALVES *et al.*, 2002). Daí para frente os avanços têm proporcionado resultados cada vez melhores no cultivo *in vitro*, apesar de ainda estarem distantes dos alcançados na produção *in vivo*. A qualidade do embrião é um dos pontos, senão o principal, de maior diferença entre a produção *in vivo* e *in vitro*. Embriões produzidos *in vitro* têm qualidade inferior (RIZOS *et al.*, 2002-a), que geralmente deve-se às diferenças existentes entre os sistemas de produção (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entretanto a biotecnologia vem desenvolvendo e aprimorando suas técnicas para tentar chegar o mais próximo possível da produção de embriões *in vivo*, em termos de qualidade.

Aspectos morfológicos tais como coloração dos blastômeros, a extensão da compactação, cinética do desenvolvimento e tempo de formação e expansão dos blastocistos, e diâmetro do embrião na eclosão podem estar relacionados com qualidade embrionária (LONERGAN *et al.*, 2006).

Embriões PIV são diferentes na sua morfologia quando comparados com embriões *in vivo*; por exemplo, eles tendem a conter mais vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, a compactação é menos pronunciada em embriões *in vitro*, e o disco embrionário é geralmente menor (DINNYÉS *et al.*, 2006). São mais sensíveis à baixas temperaturas e possuem menor criotolerância (NEDAMBALE *et al.*, 2004-b). Além disso, normalmente possuem aparência escura do citoplasma e uma densidade flutuante menor, como consequência do alto conteúdo lipídico, uma zona pelúcida mais frágil, diferenças no metabolismo e maior incidência de anormalidades cromossômicas (LONERGAN *et al.*, 2006).

Ainda que modificações no meio contraçam a produção de blastocistos *in vitro*, os benefícios obtidos com essas modificações são geralmente modestos e mesmo nos melhores resultados, aproximadamente metade dos ovócitos ainda falha em atingir o estágio de blastocisto (DODE, 2006). Espera-se que, aproximadamente, 30 a 40% dos ovócitos maturados e fecundados *in vitro* atinjam o estágio de blastocisto durante o cultivo embrionário, sendo esta etapa a principal limitação para a produção de maiores taxas de embriões (SERAPIÃO, 2006).

Para tanto, muitos meios têm sido pesquisados levando em conta dois aspectos básicos: meios que respondam as necessidades metabólicas dos embriões durante seu desenvolvimento e que evitem em sua composição as células somáticas, e ainda diminuam ou eliminem as fontes protéicas (PALMA, 2001). Isto se justifica pelo fato de que as células somáticas começam competir com os embriões após o quarto dia de cultivo, prejudicando os resultados da PIV se o meio não for devidamente enriquecido (GONÇALVES *et al.*, 2002) e ao fato de as fontes protéicas mais utilizadas como suplemento serem do tipo indefinidas (ALI & SIRARD, 2002). No entanto, há evidências de que o co-cultivo celular ou o cultivo em meio condicionado venha sendo utilizado, alcançando resultados satisfatórios do desenvolvimento *in vitro* (DODE & RUMPF, 2002) e segundo RIEF *et al.* (2002), um dos motivos positivos pelo qual se utiliza o sistema de co-cultivo é a capacidade que estas células têm de retirar embriotoxinas do meio de

cultivo e/ou produzir substâncias embriotróficas que auxiliem no desenvolvimento do embrião.

Entre os vários tipos celulares utilizadas para co-cultivo, podem-se citar as células epiteliais de ovidutos bovinos (BOEC), células da granulosa (GC), vesículas trofoblásticas, células de linhagens celulares estabelecidas para cultivo – como as células de rim de macaco verde (VERO), células de fígado de rato búfalo (BRLC), células endometriais, dentre outras (LUCIANO *et al.*, 2005 e SERAPIÃO, 2006). A contribuição das células somáticas é a produção de fatores de crescimento, que estimulam e são essenciais para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Além disso, essas células agem removendo os componentes prejudiciais do ambiente de cultivo, tais como radicais livres, metabólitos, e íons de amônia. As células de linhagem pré-estabelecida, apesar do alto custo, fornecem melhor controle sanitário (PALMA, 2001).

Outros métodos de cultivo têm sido propostos com objetivo de otimizar as taxas de PIV. Cita-se o sistema de meio seqüencial – que consiste em realizar uma perfusão para introduzir mudanças na composição do meio, de acordo com o requerimento dos embriões em estágios distintos de desenvolvimento. Há também o cultivo em micro-câmara com um sistema micro-fluídico, que propicia um ambiente mais próximo ao modelo *in vivo* do que o sistema estático de micro-gotas, que permite o uso de meio seqüencial com mudança gradual sem movimentar os embriões (DODE & RUMPF, 2002 e SERAPIÃO, 2006).

A composição do meio de cultivo é baseada nos fluidos do útero e oviduto durante o início da gestação, oriundos da difusão de nutrientes do plasma. Neste, estão presentes secreções de células epiteliais (GONÇALVES *et al.*, 2002). As diferentes formulações baseiam-se em solução salina suplementada com uma fonte de energia (piruvato, glicose ou lactose), uma fonte protéica (soro ou albumina sérica), vitaminas, água, íons, componentes tampões – os quais servem como índices para controle de qualidade da osmolaridade e do pH do meio (PALMA, 2001).

Dentre as diferentes substâncias usadas na suplementação, WRENZYCHI *et al.* (2001) e SERAPIÃO (2006) destacam o soro, a albumina e as macromoléculas.

OLIVEIRA *et al.* (2006) articulam que os meios de PIV usados atualmente na produção de embriões são normalmente suplementados com fontes protéicas exógenas, tais como o soro ou a albumina. Ambas são misturas complexas e fontes protéicas não definidas – possivelmente pela presença de vários peptídeos pequenos, substratos energéticos e fatores de crescimento. Diferentes tipos de proteína e concentrações de suplementação com soro nos meios de maturação e cultivo podem afetar a cinética e as taxas de desenvolvimento embrionário.

O soro é uma fonte protéica muito utilizada para produção de embrião *in vitro* de mamíferos. Até hoje não se conhece a correta composição desse produto, portanto ele é considerado um meio indefinido. Dentre os mais utilizados para cultivo estão o de vaca em estro (SVE) e o fetal bovino (SFB). O SFB contém hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, quelantes para metais pesados, peptídeos, proteínas e moléculas definidas e indefinidas, ácidos graxos, glicídios, entre outros componentes (GONÇALVES *et al.*, 2002 e KESKINTEPE & BRACKETT, 1996).

Alguns autores consideram a albumina como meio indefinido, embora sua composição seja mais restrita e conhecida em relação ao SFB. A mais utilizada em relatos de estudos é a albumina sérica bovina – o BSA. Esta contém peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento. Comercialmente, há diferenças entre os lotes de BSA que podem inibir ou favorecer o desenvolvimento do embrião cultivado *in vitro* (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996).

Já as macromoléculas, como a *polivinilpirrolidona* (PVP), o *álcool polivinílico* (PVA) e o *hialuronato*, tornam o meio definido. Além disso, os meios definidos não necessitam do co-cultivo celular. Todavia, há necessidade de alterar as condições gasosas do cultivo; a mistura gasosa mais utilizada em meios sem soro e células somáticas é 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub>, e 90% de N<sub>2</sub> (GONÇALVES *et al.*, 2002; NEDAMBALE *et al.*, 2004-a e SERAPIÃO, 2006). O *knockout serum replacer* (KSR) é também um suplemento quimicamente definido, desenvolvido principalmente para manutenção do cultivo de células tronco; pode substituir o soro na CIV de embriões, porém ainda têm apresentado resultados variáveis quanto às taxas de blastocistos (citado por SERAPIÃO, 2006).

Na tentativa de continuar melhorando condições e resultados *in vitro*, os meios com co-cultivo vêm sendo corrigidos e adaptados aos meios definidos simples como o CR-1 ou

-2, SOF e KSOM – acrescidos de aminoácidos – ou meios definidos complexos, como o TCM 199, Ham F10 ou Menezo B<sub>2</sub> – acrescidos de vitaminas e aminoácidos em concentrações variáveis (PALMA, 2001)

Os meios de cultura definidos simples mais utilizados (CR-2, KSOM, SOF) foram comparados em um estudo por TAVARES *et al.* (2002), em que obtiveram resultados equivalentes entre os três quanto ao suporte para desenvolvimento ao estágio de clivagem (sobressaindo o CR-2), de blastocisto (resultados superiores para KSOM e SOF), e de blastocisto eclodido (maior proporção obtida no KSOM). O uso associado ou seqüencial do meio KSOM + BSA e SOF + SFB, demonstrado por NEDAMBALE *et al.* (2004-a), também se mostrou viável no desenvolvimento das fases de mórula a blastocisto eclodido avaliadas.

Apesar de a condição de cultivo influenciar a cinética do desenvolvimento inicial, é provável que os principais fatores controladores destes parâmetros estejam intrínsecos aos gametas (o ovócito, o espermatozóide ou ambos), de acordo com LONERGAN *et al.*, 2006. E, segundo SERAPIÃO (2006) e outros estudos aqui apresentados, sabe-se que o uso de fontes protéicas associado aos sistemas de co-cultivo aumenta a quantidade e qualidade das estruturas que atingem o estágio de blastocisto.

Diferentes tipos e fontes de suplementação protéicos utilizados no meio de cultivo podem influenciar grandemente o desenvolvimento *in vitro* do embrião mamífero, variando da estimulação marcada aos efeitos inibitórios significantes (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

## 2.2 – SUPLEMENTAÇÃO PROTÉICA PARA MIV E CIV

**A**tualmente, centros de pesquisa buscam a utilização de meios definidos, onde há o conhecimento da sua composição e que possibilite a eliminação ou acréscimo de produtos que influenciam no desenvolvimento do embrião, sem que ocorra influência de fatores inerentes desconhecidos do meio (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991), como a qualidade intrínseca do ovócito, que é um fator chave na proporção de ovócitos que alcançam o estágio de blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006).

A maturação de ovócito em meio sem fonte de proteína é prejudicial ao desenvolvimento embrionário (ECKERT & NIEMANN, 1995). Os grupos de ALI & SIRARD (2002) e RIZOS *et al.* (2002-b) rebatem afirmando que ovócitos bovinos podem ser maturados *in vitro* em meios sem adição protéica, sem que haja efeito negativo no desenvolvimento embrionário subsequente. Contudo, é preciso que se faça essa suplementação na fecundação e no desenvolvimento embrionário.

A competência limitada de desenvolvimento dos ovócitos bovinos após a MIV pode ser usada para entendimento dos fatores envolvidos na aquisição de tal habilidade. Por esta razão e para entender as necessidades de um ovócito imaturo, enfatiza-se que os meios de cultivo de composição indefinida deveriam ser banidos (ALI & SIRARD, 2002).

As condições de cultivo durante a PIV de embriões bovinos podem impactar de alguma maneira no desenvolvimento potencial inicial do embrião. O cultivo pré-implantação de embriões, segundo relatam LONERGAN *et al.* (2006) e RIZOS *et al.* (2002-b), é particularmente importante, pois nesse período ocorrem diversos grandes eventos do desenvolvimento, incluindo: (i) primeira divisão da clivagem, (ii) ativação do genoma embrionário, (iii) compactação da mórula, (iv) formação do blastocisto.

Embriões bovinos pré-implantados são capazes de se desenvolverem *in vitro* em categorias de cultivo amplamente variadas (RIZOS *et al.*, 2002-b). Entretanto, essa plasticidade na capacidade de se adaptar, na maioria dos casos, às condições *in vitro* sub-ótimas, pode levar a alterações de longo prazo nas características de crescimento de desenvolvimento fetal e pós-natal (LONERGAN *et al.*, 2006).

WRENZYCKI *et al.* (2001) reforçam a amplitude dos sistemas de cultivo embrionário que têm sido desenvolvidos para a produção de embriões viáveis. Normalmente, o meio base é acrescido de soro ou albumina. Apesar de o soro ou a albumina serem comumente adicionados aos meios como fontes protéicas para melhorar a eficácia do cultivo, as diferentes partidas desta proteína pode variar amplamente os efeitos durante o período de cultivo (ALI & SIRARD, 2002). Até hoje, muitos esforços têm sido focalizados na substituição do soro/BSA por macromoléculas quimicamente definidas tais como o PVA e hialuronato de sódio (SH) em sistemas de CIV e congelamento. Entretanto, os resultados obtidos com estes substitutos têm sido tanto inconsistentes, como inferiores aos obtidos com proteínas séricas (NEDAMBALE *et al.*, 2004-a).

Ainda no intuito de comparação entre os tipos e sistemas de CIV, OLIVEIRA *et al.* (2006) afirmam que a suplementação sérica tem mostrado um efeito bifásico, com inibição inicial na primeira clivagem, para uma estimulação subsequente de compactação da mórula e desenvolvimento do blastocisto pelo aceleração do processo de blastulação. Por outro lado, o meio definido é menos capaz de apoiar o incremento embrionário, resultando em embriões com o desenvolvimento comprometido.

O ambiente artificial utilizado no desenvolvimento *in vitro* de embriões é muito diferente das dinâmicas do sistema *in vivo*. Além do mais, o ambiente de CIV em que se coloca um embrião pode afetar profundamente os eventos pós-implantação. Portanto, a seleção quanto ao tipo de suplementação protéica é provavelmente a consideração mais relevante para a maximização da PIV de embriões (WANG *et al.*, 1997).

### **2.2.1 – Uso de SFB e/ou BSA no desenvolvimento embrionário**

Diversos grupos de substâncias químicas são necessários no meio de cultivo para o sucesso da maturação do ovócito e do desenvolvimento do embrião bovino, durante os quais ocorrem intensas reprogramações citoplasmáticas e nucleares (SAGIRKAYA, *et al.*, 2007).

O uso do soro no cultivo embrionário tem sido relatado anteriormente, mostrando que há estimulação da expansão inicial do blastocisto, devido à aceleração do processo de blastulação, e também aumento da taxa de blastocisto. A presença do soro promove a eclosão pelo fornecimento de um *pool* de plasminogênio, que convertido em plasmina auxilia na degradação da zona pelúcida, facilitando a eclosão. Os resultados com substitutos séricos (soro/BSA) têm sido inconsistentes. (NEDAMBALE *et al.*, 2004-a). O grupo de OLIVEIRA *et al.* (2006) mostrou que a suplementação com soro tanto durante a maturação como no cultivo foi capaz de modificar a cinética do desenvolvimento embrionário significativamente, e a ausência do soro durante a MIV-FIV aumentou a duração do primeiro e quarto ciclo celulares.

No mesmo sentido, LONERGAN *et al.* (2006) também dizem que a adição de soro ao meio de cultivo aumenta a velocidade de desenvolvimento manifestada entre o espaço de

compactação de uma mórula normal e a aparência precoce de blastocisto, resultados que reforçam os encontrados por WANG *et al.* (1997), em que meios suplementados somente com BSA produziram maior quantidade de mórulas e menor porcentagem de blastocistos, bem como menor eclodibilidade dos mesmos, em relação aos meios que continham SFB em todo o cultivo ou de forma seqüencial, isto é, presente somente nos estágios mais tardios (após 72h *pi*).

NEDAMBALE *et al.* (2004-a), usaram a BSA e o soro separadamente ou associados (uso do soro no início, sendo depois substituído pela BSA), um sistema de cultivo seqüencial, porém contrário ao estudo citado anteriormente; neste, obteve-se menores taxas de eclosão e blastocistos expandidos, em D7, com menor número de células. Estas observações enfatizam o efeito benéfico do soro durante o estágio final do desenvolvimento embrionário, provados por outros grupos de pesquisa. Os autores ainda expõem que o SFB no meio SOF durante todo o cultivo embrionário induziu à formação precoce de blastocisto, sem aumentar a proliferação celular.

Em outras rotinas, o meio SOF acrescido de SFB tem apresentado satisfatórios resultados em termos de produção embrionária. Necessita reagir em atmosfera de 5% de O<sub>2</sub> ou pode ser utilizado sob alta tensão de O<sub>2</sub>, desde que se mantenham as células do CCOs remanescentes após a FIV, sugerindo que essas células facilitam o crescimento embrionário por reduzirem o estresse oxidativo do meio (DODE *et al.*, 2002-a e CORRÊA *et al.*, 2008).

Apesar de possuírem origem e composição semelhantes, estudos sugerem que há divergência no cultivo comparado entre o soro e a albumina. Não relatam interação entre meio e tipo de proteína, mas sugerem que o soro ou seus derivados têm grande efeito na PIV embrionária (WANG *et al.*, 1997). OLIVEIRA *et al.* (2006) afirmaram que a suplementação com SFB (concentrações entre 5 e 20%) levou à maior produção e aparecimento mais precoce de blastocistos do que a BSA, semelhantemente a outros relatos, que mostram além das morfologia e taxa de produção de blastocistos como índice de qualidade do embrião.

Com o conhecimento mais detalhado dos eventos envolvidos durante o desenvolvimento embrionário será possível propor alterações no sistema de cultivo embrionário, melhorando a taxa de produção de blastocistos viáveis.

## 2.3 – CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO EMBRIÃO PIV BOVINO

É sabido que embriões PIV apresentam várias diferenças em relação àqueles produzidos *in vivo*. Dentre as contestações, pode-se citar a quantidade de lipídeos, a sensibilidade às baixas temperaturas, o número de células apoptóticas, anormalidades cromossômicas, diferenças no metabolismo e outras (RIZOS *et al.*, 2002-b e LONERGAN *et al.*, 2003).

A morfologia e a taxa de blastocisto têm sido critérios utilizados para avaliação da competência do desenvolvimento embrionário (ALIKANI *et al.*, 2002). Entretanto, com o advento de algumas biotecnologias, tem-se tornado claro que a competência embrionária pode ser severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis. Logo, este não é um critério extremamente confiável, mesmo para avaliar embriões *in vivo*. A viabilidade do embrião pode ser mensurada por outras formas, tais como a coloração de blastômeros, a cinética de desenvolvimento, o diâmetro do embrião ao eclodir, o número total de células (LONERGAN *et al.*, 2006), a criotolerância, a análise do metabolismo – baseado em níveis de transcrição do RNAm pela técnica do RT-PCR (WRENZYCKI *et al.*, 2004), mas principalmente a capacidade do embrião estabelecer prenhez, vir a termo e produzir crias saudáveis (RIZOS *et al.*, 2002-a).

Evidências indicam que o período pós-inseminação ( $\rho i$ ) no cultivo do embrião é o momento mais crítico, afetando a qualidade do blastocisto no que se refere à criotolerância, expressão de genes padrão e habilidade de estabelecer prenhez (LONERGAN *et al.*, 2006). OLIVEIRA *et al.* (2006) praticamente co-afirmam que a exposição prolongada ao meio de PIV, especialmente os que levam soro, pode afetar a morfologia, o metabolismo, a criotolerância, a transcrição específica e a expressão de genes do embrião.

### 2.3.1 – Criotolerância do embrião PIV

Embriões criopreservados são amplamente usados na reprodução assistida de bovinos e apesar das intensas pesquisas que têm sido conduzidas em escala mundial, resultados

satisfatórios na criopreservação de embriões de várias espécies ainda não têm sido possíveis (DINNYÉS *et al.*, 2006).

A criopreservação em animais de produção é uma ferramenta valiosa para manter a diversidade genética e para fins de reprodução. MEZZALIRA & VIEIRA (2006) afirmam que a criobiologia se desenvolveu paralelamente ao avanço das pesquisas relacionadas à produção de embriões e tem passado por modificações graduais para ser usada como rotina. O aumento de embriões PIV em uso comercial gerou a necessidade de criopreservar os embriões excedentes. Atualmente, embriões *in vivo* possuem um protocolo que permite a obtenção de taxas de prenhez próximas das obtidas com a transferência de embriões frescos.

A criopreservação é um procedimento lento que expõe o embrião a várias fases de congelação pela ação de fatores físicos, químicos e biológicos. Esses fatores podem causar lesão na zona pelúcida, membrana ou citoesqueleto celular e distúrbios metabólicos. Tais defeitos celulares levam à perda do controle celular e eventualmente, à morte por apoptose ou necrose (LOPATAROVA *et al.*, 2006).

Como citado anteriormente, a PIV de embriões promove vários aspectos divergentes com relação à produção *in vivo*. Desta forma, pode-se articular que o meio de PIV influencia não apenas o desenvolvimento do embrião.

Diversos estudos que examinaram ao microscópio eletrônico a ultra-estrutura de embriões bovinos derivados *in vivo* e *in vitro* têm enfatizado as diferenças de densidades lipídicas, volume mitocondrial e comunicação intracelular, que podem estar relacionadas à baixa criotolerância de embriões PIV (LONERGAN *et al.*, 2006 e NEDAMBALE *et al.*, 2004-a).

De acordo com DINNYÉS *et al.* (2006), vários grupos têm afirmado que a sobrevivência de embriões criopreservados é fortemente correlacionada à idade, ao estágio de desenvolvimento e à qualidade morfológica dos mesmos.

Dentre os relatos encontrados, alguns afirmam que a viabilidade varia e mostram que as condições *in vitro*, nas quais os embriões são produzidos antes da criopreservação, parecem ter efeito na sobrevivência após o processo (DINNYÉS *et al.*, 2006 e

NEDAMBALE *et al.*, 2004-a). E consideráveis evidências apóiam o conceito de que o ambiente de cultivo *pi* é crítico em determinar a qualidade do blastocisto. Por exemplo: cultivando-se zigotos bovinos PIV *in vivo* – em oviduto de ovelha, é possível aumentar dramaticamente a qualidade dos blastocistos resultantes, em termos de criotolerância, comparados aos embriões totalmente produzidos *in vivo*. O contrário, cultivando-se *in vitro* embriões produzidos *in vivo*, resulta em blastocistos de baixa criotolerância (LONERGAN *et al.*, 2006).

A baixa taxa de sobrevivência pós-descongelamento é determinada pela sensibilidade dos embriões ao resfriamento, possivelmente em função do seu alto teor de lipídeos. Como as lesões são tempo-dependentes, são aconselhados métodos alternativos que empregam altas velocidades de resfriamento a fim de diminuir o tempo de exposição às temperaturas críticas (MEZZALIRA & VIEIRA, 2006) e aos crioprotetores – reduzindo os efeitos tóxicos.

Neste sentido, a *vitrificação* tem se mostrado mais adequada para a criopreservação de embriões PIV do que os métodos de congelamento lento (MUCCI *et al.*, 2006; NEDAMBALE *et al.*, 2004-a). É um método alternativo que usa alta concentração dos crioprotetores (que segundo PUGH *et al.*, 2000 é a maior desvantagem da arte) e sua alta velocidade de resfriamento ( $\geq 20000$  °C/min) evita a formação de cristais de gelo no interior do embrião e inibe a ruptura da sua zona pelúcida (LOPATAROVA *et al.*, 2006). Além do mais, em 1997, VAJTA proporcionou maior praticidade à técnica com o uso de palhetas plástica estiradas pelo calor – as OPS (Open Pulled Straw), que associam a redução do volume de crioprotetores da amostra e o contato direto com o N<sub>2</sub>L como minimizadores dos efeitos tóxicos e osmóticos na célula ( CHO *et al.*, 2005; LOPATAROVA *et al.*, 2006 e DINNYÉS *et al.*, 2006).

A vitrificação é viável para o congelamento de embriões bovinos nos estágios de pré-compactação ou avançado (citado por LOPATAROVA *et al.*, 2006), e a tecnologia da OPS oferece imediatas vantagens quando comparada a outros métodos de congelamento rápido: permite alta velocidade de resfriamento e aquecimento, é simples, rápida e não dispendiosa, o que torna o manuseio das células vitrificadas mais fácil (VIEIRA *et al.*, 2002).

Uma abordagem alternativa para lidar com os baixos resultados na criopreservação é modificar as células (suas condições) que serão submetidas ao procedimento, ao invés de alterar os procedimentos de criopreservação (DINNYÉS *et al.*, 2006).

Muitos fatores dissolvidos no meio de cultura podem afetar a viabilidade de embriões PIV, em particular, é sabido que os suplementados com proteínas afetam a competência e a viabilidade pós-descongelamento do embrião (citado por YOTSUSHIMA *et al.*, 2004). Avanços na sobrevivência de embriões após a vitrificação podem ocorrer melhorando-se as condições de cultivo ou selecionando-os baseado na cinética do seu desenvolvimento. Alguns estudos indicaram que embriões PIV que clivam e alcançam estágio de blastocisto mais cedo, suportam melhor a vitrificação (NEDAMBALE *et al.*, 2004-b).

A suplementação com soro em um estágio específico do embrião (geralmente a fase mais tardia) pode estimular a divisão celular e acelerar o desenvolvimento embrionário, mencionam MEN *et al.* (2005) e CHO *et al.* (2002).

NEDAMBALE *et al.* (2004-b) relatam que o rápido desenvolvimento em blastocistos nos sistemas CIV – o que é normalmente atribuído aos sistemas que recebem soro – são normalmente considerados mais viáveis e melhores para sobrevivência embrionária após a criopreservação ou transferência, quando comparados àqueles de desenvolvimento mais lento. No entanto, a eliminação de componentes séricos do meio CIV durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário tem sido indicada como benéfica, podendo formar embriões altamente criotolerantes e com potencial desenvolvimento.

Os mesmos autores viram que embriões cultivados em SOF com soro possuem menor taxa de sobrevivência após vitrificação/congelamento, quando comparados aos cultivados no mesmo meio com BSA; contudo, apresentam maior número de células em blastocistos eclodidos – este efeito do soro no meio de cultivo tem sido associado, benéficamente, com o início precoce da blastulação. Embriões produzidos em meio TCM199 ou SOF com aminoácidos não essenciais contêm mais lipídeos no citoplasma, o que também os torna mais sensíveis à crioinjúria. Resultados semelhantes foram encontrados por YOTSUSHIMA *et al.* (2004), onde embriões tratados com SFB re-expandiram após a vitrificação, apresentando aparência escura (que pode ser indicativo de acumulação excessiva de lipídeos) e viabilidade inferior comparados aos tratados com BSA durante o cultivo.

Um estudo recente sugere que a presença de soro foi prejudicial para a eclosão de embriões bovinos após o descongelamento (MUCCI *et al.*, 2006). Isto contradiz o relato de VAJTA *et al.* (1999), que afirma a necessidade da suplementação sérica para eclosão de blastocistos vitrificados.

A mensuração da competência do desenvolvimento (taxas de clivagem, blastocisto e eclosão) combinada com medidas qualitativas tais como a criotolerância e a abundância relativa de RNAm pode prover informações mais detalhadas sobre as conseqüências das modificações do ambiente *in vitro* na viabilidade do embrião (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

### 2.3.2 – Expressão de genes do embrião PIV

A expressão de genes em embriões é alterada em diferentes condições de cultura, que influenciam o potencial desenvolvimento durante a pré-implantação e o desenvolvimento fetal (CORCORAN *et al.*, 2006; SAGIRKAYA *et al.*, 2006).

Existe hoje uma ampla quantia de dados que demonstram que o ambiente PIV pode produzir efeitos na expressão padrão de genes em embriões, que por sua vez podem ter sérias implicações na normalidade do blastocisto (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Muitos têm trabalhado na identificação de genes que são diferentemente expressos em embriões *in vivo* e *in vitro*, tentando relacioná-los a qualidade embrionária necessária para se obter maior número de nascimentos (EL-SAYED *et al.*, 2006).

CORCORAN *et al.* (2006) observaram que 85% dos 384 genes identificados em blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro*, foram *down-regulated* em blastocistos cultivados *in vitro*, e sugerem que a razão pela qual os embriões *in vitro* são de qualidade inferior comparados aos *in vivo* é devido à deficiência do “maquinário” associado com a transcrição e tradução.

O período pré-implantação inicial representa uma janela no desenvolvimento durante o qual a expressão genética do embrião pode estar pré-disposta a programações aberrantes. (LONERGAN *et al.*, 2006)

Diversos autores afirmam que o ambiente de cultura pós-fecundação pode ter um efeito drástico no padrão de expressão de RNAm de muitos genes importantes para o desenvolvimento embrionário (LONERGAN *et al.*, 2006) e podem explicar a diferença na qualidade de cada embrião (RIZOS *et al.*, 2002-b). Este fato confirma que, enquanto a qualidade do ovócito é o principal determinante da taxa de blastocisto no sistema *in vitro*, a condição após a fecundação é o fator central que afetará a qualidade dos blastocistos resultantes com criotolerância e padrão genético como índices de mensuração da qualidade do embrião (RIZOS *et al.*, 2002-b; LONERGAN *et al.*, 2003 e TESFAYE *et al.*, 2007).

Estudos têm mostrado que o cultivo *in vitro* de embrião pode alterar o padrão de expressão de genes que estão envolvidos na formação de junções tipo *gap* das células, na apoptose celular, no estresse oxidativo, no processo de diferenciação celular influenciando o desenvolvimento embrionário (LONERGAN *et al.*, 2003), na criotolerância (RIZOS *et al.*, 2002-b). Entretanto, até o momento, a maioria dos trabalhos nesta área têm-se concentrado na descrição diferencial da expressão de genes embrionários de vários tipos, no intuito de enfatizar a malha de regulação que definem a qualidade destes e poucos têm se detido quanto à funcionalidade destes genes descritos (TESFAYE *et al.*, 2007).

A composição do meio junto às fontes protéicas já citadas exerce um efeito na morfologia das células do embrião e na expressão de alguns genes (RIEF *et al.*, 2002). Os eventos que ocorrem durante a MIV de ovócitos bovinos podem influenciar sua capacidade em se desenvolver embrião. Contudo, não há consenso acerca da influência da suplementação protéica no meio de maturação com o desenvolvimento embrionário e expressão de genes. Da mesma forma no CIV, independente do meio de cultivo usado, as condições de cultivo podem também afetar a expressão gênica. Estes efeitos são normalmente mensurados em blastocistos no período final do cultivo, uma vez que, embriões originados de zigotos com um padrão pró-nuclear normal, clivaram mais rápido e formaram embriões com melhor morfologia quando comparados aos padrões anormais de qualidade (LONERGAN *et al.*, 2006).

Determinados genes estão descritos na literatura como possíveis marcadores para qualidade embrionária, dentre eles pode-se destacar: Bax (pró-apoptótico), BCL-2 (anti-apoptótico), Mn-SOD (age contra o estresse oxidativo), HSP-70 e CIRP-B (ligados ao

estresse térmico, para calor e frio, respectivamente), ACAT-2 (metabolismo de lipídeos), e ATP8A1 (transporte de fosfolipase).

- **Genes ligados a Apoptose Celular – *Bax* e *BCL-2***

Um número de fatores celulares estressantes induzidos pelo ambiente de cultura tem sido identificado, e inclui a privação de fatores do crescimento e sobrevivência, desbalanços metabólicos e de substratos, e estresse oxidativo (CHANDRAKANTHAN *et al.*, 2006).

A apoptose, uma forma programada de morte celular, tem sido observada em embriões no estágio de pré-implantação em diversas espécies de mamíferos e está presumivelmente envolvida na eliminação de células anormais (RUBIO POMAR *et al.*, 2005). Além do importante papel no desenvolvimento do animal e na homeostase celular, também age como um mecanismo de controle de qualidade, o qual remove células que estão danificadas, não funcionais, extraviadas ou supranumerárias (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002).

Estudos têm mostrado que alguns genes desempenham papel importante na regulação da apoptose. O *B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X* (*Bax*) e o *B-cell Lymphoma Protein 2* (*BCL-2*) são observados como alguns deles.

Pelo menos 15 membros da família do gene BCL-2 foram identificados em mamíferos e categorizados em 2 sub-grupos, o anti-apoptótico (BCL-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1, Mcl-1) e o pró-apoptótico (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bin, Bad, Bid e Bcl-xs). Já foi demonstrado que a razão de BCL-2 e Bax é o determinante crítico tanto da sobrevivência quanto da morte celular. Quando o Bax está super-expressado nas células, a apoptose é acelerada. Há relatos em que a expressão da proteína do gene BCL-2 foi significativamente maior do que a expressão da proteína do Bax em ovócitos grau I e embriões de boa qualidade (de 2 a 8 células e blastocistos). Em contraste, a expressão de proteínas do Bax foi muito maior do que a expressão de proteínas do BCL-2 em ovócitos grau IV e embriões degenerados (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002).

Adicionalmente, RIZOS *et al.* (2003) e LECHNIAK (2002) afirmam que a expressão do gene Bax pode representar um usual marcador para qualidade de blastocistos. Isso

implica que a relação de BCL-2 e Bax pode ser usada como indicador da tendência para apoptose ou sobrevivência dos embriões. Foi proposto que a propensão a apoptose é continuamente contrabalanceada nas células por genes que estimulam a sobrevivência e proliferação celulares. Sob indução de estímulo apropriado, a célula ativa ou interrompe a repressão de produtos gênicos responsáveis pelo controle do mecanismo de apoptose.

Em termos de criotolerância, blastocistos produzidos *in vivo* – os cultivados *in vivo* de D2 em diante ou até D6, tiveram taxas de sobrevivência mais altas do que os embriões que passaram um período mais longo em SOF, que apresentaram taxas de sobrevivência inferiores. Estas observações são baseadas nas mudanças de abundância relativa de Bax transcritos, dentre outros genes avaliados – apontadas por LONERGAN *et al.* (2006).

RIZOS *et al.* (2002-b) observaram que a expressão do gene Bax foi maior nos embriões produzidos *in vitro* (meio SOF) quando comparada com a expressão em outros meios de cultivo e com embriões produzidos *in vivo*. RUBIO POMAR *et al.* (2005) detectaram baixos níveis de apoptose em ambos os blastocistos produzidos *in vivo* e *in vitro* em todas as espécies (como humanos, ratos, bovinos, eqüinos, ovinos e suínos). Em geral, todos os blastocistos examinados exibiram baixa incidência de apoptose provavelmente devido ao fato de que apenas blastocistos de alta qualidade morfológica foram usados neste experimento.

- **Gene ligado ao *Estresse Oxidativo* – MnSOD**

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia do desenvolvimento do embrião de má qualidade, defeituoso (RIZOS *et al.*, 2002-b). A presença de radicais livres está relacionada à interrupção do desenvolvimento embrionário e morte celular. A produção desses radicais é um processo fisiológico que ocorre dentro da célula e tem efeitos pronunciados no DNA, RNA e na síntese de proteínas, além de alterar a membrana celular, aumentar o pH intracelular e interferir na função mitocondrial. Dentre os numerosos agentes antioxidantes a enzima *Manganês Superóxido Desmutase* (Mn-SOD) desempenha um papel importante removendo o O<sub>2</sub> e protegendo a célula contra o estresse oxidativo (WRENZYCKI *et al.*, 2001).

Embriões adquirem mecanismos de proteção quando são submetidos a algum tipo de estresse, e esta aquisição de tolerância a fatores ambientais de estresse pode ser devido à aquisição de proteção bioquímica ou simplesmente devido ao aumento no número de células (EDWARDS *et al.*, 2001).

Com relação à aquisição de proteção bioquímica, várias enzimas antioxidantes protegem embriões contra dano peroxidativo, dentre elas, a Mn-SOD. A enzima Mn-SOD está localizada na mitocôndria e têm ação de detoxificação de espécies oxigênio reativas (ROS) – (RIZOS *et al.*, 2002-b). O efeito do estresse oxidativo na produção de embriões vai depender da sua intensidade. As conseqüências dos danos oxidativos podem ser evidenciadas no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (GUÉRIN *et al.*, 2001).

Os autores ainda associam o acúmulo de radicais superóxido e o declínio da enzima superóxido desmutase (SOD), como estando diretamente ligados ao aumento de apoptoses, pois a SOD tem capacidade de inibir a morte celular. Os processos de congelamento e descongelamento também provocam danos aos embriões, causando redução das concentrações de glutathione (um antioxidante natural produzido pelas células) e da atividade da SOD, tornando-os mais sensíveis às ROS. Vale ressaltar que a produção de ROS ocorre durante o metabolismo normal da célula, no entanto, requer que a ativação do sistema de reparo ao estresse oxidativo entre em ação tão logo ocorram danos às células.

Ovócitos e embriões podem ser protegidos contra o estresse oxidativo através de métodos alternativos, como a redução da tensão de oxigênio, o co-cultivo com células somáticas, a redução da exposição à luz ou manipulação sob luz filtrada e também pela adição de compostos antioxidante nos meios de cultivo – como enzimas (SOD), metais quelantes (EDTA), compostos tiols ( $\beta$ -mercaptoetanol), proteínas (albumina) e vitaminas (tipo C e E). Deve-se, no entanto, ter cautela ao administrar esses suplementos ao meio de cultivo para não se tornarem prejudiciais. É necessário manter um equilíbrio antioxidante e pró-oxidante nas células (GUÉRIN *et al.*, 2001)

- **Genes ligados ao Estresse de Temperatura – HSP-70 e CIRP-b**

O estresse térmico estimula um complexo programa de expressão e respostas bioquímicas adaptativas na célula. Estas respostas ao estresse celular são de grande interesse, pois, biologicamente, a habilidade em sobreviver e se adaptar ao estresse térmico parece ser um requisito fundamental na vida celular. Todavia, existem diferentes caminhos químicos ativados por diferentes estressores, como a morte (sobrevivência e adaptação vs. apoptose) de células expostas seqüencialmente a diferentes tipos de estresse – parece depender criticamente da seqüência em que esses fatores são aplicados (SONNA *et al.*, 2002).

Reações enzimáticas, difusão e transporte de membrana são fatores que podem ser acelerados ou reduzidos com o estresse ao *calor* ou *frio*, respectivamente. Interessantemente, muitos dos efeitos fisiológicos que ocorrem na “rede” celular submetidas ao estresse, são semelhantes tanto para o calor quanto para o frio. Isto inclui: 1) desagregação e desnaturação de proteínas; 2) inibição do progresso do ciclo celular; 3) inibição dos processos de transcrição e tradução, e, conseqüentemente, síntese de material genético; 4) fragmentação de componentes do citoesqueleto; 5) alterações na permeabilidade da membrana, levando a desbalanços iônicos. Outros efeitos, por sua vez, são específicos ao fator estressante (SONNA *et al.*, 2002).

As *Heat Shock Proteins* (HSPs) foram originalmente identificadas como proteínas, cuja expressão foi marcadamente aumentada pelo calor. São, tradicionalmente, classificadas pelo peso molecular. Diversas HSPs são expressas em células não submetidas ao estresse e desempenham funções importantes na fisiologia celular normal. Apesar da intensidade e duração do estímulo do calor necessário para induzir a expressão das HSPs variar consideravelmente entre os tecidos celulares, pode-se notar que uma exposição típica *in vitro* que envolve o aquecimento de células mamíferas a 42-45°C por 20 a 60 minutos, revertendo-os depois para temperatura de manutenção (37-39°C), já promove alteração. A indução da expressão das HSPs inicia poucos minutos após o princípio do estresse térmico, podendo seu pico de expressão ocorrer até diversas horas depois do procedimento (citado por SONNA *et al.*, 2002).

Como proteínas, as HSPs possuem três funções principais: (i) atividade de *chaperona*; (ii) regulação do estado oxidativo da célula e (iii) regulação protéica. Focando na função de

*chaperona*, os mesmos pesquisadores relatam que com esta função, a HSP ajuda evitar agregação de proteínas desnaturadas e auxiliam no retorno dessas proteínas à sua forma nativa. Mesmo em células não estressadas, algumas das HSPs *chaperonas* desempenham função durante a síntese protéica. Adicionalmente, suas capacidades em estabilizar proteínas de conformação específica são usadas por vários processos de regulação celular normais, tais como controle do ciclo celular, processamento de receptores para esteróides e vitamina D, apresentação de antígenos pelas células imunes. As *chaperonas* mais comuns são membros das famílias das proteínas HSP-40, HSP-60, HSP-70 e HSP-90.

As *Cold Shock Proteins* (CSPs) podem ser definidas como proteínas que são induzidas durante o período de exposição à *hipotermia* moderada. Sob esta definição, a CSP melhor caracterizada atualmente é a CIRP (Cold Inducible RNA-binding Protein) – que é a proteína mediadora na região promotora de indução ao frio no RNA. É um dos mecanismos que promovem alteração na expressão de genes de mamíferos durante um período de exposição hipotérmico. A expressão da CIRP pode ser aumentada por vários fatores; além do frio, radiação ultravioleta e hipóxia. Num relato com células de cultivo, a CIRP foi induzida dentro de 3 horas após redução da temperatura ambiente para 32°C, atingindo expressão máxima entre 6 e 24 horas de exposição. A CIRP tem sido identificada em camundongos, ratos e humanos (citado por SONNA *et al.*, 2002).

Uma das funções fisiológicas, mencionadas pelos autores, é proteger e restaurar conformações nativas de RNA durante o estresse. Outros papéis funcionais são: atuação no controle do ciclo celular – como supressor da mitose, e manutenção da diferenciação celular – como molécula.

A resposta na expressão de genes em exposição ao frio é robusta e difere de forma significativa das vias de resposta ao calor. Tem-se como exemplo a expressão de CSPs induzidas pelo frio, mas não pelo calor, e a seqüência temporal da expressão das HSPs induzidas pelo frio, que ocorre não durante o período de estresse térmico (como acontece durante a exposição ao calor), mas após o retorno às temperaturas normais (SONNA *et al.*, 2002).

As condições *in vitro* têm efeitos profundos nas expressões padrão de uma série de genes transcritos em embriões bovinos. O estudo de OLIVEIRA *et al.* (2006) mostrou que

diferentes fontes de proteína não necessariamente afetam a relativa abundância de HSP-70.1 [e Glut-1], indicando que os suplementos protéicos podem não ser o fator crítico contribuindo para a variação no conteúdo de RNAm entre os embriões derivados *in vivo* ou *in vitro*. As HSPs podem também ser afetadas por condições de cultivo inadequadas, sendo sua expressão facilmente induzida por uma variedade de agentes, incluindo aminoácidos análogos, calor, hormônios esteróides e outros.

Outros estudos, usando HSP-70 exógena, mostraram que ela pode atuar como citocina pró-inflamatória quando liberada por células injuriadas ou quando secretada por células imunes ativadas (SONNA *et al.*, 2002).

Até o momento, ~100 genes estudados têm sido relacionados ao estresse pelo calor, e ~20 alistados em relação ao estresse pelo frio. Uma comparação direta dos genes conhecidos alterados pelas duas formas de estresse térmico revela similaridades e diferenças críticas entre eles. No entanto, mudança no padrão genético representa apenas uma parte de toda a resposta ao estresse térmico (SONNA, *et al.*, 2002).

- **Gene ligado ao *Metabolismo de Lipídeos* – ACAT-2**

O colesterol existe em duas formas principais nos vertebrados: como um éster livre e como um éster de colesterol, no qual o esterol é covalentemente ligado à cadeia de ácido graxo longa. O colesterol livre é encontrado principalmente em células de membranas, onde modula a fluidez e a permeabilidade. Quando o conteúdo de colesterol das membranas torna-se excessivo, ésteres de colesterol são sintetizados. Estes lipídeos neutros são muito pouco solúveis na membrana. A síntese de ésteres de colesterol é catalisada pela esterificação de enzimas. Estas enzimas incluem a Lecitina Colesterol Acyl-Transferase (LCAT), que atua no plasma – primariamente em lipoproteínas de alta densidade (HDLs), e a Acyl-Coenzima A Colesterol Acyl-Transferase (ACAT), que atua intracelularmente (SEO *et al.*, 2001).

Ácidos graxos livres (FAFs) são convertidos em acyl-CoA graxo dentro das células e usados para a reação da ACAT e outros processos lipogênicos. Contudo, não se sabe onde/como as FAFs influenciam a regulação da ACAT (SEO *et al.*, 2001).

O grupo das ACAT possui duas proteínas mais comumente estudadas: a ACAT-1 e ACAT-2. Ambas usam dois substratos lipofílicos, o colesterol e a acetil-CoA, durante a reação de esterificação. As enzimas ACAT estão localizadas na membrana do retículo endoplasmático. Enquanto a expressão da ACAT-1 é ubíqua, a ACAT-2 está localizada apenas nos enterócitos, hepatócitos e macrófagos ativos (LIN *et al.*, 2003 e SEO *et al.*, 2001). As duas enzimas ACAT são altamente homólogas na seqüência de aminoácidos, mas não possuem a mesma estrutura *intron-exon*, sugerindo que houve divergência bem no início da sua diferenciação. Elas são estruturalmente diferentes e desempenham funções intracelulares distintas. Contudo, estudos têm mostrado que iso-enzimas podem complementar uma à outra funcionalmente (DAS, DAVIS & RUDEL, 2008).

LIN *et al.* (2003) afirmam que a ACAT-1 possui um papel crítico na formação de macrófagos de células adiposas, enquanto a ACAT-2 deve desempenhar importante função no processo de absorção do colesterol. As exatas funções fisiológicas dessas proteínas em vários tipos celulares estão sob ativas investigações. A disposição na membrana permite ambas as proteínas produzirem ésteres de colesterol dentro da bicamada lipídica e desempenha papel duplo: produzir ésteres de colesterol que podem mover-se do citoplasma como gotas lipídicas e/ou para o lúmen das membranas internas e participar nos processos conjuntos de lipoproteínas.

O éster de colesterol, derivado da ACAT-2, pode ser armazenado em gotas de lipídeos neutras no citosol, secretado na bile ou incorporado a lipoproteínas (apolipoproteínas B) - (SEO *et al.*, 2001, KUSHWAHA *et al.*, 2005 e TEMEL *et al.*, 2007), contidas nas células de secreção como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs). A ACAT-2 é regulada mediante a disponibilidade de substratos de gordura no conteúdo celular, e suas quantidades/atividade afetam dramaticamente a disposição de lipoproteínas na célula. Os resultados dos estudos apresentados por TEMEL *et al.* (2007), mostram que mesmo sob condições de excesso lipídico, a redução na expressão de ACAT-2 pode reduzir o conteúdo de éster de colesterol, e então o potencial aterogênico de novas lipoproteínas secretadas.

Tem sido muito focado como um alvo ideal para o desenvolvimento de novas drogas contra a aterosclerose, a inibição do ACAT, exceto o inibidor seletivo do ACAT-2. Por isso, o efeito da inibição do ACAT-2 permanece obscuro; todavia, dados oriundos de

estudos com camundongos isentos da expressão deste gene, indicam que esta inibição pode não causar efeitos indesejados (MATSUDA *et al.*, 2008).

- **Gene ligado ao Transporte de Fosfolípeos – ATP8A1**

Os lipídeos são distribuídos não aleatoriamente nas membranas biológica através de bicamadas. As *aminas* contendo fosfolípeos, fosfatidiletanolamine e fosfatidilserine, são tiradas no lado citoplasmático da membrana, enquanto o conteúdo fosfolípídico de *colinas*, fosfatidilcolina e esfingomielina, é encontrado na face oposta da membrana. Esta distribuição é mantida pela ação de diversos sistemas de transporte lipídicos, dentre os quais: *flipases* – que catalisam a energia dependente de transportadores de fosfolípeos citoplasmáticos diretos, e *flopases* – que catalisam energia dependente do efluxo de fosfolípeos. A distribuição assimétrica da bicamada de fosfolípeos na membrana plasmática e vesículas secretórias de mamíferos é mantida, em parte, por um transportador ATP-dependente (PATERSON *et al.*, 2006).

Não há um entendimento completo do mecanismo de assimetria de membrana e translocação fosfolípídica, mas uma das enzimas que é fundamental nestes processos tem sido identificada como *amino-fosfolípideo translocase*. Esta atividade catalisa uma energia dependente da translocação de amino-fosfolípeos que necessitam de íons Magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e ATP. A proteína primária, candidata a esta atividade, é a ATPase-II, dependente de fosfatidilserine (DING *et al.*, 2000). As flipases de amino-fosfolípeos transportam fosfatidilserine para o citosol e são aversas ao vanadato, íons Cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e modificações por reagente sulfidril. Apesar da flipase não ter sido identificada positivamente, uma subfamília do tipo –P das ATPases tem sido proposta na atuação de transporte de lipídeos. Enquanto a atividade de flipase da fosfatidilserine tem sido bem caracterizada em vários tipos celulares, a(s) proteína(s) responsável(is) é(são) desconhecida(s). As características bioquímicas das preferências de transporte e substrato da fosfatidilserine têm sido utilizadas para identificar enzimas candidatas. Uma dessas proteínas, a ATP8A1 de grânulos chromaffin bovino (ATPase-II), foi purificada e classificada como dependente da atividade de fosfatidilserine ATPase (PATERSON *et al.*, 2006 e SOUPENE & KUYPERS, 2006).

Esta ATPase possui uma massa molecular de cerca de 116 kDa e tem sido isolada e purificada de diversas fontes, incluindo as vesículas chromaffin e eritrócitos da membrana plasmática. Esta enzima é uma ATPase tipo –P com características muito semelhantes às de atividade de translocação de amino-fosfolipídeos. Comparações de dados da seqüência de ATPase-II de células chromaffin de bovinos, músculos de camundongos e tecidos humano indicam que esta enzima contém 10 domínios de membrana e diversos consensos nas seqüências de ATPase tipo –P (citado por DING *et al.*, 2000).

O transporte de amino-fosfolipídeos possui um importante papel fisiológico na manutenção da assimetria da membrana fosfolipídica. Enquanto os diferentes tipos de ATPase-II dividem propriedades fundamentais, tais como especificidade de substrato, espectro de inibição e dependência fosfolipídica, divergem em outras características, como a atividade ATPase específica e seletividade fosfolipídica. Além disso, estudos com uma fosfoenzima intermediária da ATPase-II e suas formas recombinantes revelam que a fosfatidilserine é essencial para a defosforilação da enzima intermediária. Sem a fosfatidilserine, a ATPase-II seria acumulada como fosfoenzima na presença de ATP, resultando na interrupção do seu ciclo catalítico (DING *et al.*, 2000).

Os grupos de substrato funcional requeridos para o transporte de amino-fosfolipídeos têm sido bem caracterizados. A flipase prefere a fosfatidilserine à fosfatidiletanolamine, transportando 10 vezes mais rapidamente a primeira do que a segunda, e exibe 34 vezes maior afinidade pela fosfatidilserine. Este resultado indica que, enquanto o grupo carboxil da serine não é necessário para o reconhecimento lipídico, sua ausência resulta em declínio das taxas de transporte (PATERSON *et al.*, 2006).

A ATPase-II de diferentes fontes mamíferas, contudo, é divergente em várias características. A atividade ATPase específica dessas fontes, no momento, é relatada como variando de 0.8 (mmol Pi/min/mg de proteína) a 8.0 para enzimas isoladas de eritrócitos humanos e grânulos de *chromaffin* de bovinos, respectivamente. Estas diferenças podem ser de importância fisiológica no requerimento de processos específicos dos variados tecidos e/ou organelas, nos quais a translocação de amino-fosfolipídeos está envolvida. Além disso, a distribuição variada de amino-fosfolipídeos em distintos compartimentos celulares podem aumentar as diferenças funcionais intrínsecas entre as isoformas de ATPase-II, diferentes co-fatores que são necessários para esta função, ou enzimas inteiramente distintas. A elucidação desses problemas facilitaria o

estudo do sistema de translocação de amino-fosfolipídeos, um sistema enzimático de suma importância, mas ainda não bem compreendido (DING *et al.*, 2000).

O metabolismo dos embriões PIV e *in vivo* tem taxas semelhantes quanto à produção de ATP, metabolismo de glicose, regulação e utilização do piruvato. Entretanto considerando à ligeira diminuição no número de células em embriões PIV, diferenças significantes são notadas no nível celular (LECHNIAK, 2002).

Mais pesquisas básicas são necessárias nos mecanismos moleculares enfatizando a reprogramação genética durante o desenvolvimento embrionário inicial, bem como estudos detalhados na composição e interações do meio de cultivo. O fato de que a expressão de RNAm é apenas o primeiro passo na atividade genômica e de que proteína finalmente define o fenótipo precisa também ser levado em consideração (WRENZYCHI *et al.*, 2004).

O desafio para o futuro é usar este conhecimento para estabelecer condições de cultivo que levam em consideração as mudanças necessárias para o desenvolvimento embrionário e permitam que os genes presentes sejam expressos de uma maneira similar à que são expressos *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2006) produzindo embriões de melhor qualidade *in vitro* (RIZOS *et al.*, 2002-a, -b).

### **3. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo visou avaliar o efeito do SFB e da BSA-faf nos meios durante o cultivo de embriões, na melhoria da quantidade e qualidade de embriões PIV em bovinos.

#### **3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a criotolerância dos embriões produzidos com SFB e/ou BSA-faf, submetidos ao processo de vitrificação, quanto a re-expansão e eclosão dos mesmos.
- Avaliar a expressão de genes nos embriões produzidos com SFB e/ou BSA-faf.

### **4. HIPÓTESE**

A produção *in vitro* de embriões bovinos na ausência de Soro Fetal Bovino (SFB) proporciona embriões com melhor qualidade e maior resistência a criopreservação, devido ao menor acúmulo de lipídeos em sua formação.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 – Produção *in vitro* de embriões

#### 5.1.1 – Recuperação dos ovócitos

Os ovários foram coletados em abatedouros locais, de vacas sem raça definida, distantes aproximadamente de 50 a 60 km do laboratório, transportados em solução salina 0,9% (NaCl – Merck®) suplementada com estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100 µg/ml), à temperatura de 35-36 °C. O tempo de recuperação dos ovócitos foi de aproximadamente 6-8h, após o início do abate dos animais.

No laboratório, folículos de 2 a 8 mm foram puncionados com auxílio de um sistema a vácuo, com pressão regulada para obter um volume médio de 12-15 ml/min, com agulhas de calibre 18 G, acopladas em tubo de centrífuga de 15ml. O líquido folicular aspirado foi mantido em banho-Maria (36 °C) até a sedimentação das células e formação de um *pellet*. Os tubos, então, foram levados para o fluxo laminar e o *pellet* retirado com pipeta Pasteur e espalhado em placa de Petri 100 X 20 mm, contendo meio TCM 199 com sais de Hank's (Gibco BRL®) suplementado com SFB e antibióticos, para rastreamento dos CCOs. Os CCOs foram então colocados em outra placa com a mesma solução que permaneceu sobre placa aquecedora a 36°C até a seleção das estruturas. Os CCOs foram rastreados e selecionados sob estereomicroscópio (Stemi SV – 6 – ZEISS®).

Apenas os ovócitos de qualidade I e II foram selecionados para o experimento, segundo a classificação utilizada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram considerados ovócitos de qualidade I os que apresentaram células do *cumulus* compactas e mais de três camadas envolvendo o ovócito, o citoplasma homogêneo com granulações finas, preenchendo o interior da zona pelúcida e coloração amarronzada. Os

ovócitos qualidade II apresentavam células do *cumulus* compactas em volta do ovócito com pelo menos três camadas, citoplasma preenchendo todo o espaço do interior da zona pelúcida e granulações distribuídas heterogeneamente.

Entre o início da aspiração e o início do rastreamento, estabeleceu-se um tempo máximo de 30 minutos e do rastreamento para seleção/maturação, um período de 1 hora.

Os meios utilizados em todas as etapas da PIV dos embriões foram produzidos pela Nutricell® Nutrientes Celulares Ltda (Campinas, São Paulo, Brasil) e testados previamente. As gotas de maturação, fecundação e cultivo tinham volume de 200 µl, foram cobertas com óleo médico de parafina (360 Medical Fluid 350 CST – DOW CORNING®) e incubados a 39 °C, em 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade.

### **5.1.2 – Maturação *in vitro* de ovócitos (MIV)**

A composição do meio de MIV consistiu de TCM 199 com sais de Earl's (Gibco - BRL®) suplementado com 24 UI/ml Hormônio Luteinizante (LH - Sigma®), 10 g/ml de Hormônio Folículo Estimulante (FSH – Sigma®), 1 g/ml de L-glutamina (Sigma®), 100 UI/ml de Amicacina, 50 g/ml de estreptomicina, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Gibco BRL®) ou 8 mg/ml de Albumina Sérica Bovina fração Fatty Acid Free (BSA – FAF, Sigma®).

Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 25-40 por gota de 200 µl de meio de maturação (MIV), divididos em três tratamentos: Tratamento 1: MIV com SFB; Tratamentos 2 e 3: MIV com BSA-faf. De acordo com estes tratamentos, o meio MIV foi suplementado com 10% de SFB (Gibco BRL®) ou 8 mg/ml de BSA-faf (Sigma®) e incubados por 22 horas, segundo as condições descritas na **Tabela 1**.

### **5.1.3 – Fecundação *in vitro* (FIV)**

Após o período de maturação os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µl de meio de fecundação (FEC) FERT-TALP, suplementado com 10 µg/ml de Heparina e PHE – 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina (Sigma®).

Para todo o experimento foi utilizado dose de sêmen testado para PIV, de um mesmo touro e mesma partida, descongeladas em banho-Maria a 36 °C/30 segundos. Motilidade e vigor foram analisados antes e após a seleção espermática, realizada por gradiente de Percoll® 45% e 90% (2 ml de cada gradiente). Realizou-se centrifugação a 700 g/20 minutos à 30 °C; em seguida foi retirado o *pellet* e este ressuspensionado com meio TALP para capacitação (CAP), sendo centrifugado novamente a 700 g/5 minutos, à 30 °C; o *pellet* resultando foi então ressuspensionado com meio FEC para obtenção da dose inseminante. O cálculo da dose inseminante/gota foi ajustado de modo a alcançar concentração final equivalente a  $01 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Ovócitos e espermatozoides foram co-incubados por 18 horas em estufa a 39 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera úmida. Considerou-se o dia da fecundação como D0.

#### **5.1.4 – Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)**

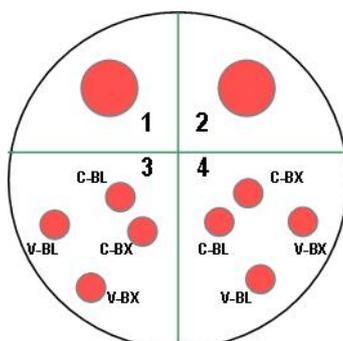
Posteriormente ao período de co-incubação, os possíveis zigotos foram suavemente pipetados para leve desnudamento, e transferidos para gotas de 200 µl do meio de cultivo Fluido Sintético de Oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOFaa) e 0,34mM de sodium tri citrato (Sigma®); 2,77mM de myo-inositol (Sigma®) e 5% de SFB ou 8 mg/ml de BSA-faf, de acordo com os diferentes tratamentos.

Os tratamentos nesta etapa foram: Tratamento 1: SOF+SFB, por todo o período de CIV; Tratamento 2: SOF+BSA-faf, por todo o período de CIV; Tratamento 3: SOF+BSA-faf+SFB – SOF com BSA-faf até completar 96h *pi* (CIV inicial) e então transferidos para SOF com SFB (CIV final) – **Tabela 1**.

Todos os embriões foram mantidos na mesma condição de temperatura, umidade e atmosfera gasosa por todo o período de cultivo, avaliados em D2 (48h *pi*) quanto à clivagem e em D6,5 (156h *pi*), D7,5 (180h *pi*) e D8,5 (204h *pi*) observados para taxa de desenvolvimento de blastocisto e taxa de eclosão.

De D1 a D6,5 e/ou D7,5, gotas de 200 µl cobertas com óleo foram utilizadas para o CIV de todas as estruturas. Em D6,5 e D7,5, os embriões BL e BX, foram removidos das gotas iniciais e divididos proporcionalmente (máximo de 10 embriões/gota) em gotas de

50µl do mesmo meio CIV (**Figura 1**), preparadas com co-cultivo das células de CCOs removidas na pipetagem dos zigotos após a etapa FIV.



**Figura 1:** Esquema das gotas na placa de CIV. **C**=Controle; **V**=Vitrificados; **BL**=Blastocisto; **BX**=Blastocisto Expandido. Quadrantes **1 e 2** – Gotas de cultivo embrionário inicial (D1 a D6,5 ou D7,5); quadrante **3** – gotas de cultivo dividindo os embriões nos estágios BL e BX, nos grupos C e V, em D6,5; quadrante **4** – gotas de cultivo dividindo os embriões nos estágios BL e BX, nos grupos C e V, em D7,5.

**Tabela 1:** Suplementação protéica usada na PIV de embriões nos tratamentos do experimento realizado.

<b>PIV</b>	<b>Suplementação Protéica</b>		
	<b>MIV</b> (por 22h)	<b>CIV Inicial</b> (até 96h <i>pi</i> )	<b>CIV final</b> (até 228h <i>pi</i> )
<b>T1</b>	10% SFB	5% SFB	5% SFB
<b>T2</b>	8 mg/ml BSA-faf	8 mg/ml BSA-faf	8 mg/ml BSA-faf
<b>T3</b>	8 mg/ml BSA-faf	8 mg/ml BSA-faf	5% SFB

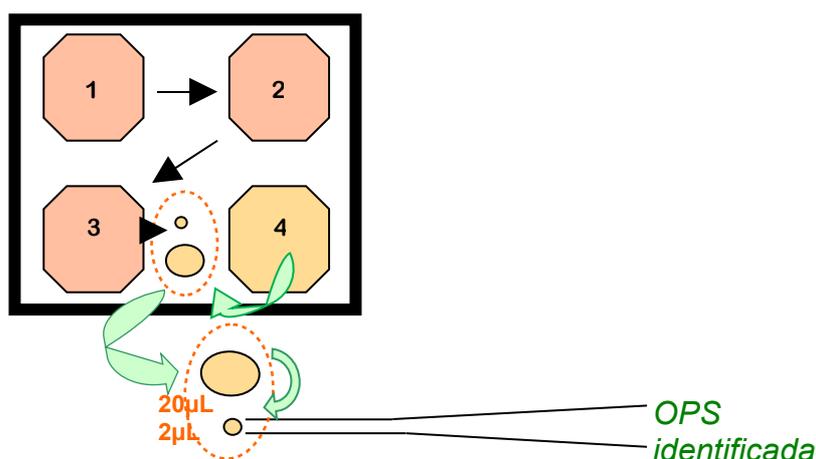
## 5.2 – Criopreservação dos embriões

Em cada um dos tratamentos (T1, T2, T3), em D6,5 (156h *pi*) e D7,5 (180h *pi*) todos os blastocistos (BL com blastocele > 60%) e blastocistos expandidos (BX) classificados como grau I e II, segundo as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, foram retirados da gota de CIV inicial e divididos por estágio de desenvolvimento em gotas menores (**Figura 1**). Nestas, 50% dos embriões de ambos os estágios foram mantidos como grupo controle e os outros 50% submetidos à criopreservação por vitrificação, pelo método OPS (Open Pulled Straw), segundo metodologia descrita por Vajta *et al.*, 1999.

As soluções utilizadas no processo de vitrificação foram: meio holding – HM (TCM 199 com sais de Hank`s [Gibco BRL®] suplementado com 20% de SFB), meio sucrose – SM (TCM 199 com sais de Hank`s [Gibco BRL®] com 0,5 M de sucrose [Sigma®] suplementado com 20% de SFB), etilenoglicol – EG (100%, Merck®) e dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma®).

Usando uma placa de quatro poços sobre placa aquecedora (41 °C, para manter o meio no interior do poço a 39 °C), os embriões a serem vitrificados foram colocados no *poço 1* contendo HM, onde receberam um banho para lavagem, depois passados para o *poço 2* com mesma solução, onde permaneceram até o momento do procedimento. Grupos de no máximo 4 embriões foram vitrificados por OPS, sendo inicialmente expostos à solução do *poço 3* (800 µl HM + 100 µl EG + 100 µl DMSO) por 1 minuto e então transferidos para a gota de 20 µl da solução do *poço 4* (600 µl SM + 200 µl EG + 200 µl DMSO), e imediatamente transferidos para a nova gota de 2 µl da mesma solução, permanecendo nesta por 20 segundos, quando então era encostada a ponta da OPS nesta última gota de forma a puxar os embriões e a solução por capilaridade. Em seguida mergulhou-se a OPS em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) - (**Figura 2**).

Os embriões foram mantidos em N<sub>2</sub>L por um período mínimo de 30 minutos e máximo de 2 horas, quando então foram desvitrificados.



**Figura 2:** Esquema da seqüência dos banhos dados nos embriões no processo de vitrificação pelo método OPS (Vajta *et al.*, 1999), neste experimento.

**Poço 1**(800µl HM):  
Imediato;  
**Poço 2** (800µl HM):  
Imediato;  
**Poço 3** (800µl HM, 100µl EG, 100µl DMSO):  
1 minuto;  
**Poço 4** (600µl SM, 200µl EG, 200µl DMSO):  
20 segundos.

Para o processo de desvitrificação, usou-se também uma placa de quatro poços sobre placa aquecedora (41°C). As OPS foram retiradas do N<sub>2</sub>L, uma a uma, e a ponta contendo os embriões mergulhada na solução do *poço 1* (800 µl HM + 400 µl SM), para remoção do excesso da solução de vitrificação e em seguida, transferiu-se os embriões para o *poço 2* – contendo a mesma solução, permanecendo por 5 minutos. Depois, passaram pela solução do *poço 3* (800 µl HM + 200 µl SM) por outros 5 minutos e, por fim, transferidos para o *poço 4*, contendo 800 µl HM, onde permaneceram até o momento de retorno ao meio de CIV original.

### 5.3 – Cultivo pós-criopreservação

Após a desvitrificação, as estruturas foram levadas novamente para cultivo nas gotas de 50 µl, conforme já mencionado, no intuito de avaliar a capacidade de re-expansão e eclosão em 24h, 48h e 72h após terem sido submetidos ao processo de vitrificação.

Todo blastocisto eclodido (BE) observado nos momentos designados para avaliação (D6,5 - 156h *pi*, D7,5 - 180h *pi*, D8,5 - 204h *pi* e D9,5 - 228h *pi*) foi lavado em 2 µl de PBS modificado, e estocado a -80 °C para avaliação da expressão de genes.

### 5.4 – Avaliação da expressão gênica

Os embriões eclodidos (BE), dos *grupos Controle* de cada tratamento, foram retirados do CIV para avaliação da expressão de alguns genes, pelo método RT-PCR semi-quantitativo. Quatro *pools* de 09 (nove) embriões em D8,5 (204h *pi*) de cada tratamento foram formados para esta análise.

Os genes selecionados para análise foram: *Actina* e *GAPDH* como constitutivos, os genes *Bax*, *BCL-2* – relacionados à qualidade embrionária, o *MnSOD*, envolvido com o estresse oxidativo, o *HSP-70* e o *CIRP-b* ligados ao estresse térmico, o *ACAT-2* para metabolismo de lipídeos e o *ATP8A1* relacionado ao transporte de fosfolipase. As seqüências dos *primers* utilizados estão apresentadas na **Tabela 2**.

### Extração do RNA

Para extração do RNA total foi utilizado *Trizol Reagent* (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante, com pequenas modificações. O material foi descongelado à temperatura ambiente por 5 minutos; após a formação dos *pools* de embriões por tratamento, adicionou-se quantidade suficiente para (qsp) 50 µl de *Trizol Reagent* e 0,65 µl de glicogênio – 20 µg/µL (Invitrogen™), agitaram-se os micro-tubos por 5 segundos no vórtex; em seguida, acrescentou-se 10 µl de clorofórmio, retornando a agitar no vórtex por 15 segundos e após isso, repousando o material por 2 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi centrifugado a 12.000 G/15 minutos à 4 °C, para separação do mesmo. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, em que foi adicionado 50 µl de Isopropanol gelado, permanecendo à -20 °C *overnight*, a fim de precipitar o RNA. Após esse período, o material foi retirado do *freezer* e centrifugado (13.000 G/10 minutos/4 °C). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µl de etanol 75%, voltando a centrifugação refrigerada novamente (7.000 G/7 minutos). Removeu-se do mesmo modo o sobrenadante, deixando o tubo aberto, com a tampa voltada para baixo em cima de um papel absorvente, por 10 minutos, para o *pellet* secar. Ao final desse período, ressuspendeu-se o *pellet* em 8 µl de água DEPC e aqueceu-se o tubo por 10 minutos à 55 °C, para dissolução completa do *pellet*.

### Tratamento com DNase

Para obtenção do volume final de RNA com 10 µl, adicionou-se 2 µl de tampão da DNase a 0,5 UI/µl (concentração final de 1 UI/µl). Os tubos foram aquecidos à 37 °C por 30 minutos, em seguida colocados em gelo novamente e posteriormente adicionado 1 µl de *stop solution* (para parar a reação da enzima) e novamente aquecido à 65 °C por 10 minutos.

### Síntese de cDNA

O volume final de RNA tratado deve ser 13 µl. Nesta etapa, adicionou-se 0.5 µg de Oligo dT e 1 µl de dNTP's (10 mM de cada base nitrogenada), e aqueceu-se a 65 °C por 5 minutos. Depois, foi incubado em gelo por 1 minuto, adicionando então 2 µl de Tampão da RT 5X (Transcriptase Reversa), 2 µl de DTT 0,1 M e 40 UI de RNase Out; em seguida foi aquecido a 42 °C por 2 minutos, adicionando-se então 200 UI da RT (*superscrip III*), e

voltando ao aquecimento no mesmo programa (42 °C) por 50 minutos, indo seqüencialmente a 70 °C por 15 minutos.

Para a PCR, as condições de reação foram as seguintes: tampão da Taq 1X, 0,8 200 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada primer para o CIRP-b e 0,5 µM de cada primer para os demais genes, 1 UI de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen™), 1 mM de MgCl<sub>2</sub> para BCL-2, HSP-70 e CIRP-b, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> para o ATP8A1 e 2 mM de MgCl<sub>2</sub> para os genes Actina, ACAT-2, BAX, GAPDH, MnSOD, 1 µL de cDNA para cada gene. Determinou-se a temperatura de anelamento e a quantidade de ciclos para a fase exponencial da amplificação para cada gene e estes se encontram na **Tabela 2**. Todas as reações utilizaram 94 °C por 4 min para desnaturação inicial seguido de amplificação com 94 °C por 40s, temperatura de anelamento por 40 s, 72 °C por 1min, com extensão final de 5 min a 72 °C no termociclador Mastercycler Eppendorf Gradient e PXE 0,5 Thermo Electron Corporation. O número de ciclos utilizados para cada gene encontra-se na **Tabela 2**.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,8%, corados com Brometo de Etídio a 10 mg/mL e visualizados em fotodocumentador.

A quantificação relativa dos transcritos foi determinada por densitometria pelo programa Image J, versão 1.36b, utilizando os genes Actina e GAPDH como constitutivos.

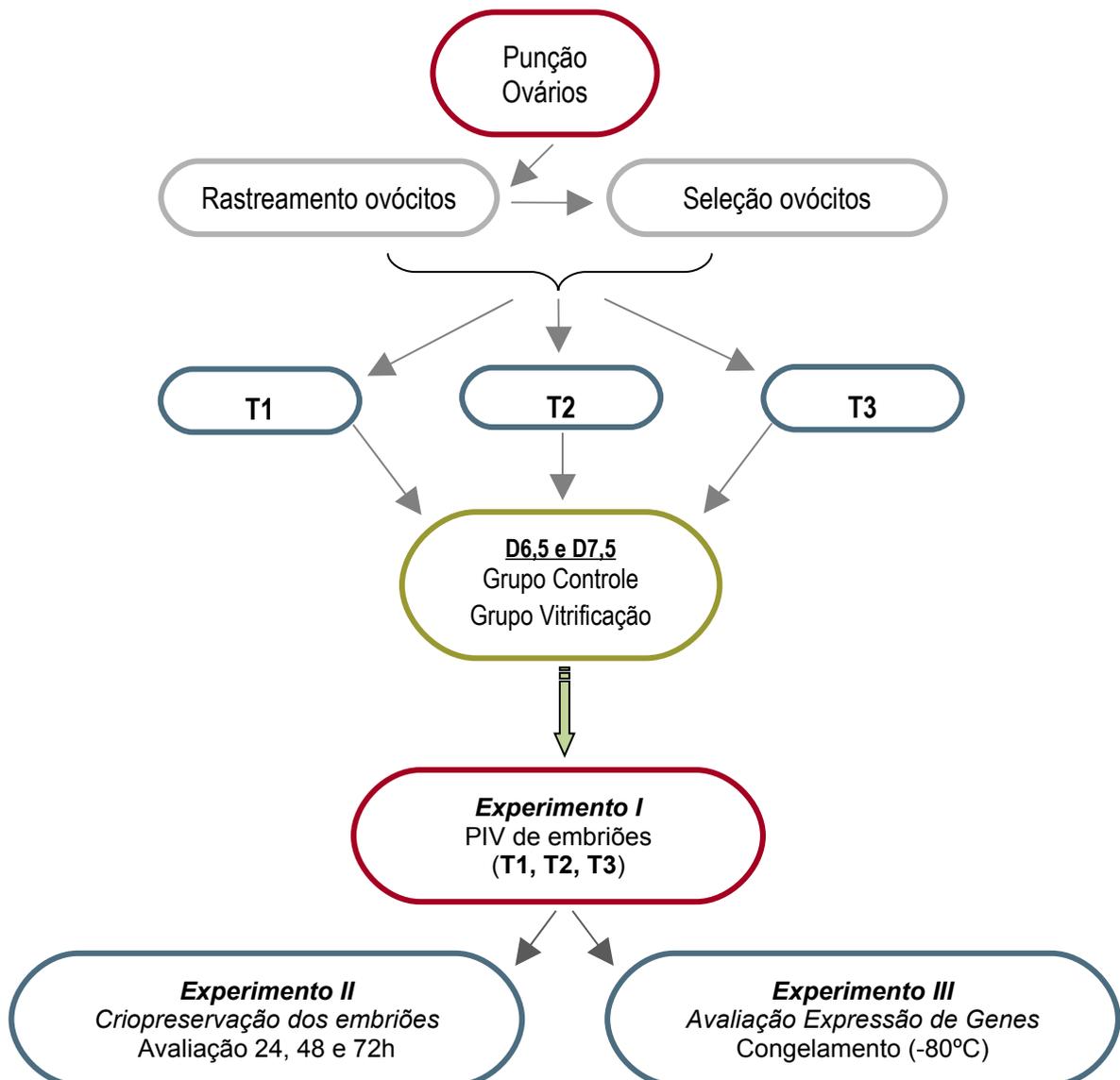
**Tabela 2:** Seqüências e condições de reação dos *primers* utilizados no experimento.

Gene	Primer (5'-3')	Fragmento	Temperatura Anelamento (°C)	Nº ciclos
<b>Actina</b>	F: 5' TATTgCTgCgCTCgTggT 3' R: 5' TCTTCTCACggTTggCCT 3'	344 pb	55	35
<b>GAPDH</b>	F: 5' CCCATCACCATCTTCCAagg 3' R: 5' AgTgAgCTTCCCgTTCAGC 3'	471 pb	57	32
<b>CIRP-b</b>	F: 5' CTggATCCgCTCTCTTTgTC 3' R: 5' CTACTCTgCCTgCCTCAAgC 3'	369 pb	54	40
<b>MnSOD</b>	F: 5' CCCATgAAgCCTTTCTAATCCTg 3' R: 5' TTCAgAggCgCTACTATTTCTTC 3'	307 pb	55	32
<b>ATP8A1</b>	F: 5' ACAgCAATgCCACCCTTAACTC 3' R: 5' TCCAgCTTTCAAgCACACAg 3'	291 pb	56	36
<b>HSP-70</b>	F: 5' CAAgATCACCATCACCAACg 3' R: 5' AAATCACCTCCTggCACTTg 3'	239 pb	56	37
<b>ACAT-2</b>	F: 5' ATCTggCTgTCggATTCTTgT 3' R: 5' TTTCCACCCTCACTTTggTC 3'	233 pb	56	32
<b>Bax</b>	F: 5' TgCAgAggATgATCgCAgCTgTg 3' R: 5' CCAATgTCCAgCCCATCATggTC 3'	198 pb	56	32
<b>BCL-2</b>	F: 5' ATgACTTCTCTCggCgCTA 3' R: 5' TTgACgCTCTCCACACACA 3'	184 pb	50	45

**CIRP-b** = Cold Inducible RNA-binding Protein B; **MnSOD** = Magnésio Superóxido Desmutase; **ATP8A1** = Chromaffin Granule ATPase II; **HSP-70** = Heat Shock Protein 70; **ACAT-2** = Acetyl-Coenzyme-A Acetyltransferase 2; **Bax** = B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X; **BCL-2** = B-cell Lymphoma Protein 2; genes constitutivos: **Actina** e **GAPDH** = Gliceraldehide-3-phosphate dehydrogenase.

## 6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL da PIV

O seguinte organograma foi realizado, por réplica:



**Experimento I: Produção *in vitro* de embriões bovinos com suplementação de diferentes fontes protéicas durante a MIV e o CIV.**

Foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro* 2.171 ovócitos grau I e II, oriundos de 14 manipulações. Em cada réplica, os CCOs foram distribuídos nos três tratamentos propostos (T1, T2 e T3).

Verificou-se em D2 (48h *pi*) a taxa de clivagem e em D6,5 (156h *pi*), D7,5 (180h *pi*) e D8,5 (204h *pi*), a taxa de blastocistos.

**Experimento II: Avaliação da criotolerância dos embriões bovinos produzidos em condições diferentes quanto ao tipo de proteína.**

Os blastocistos (BL com blastocele > 60%) e blastocistos expandidos (BX) classificados como grau I e II em D6,5 e/ou D7,5 foram subdivididos proporcionalmente em dois grupos: o grupo Controle e o grupo Vitrificação, perfazendo um total de 507 embriões.

Após a vitrificação/desvitrificação, as estruturas foram avaliadas às 24, 48 e 72 horas quanto a capacidade de re-expansão e eclosão. Durante os processos de vitrificação e desvitrificação, o grupo Controle foi retirado da estufa, permanecendo em placa aquecedora o mesmo período de tempo em que o grupo Vitrificação foi manipulado.

**Experimento III: Avaliação da expressão gênica em embriões cultivados com diferentes suplementações protéicas.**

Nos embriões de cada tratamento foi avaliada a expressão dos genes Magnésio Superóxido Desmutase (MnSOD), B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X (Bax), B-cell Lymphoma Protein 2 (BCL-2), Heat Shock Protein 70 (HSP-70), Cold Inducible RNA-binding Protein B (CIRP-b), Acetyl-Coenzyme-A Acetyltransferase 2 (ACAT-2) e

Chromaffin Granule ATPase II (ATP8A1). Para normalização dos dados, foram utilizados os genes constitutivos Actina e GAPDH.

A técnica usada para extração do RNA foi do *Trizol Reagent*<sup>®</sup> modificada e na quantificação da expressão dos genes, a técnica do RT-PCR semi-quantitativo.

Para cada tratamento, foram utilizados 04 (quatro) *pools* com 09 (nove) embriões BE de D8,5 (204h *pi*), de réplicas diferentes.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos à taxa de clivagem e produção de blastocistos foram analisados pelo teste Chi-quadrado ( $\chi^2$ ) e os dados relativos à observação de re-expansão e eclosão dos blastocistos vitrificados comparados ao grupo controle, analisados através do Modelo Linear Generalizado (McCULLAGH & NELDER, 1989), segundo a teoria da Razão de Verossimilhança (que generaliza o teste de Chi-quadrado [ $\chi^2$ ]) baseado no método da Quase-verossimilhança (o qual corrige a superdispersão presente nas proporções), utilizando o programa R, versões 2.4.0, 2006 e 2.7.0, 2008. O nível de significância considerado foi de 5%.

Os dados da expressão gênica foram comparados pelo teste *t* de *Student* para dados paramétricos ou teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos, utilizando o programa Prophet (BBN Systems and Technologies), versão 5.0, 1996. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  S.E.M..

## 8. RESULTADOS

No experimento I, foram realizadas 14 repetições, totalizando 2.171 ovócitos distribuídos simultaneamente nos distintos tratamentos, que resumidamente são: T1 – suplementação com SFB; T2 – suplementação com BSA; T3 – suplementação inicial com BSA e final com SFB.

Os dados relativos à PIV de acordo com os tratamentos são apontados na **Tabela 3**. Pode-se observar que a taxa de clivagem foi semelhante ( $P=0.877$ ) entre os tratamentos. Entretanto, o cultivo suplementado apenas com BSA (T2) e o de suplementação inicial com BSA e final com SFB (T3) tiveram efeito na velocidade de desenvolvimento e na quantidade de produção dos embriões, visto que estes dois tratamentos apresentaram menor ( $P<0.001$ ) porcentagem de blastocistos em D6,5 (156h *pi*), D7,5 (180h *pi*), D8,5 (204h *pi*) em relação ao grupo controle (T1) cultivado na presença de SFB.

**Tabela 3:** Avaliação do efeito do tratamento na produção de blastocistos, baseado na clivagem (D2 - 48h *pi*) e na taxa de blastocisto em D6,5 (156h *pi*), D7,5 (180h *pi*), D8,5 (204h *pi*).

Tratamento	N total ovócitos	Clivagem (%)	Blastocitos (%)		
			156h <i>pi</i>	180h <i>pi</i>	204h <i>pi</i>
T1	584	447 (76,54) <sup>a</sup>	193 (33,05) <sup>a</sup>	238 (40,75) <sup>a</sup>	238 (40,75) <sup>a</sup>
T2	806	609 (75,56) <sup>a</sup>	83 (10,30) <sup>b</sup>	169 (20,97) <sup>b</sup>	216 (26,80) <sup>b</sup>
T3	781	589 (75,42) <sup>a</sup>	124 (15,88) <sup>b</sup>	179 (22,92) <sup>b</sup>	181 (23,18) <sup>b</sup>

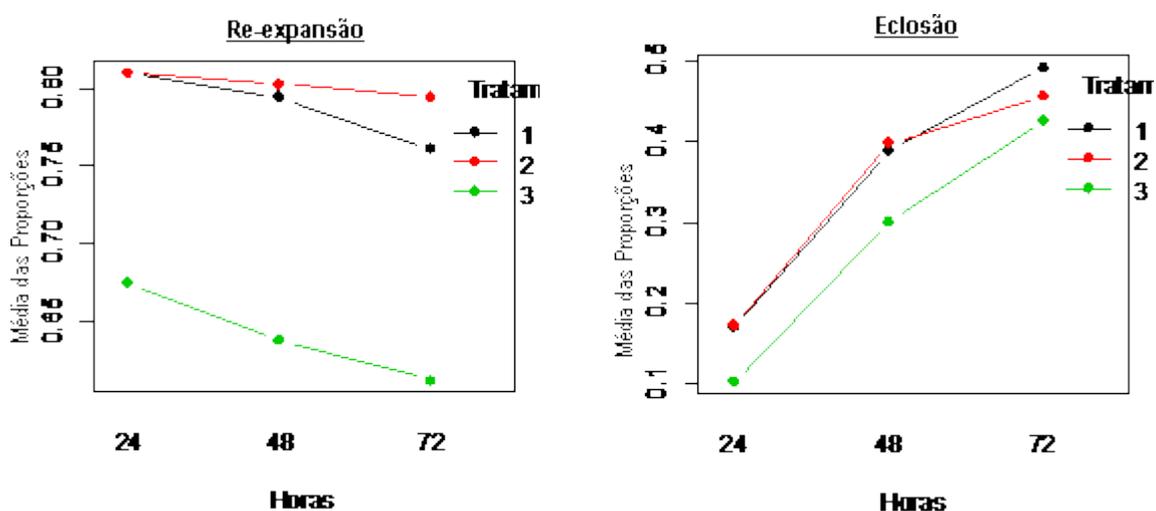
<sup>a, b</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente ( $P<0.001$ ), pelo Modelo Linear Generalizado, assumindo distribuição Binomial e função de ligação Logit.

Como medida de avaliação morfológica, os embriões produzidos em meios suplementados com SFB (T1 e T2) apresentavam coloração mais escura aos produzidos em meio com BSA (T2).

No teste de criotolerância, experimento II, cerca de 50% dos embriões (BL e BX) foi vitrificado pelo método da OPS, descongelado, retornando então para os respectivos CIV, e sendo observados em horários pré-determinados (24, 48 e 72 horas pós-vitrificação), enquanto os demais 50% dos embriões permaneceram como controle, observando e comparando o comportamento nos mesmos períodos.

Para esta análise, foram consideradas re-expansão e eclosão das estruturas analisadas como parâmetro de avaliação, mediante os fatores tratamento (T1 vs. T2 e T3), grupo (C vs. V), estágio embrionário (BL vs. BX), tempo (D6,5 vs. D7,5). Apesar da produção de embriões entre os tratamentos em questão e para qualquer desses fatores, é possível notar que as estruturas de todos os tratamentos tenderam a diminuir a taxa de re-expansão e aumentar a taxa de eclosão ao longo do período de ressalva.

Para tanto, observa-se na **Figura 3** o comportamento geral (média das proporções entre os fatores avaliados) dos embriões frente aos diferentes tratamentos quanto às proporções de re-expansão e eclosão.



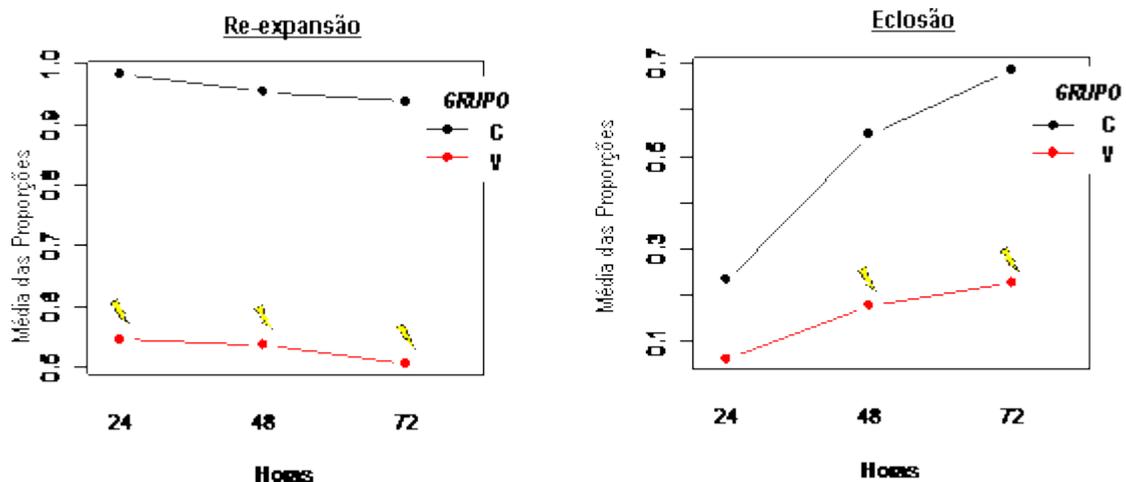
**Figura 3:** Comportamento geral dos embriões PIV, nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3), quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação. Pontos marcados com seta amarela diferem significativamente ( $P < 0.05$ ).

Quanto à re-expansão, T1 e T2 apresentaram pouca variação entre 24-48-72 horas, sem diferença significativa entre si ( $P = 0.384, 0.591, 0.946$  – respectivamente para 24, 48, 72 horas), embora o T2 tenha apresentado um declínio no período final (72h), isto não foi

considerado significativo. No T3, proporcionalmente, essa taxa foi muito inferior aos demais tratamentos, apresentando diferença significativa ( $P < 0.001$ ) em relação ao T1 e T2 (em todos os horários de avaliação).

Já para taxa de eclosão, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0.05$ ). O T2, no período entre 48 e 72 horas tendeu a diminuir e o T3 apresentou taxas inferiores, mas não diferiram do tratamento controle (T1).

Na averiguação do comportamento dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), vê-se na **Figura 4** que houve diferença marcante ( $P < 0.001$ ) entre eles, nos três tratamentos. Para re-expansão, houve diferença em todos os períodos observados. Para eclosão, houve semelhança ( $P > 0.05$ ) entre os tratamentos às 24h, com baixos índices da taxa de eclosão tanto do grupo C como do grupo V. Nos horários subseqüentes, quando aumentaram o número de eclosões, os embriões do grupo C mostraram diferença significativa ( $P < 0.001$ ) superior em relação aos do grupo V.



**Figura 4:** Comportamento geral dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação. Pontos marcados com seta amarela diferem significativamente ( $P < 0.001$ ).

Diante dos dados da **Tabela 4**, vê-se que os grupos C não apresentaram diferença ( $P > 0.05$ ) quando comparados entre si, independente do tratamento. Todavia, no grupo V, a re-expansão do T3 mostrou diferença significativa ( $P < 0.001$ ) com os outros tratamentos, em todos os momentos; para taxa de eclosão, às 24 horas, não houve diferença entre os três tratamentos ( $P > 0.05$ ); mas nos horários subseqüentes T3

novamente diferiu de forma significativa ( $P < 0.001$ ). Os T1 e T2 são semelhantes entre si, tanto no grupo C como no grupo V ( $P > 0.05$ ).

**Tabela 4:** Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V) às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

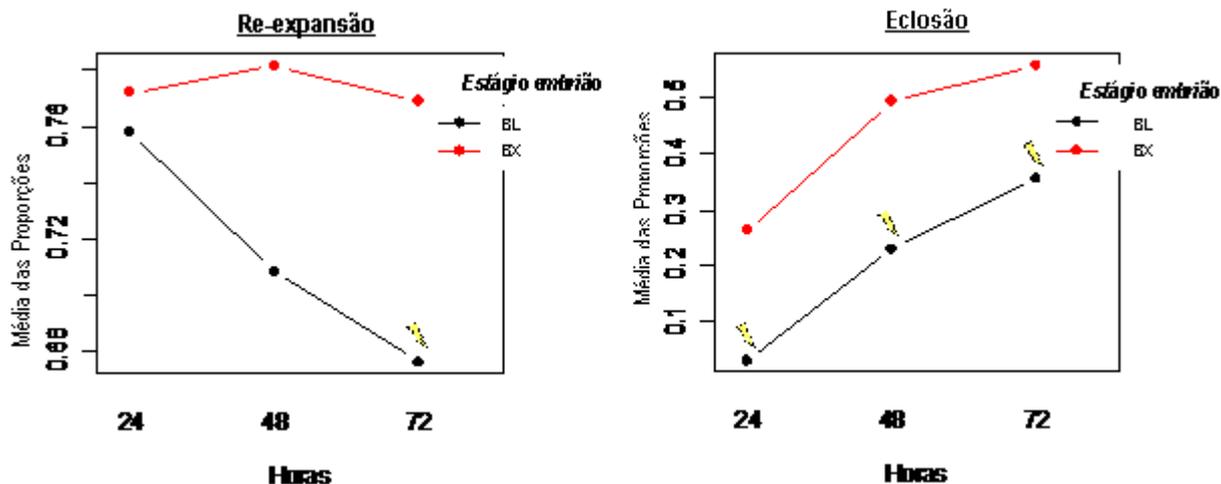
Tratamento	N Total	24h pós-vitrificação (%)		48h pós-vitrificação (%)		72h pós-vitrificação (%)		
		Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	
T1	C	101	99 (98,02) <sup>a</sup>	29 (28,71) <sup>a</sup>	98 (97,03) <sup>a</sup>	63 (62,38) <sup>a</sup>	97 (96,04) <sup>a</sup>	77 (76,24) <sup>a</sup>
	V	102	70 (68,63) <sup>b</sup>	10 (9,80) <sup>b</sup>	68 (66,67) <sup>b</sup>	25 (24,51) <sup>b</sup>	64 (62,75) <sup>b</sup>	33 (32,35) <sup>b</sup>
T2	C	79	79 (100,00) <sup>a</sup>	23 (29,11) <sup>a</sup>	77 (97,47) <sup>a</sup>	45 (56,96) <sup>a</sup>	77 (97,47) <sup>a</sup>	51 (64,56) <sup>a</sup>
	V	78	47 (60,26) <sup>b</sup>	7 (8,97) <sup>b</sup>	48 (61,54) <sup>b</sup>	19 (24,36) <sup>b</sup>	47 (60,26) <sup>b</sup>	22 (28,21) <sup>b</sup>
T3	C	72	70 (97,22) <sup>a</sup>	14 (19,44) <sup>a</sup>	67 (93,06) <sup>a</sup>	38 (52,78) <sup>a</sup>	65 (90,28) <sup>a</sup>	53 (73,61) <sup>a</sup>
	V	75	28 (37,33) <sup>c</sup>	2 (2,67) <sup>b</sup>	27 (36,00) <sup>c</sup>	7 (9,33) <sup>c</sup>	25 (33,33) <sup>c</sup>	10 (13,33) <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente ( $P < 0.001$ ).

Para melhor ponderação da resposta dos tratamentos quanto à criotolerância, avaliaram-se os mesmos parâmetros quanto aos estágios embrionários escolhidos (*BL* e *BX*), intuindo observar a diferença de comportamento dessas duas fases, sob as atuais condições.

Nota-se na **Figura 5** que a re-expansão de embriões *BX* foi superior aos embriões em estágio de *BL* ( $P = 0.039$ ) apenas ao fim do período de observação (às 72 horas), mas não foi significativamente diferente nos períodos anteriores ( $P > 0.05$ ). Em estágio *BL*, o índice de re-expansão diminuiu progressivamente entre 24-48-72 horas da observação; os *BX* aumentaram a re-expansão entre 24 e 48 horas, diminuindo-a entre 48 e 72 horas, mas não de forma significativa ( $P < 0.05$ ) entre si. Quanto à eclosão, os embriões *BX* apontaram maior e significativa taxa ( $P < 0.001$ ) em relação os *BL*, durante todo o intervalo ressaltado.

Os embriões *BL* e *BX* do grupo C não diferiram ( $P > 0.05$ ) entre eles, quanto à taxa de re-expansão, em qualquer dos períodos e/ou tratamentos observados. Entretanto, os embriões *BL* do T2 tiveram taxa superior às de T1 e T3, e os *BX* do T1 re-expandiram mais que os de T2 e T3; os dados de *BL* do T2 e *BX* do T1, não diferem entre si ( $P > 0.05$ ) – (**Tabela 5**).



**Figura 5:** Comportamento geral dos estágios dos embriões submetidos ao processo de criopreservação. Avaliação quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação. Pontos marcados com seta amarela diferem significativamente (considerando  $P < 0.05$  para re-expansão e  $P < 0.001$  para eclosão).

**Tabela 5:** Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões BL e BX, dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

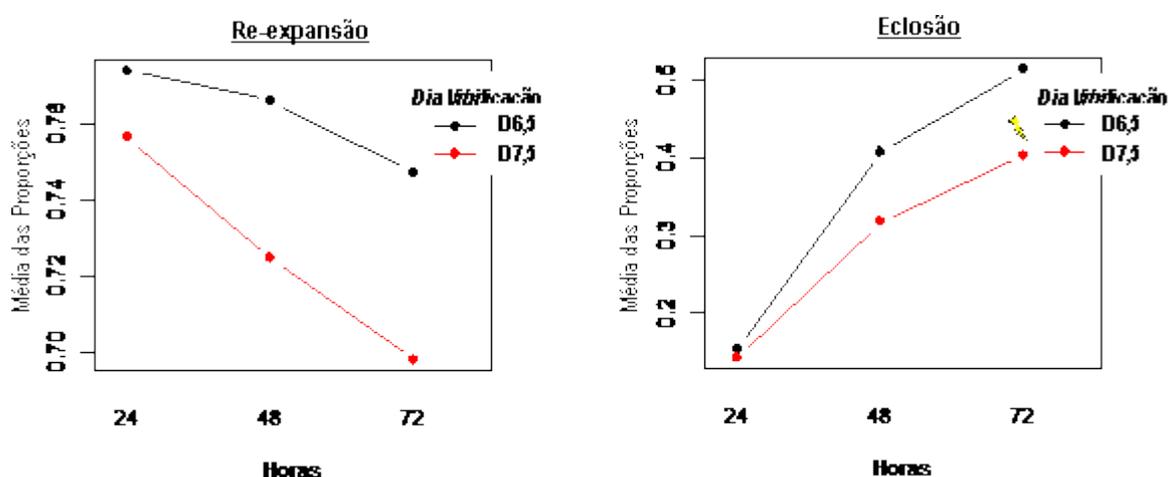
Estágio	Tratamento	N Total	24h pós-vitrificação (%)		48h pós-vitrificação (%)		72h pós-vitrificação (%)		
			Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	
<b>(BL) Blastocisto</b>	T1	C	38	38 (100,00) <sup>a</sup>	3 (7,89) <sup>c</sup>	37 (97,37) <sup>a</sup>	17 (44,74) <sup>c</sup>	36 (94,74) <sup>a</sup>	24 (63,16) <sup>e</sup>
		V	21	21 (53,85) <sup>b</sup>	0 (0,00) <sup>c</sup>	20 (51,28) <sup>b</sup>	0 (0,00) <sup>d</sup>	17 (43,59) <sup>b</sup>	5 (12,82) <sup>d</sup>
	T2	C	32	32 (100,00) <sup>a</sup>	2 (6,25) <sup>c</sup>	30 (93,75) <sup>a</sup>	12 (37,50) <sup>c</sup>	31 (96,88) <sup>a</sup>	16 (50,00) <sup>e</sup>
		V	23	23 (71,88) <sup>c</sup>	0 (0,00) <sup>c</sup>	23 (71,88) <sup>c</sup>	8 (25,00) <sup>c</sup>	22 (68,75) <sup>c</sup>	9 (28,13) <sup>c</sup>
	T3	C	32	32 (94,12) <sup>a</sup>	1 (2,94) <sup>c</sup>	29 (85,29) <sup>a</sup>	11 (32,35) <sup>c</sup>	28 (82,35) <sup>a</sup>	20 (58,82) <sup>e</sup>
		V	13	13 (39,39) <sup>b</sup>	0 (0,00) <sup>c</sup>	10 (30,30) <sup>b</sup>	0 (0,00) <sup>d</sup>	9 (27,27) <sup>d</sup>	3 (9,09) <sup>d</sup>
<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	T1	C	61	63 (96,83) <sup>a</sup>	26 (41,27) <sup>a</sup>	61 (96,83) <sup>a</sup>	46 (73,02) <sup>a</sup>	61 (96,83) <sup>a</sup>	53 (84,13) <sup>a</sup>
		V	49	63 (77,78) <sup>c</sup>	10 (15,87) <sup>b</sup>	48 (76,19) <sup>b</sup>	25 (39,68) <sup>c</sup>	47 (74,60) <sup>c</sup>	28 (44,44) <sup>b</sup>
	T2	C	47	47 (100,00) <sup>a</sup>	21 (44,68) <sup>a</sup>	47 (100,00) <sup>a</sup>	33 (70,21) <sup>a</sup>	46 (97,87) <sup>a</sup>	35 (74,47) <sup>a</sup>
		V	24	46 (52,17) <sup>b</sup>	7 (15,22) <sup>b</sup>	25 (54,35) <sup>b</sup>	11 (23,91) <sup>e</sup>	25 (54,35) <sup>b</sup>	13 (28,26) <sup>c</sup>
	T3	C	38	38 (100,00) <sup>a</sup>	13 (34,21) <sup>a</sup>	38 (100,00) <sup>a</sup>	27 (71,05) <sup>a</sup>	37 (97,37) <sup>a</sup>	33 (86,84) <sup>a</sup>
		V	15	42 (35,71) <sup>d</sup>	2 (4,76) <sup>c</sup>	17 (40,48) <sup>b</sup>	7 (16,67) <sup>e</sup>	16 (38,10) <sup>d</sup>	7 (16,67) <sup>d</sup>

<sup>a, b, c, d, e</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente ( $P < 0.05$ ).

Na mesma tabela, observando-se a taxa de eclosão, nota-se também que não houve diferença entre os BL e BX do grupo C em todo o intervalo e tratamentos ( $P>0.05$ ). No grupo V, os BL do T2 e BX do T1, mostraram-se novamente superiores aos dos demais tratamentos, às 48 e 72 horas ( $P<0.05$ ). Todavia, os BX apresentaram maior índice de eclosão, comparando-se tratamentos e estágios embrionários, ao final do período de avaliação.

Para obtenção de maior número de embriões nos estágios de BL e/ou BX, o procedimento de vitrificação foi realizado em dois dias (D6,5 e D7,5) da idade dos embriões, para cada manipulação (**Figura 6**) – daí, o alcance do fator tempo com esses parâmetros.

No geral, embriões que alcançaram os estágios BL e/ou BX em D6,5 apresentaram maiores taxas de re-expansão e eclosão em comparação aos de D7,5. Entretanto, para re-expansão não ocorreu diferença significativa ( $P>0.05$ ), mas a taxa de eclosão dos embriões de D6,5 foi significativamente superior às 72 horas ( $P=0.042$ ), em relação aos de D7,5.



**Figura 6:** Comportamento geral dos embriões submetidos à criopreservação em dias diferentes (D6,5 – 156h *pi* e D7,5 – 180h *pi*), quanto à re-expansão e eclosão, observadas às 24, 48 e 72 horas após vitrificação e desvitrificação. Ponto marcado com seta amarela difere significativamente ( $P=0.042$ ).

A **Tabela 6**, da mesma maneira que os outros fatores, mostra que não houve diferença ( $P>0.05$ ) entre grupos C, nos dias 6,5 e/ou 7,5, independente do tratamento, para re-expansão e eclosão. Todavia, analisando os grupos V quanto à re-expansão, o T3 foi inferior significativamente ( $P<0.001$ ) nos três períodos averiguados, sendo que T1 e T2

foram semelhantes ( $P>0.05$ ). Quanto às taxas de eclosão, em 24h pós-vitrificação, embriões do T1 de D7,5 apresentaram superioridade em aos demais, seguidos dos embriões de D6,5 do T2, mas estes não foram significativamente distintos entre si ( $P<0.05$ ); às 48 e 72 horas, somente o T3 mostrou diferença significativa ( $P<0.001$ ) com os outros tratamentos, os quais foram semelhantes entre si ( $P>0.05$ ).

**Tabela 6:** Taxa de re-expansão e eclosão dos embriões em D6,5 e D7,5, dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), às 24-48-72 horas após a vitrificação, produzidos nos diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

DIA	Tratamento	N Total BL e BX	24h pós-vitrificação (%)		48h pós-vitrificação (%)		72h pós-vitrificação (%)		
			Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	
D 6,5 (156h pi)	T1	C	57	56 (98,25) <sup>a</sup>	1 6 (28,07) <sup>a</sup>	56 (98,25) <sup>a</sup>	37 (64,91) <sup>a</sup>	56 (98,25) <sup>a</sup>	48 (84,21) <sup>a</sup>
		V	65	45 (69,23) <sup>b</sup>	2 (3,08) <sup>b</sup>	42 (64,62) <sup>b</sup>	14 (21,54) <sup>b</sup>	39 (60,00) <sup>b</sup>	19 (29,23) <sup>b</sup>
	T2	C	33	33 (100,00) <sup>a</sup>	1 2 (36,36) <sup>a</sup>	33 (100,00) <sup>a</sup>	20 (60,61) <sup>a</sup>	32 (96,97) <sup>a</sup>	22 (66,67) <sup>a</sup>
		V	36	22 (61,11) <sup>b</sup>	5 (13,89) <sup>c</sup>	23 (63,62) <sup>b</sup>	11 (30,56) <sup>b</sup>	23 (63,89) <sup>b</sup>	11 (30,56) <sup>b</sup>
	T3	C	35	34 (97,14) <sup>a</sup>	6 (17,14) <sup>c</sup>	34 (97,14) <sup>a</sup>	21 (60,00) <sup>a</sup>	34 (97,14) <sup>a</sup>	29 (82,86) <sup>a</sup>
		V	39	15 (38,46) <sup>c</sup>	1 (2,56) <sup>b</sup>	14 (35,90) <sup>c</sup>	5 (12,82) <sup>c</sup>	13 (33,33) <sup>c</sup>	7 (17,95) <sup>c</sup>
D 7,5 (180h pi)	T1	C	44	43 (97,73) <sup>a</sup>	1 3 (29,55) <sup>a</sup>	42 (95,45) <sup>a</sup>	26 (59,09) <sup>a</sup>	41 (93,18) <sup>a</sup>	29 (65,91) <sup>a</sup>
		V	37	25 (67,57) <sup>b</sup>	8 (21,62) <sup>a</sup>	26 (70,27) <sup>b</sup>	11 (29,73) <sup>b</sup>	25 (67,57) <sup>b</sup>	14 (37,84) <sup>b</sup>
	T2	C	46	46 (100,00) <sup>a</sup>	1 1 (23,91) <sup>a</sup>	44 (95,65) <sup>a</sup>	25 (54,35) <sup>a</sup>	45 (97,83) <sup>a</sup>	29 (63,04) <sup>a</sup>
		V	42	25 (59,52) <sup>b</sup>	2 (4,76) <sup>b</sup>	25 (59,52) <sup>b</sup>	8 (19,05) <sup>b</sup>	24 (57,14) <sup>b</sup>	11 (26,19) <sup>b</sup>
	T3	C	37	36 (97,30) <sup>a</sup>	8 (21,62) <sup>a</sup>	33 (89,19) <sup>a</sup>	17 (45,95) <sup>a</sup>	31 (83,78) <sup>a</sup>	24 (64,86) <sup>a</sup>
		V	36	13 (36,11) <sup>c</sup>	1 (2,78) <sup>b</sup>	13 (36,11) <sup>c</sup>	2 (5,56) <sup>c</sup>	12 (33,33) <sup>c</sup>	3 (8,33) <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente ( $P<0.001$ ).

De todos os resultados obtidos e aqui apresentados, pode-se concluir que houve interação dos diferentes tipos de fontes protéicas utilizadas nos tratamentos sobre a criotolerância dos embriões bovinos PIV. A despeito da melhor produção de blastocistos, em termos de quantidade no T1 (produção com SFB), não mostrou embriões menos resistentes ao processo de criopreservação pela vitrificação, em comparados ao T2 (suplementação com BSA). Fato que, todavia, não aconteceu com o T3 (suplementado com BSA e SFB). Dentro dos parâmetros propostos para avaliação – re-expansão e eclosão dos blastocistos, o grupo Controle foi muito superior ao grupo Vitricado; os embriões BX mostraram melhores taxas; e os embriões de D6,5 – ao final do período de observação – apresentam vantagem sobre os demais.

Os dados que originaram as tabelas que foram utilizadas para estas comparações agrupadas podem ser confirmados nas **Tabelas 7 – 12**.

**Tabela 7:** Taxas de *re-expansão em 24 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Re-expansão 24 h	Tratamentos		<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
			[N re-expandido/N Total (%)]		[N re-expandido/N Total (%)]	
			<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C		24/24 (100) <sup>a</sup>	14/14 (100) <sup>a</sup>	32/33 (96,97) <sup>a</sup>	29/30 (96,67) <sup>a</sup>
	V		17/29 (58,62) <sup>b</sup>	4/10 (40,00) <sup>b</sup>	28/36 (77,78) <sup>b</sup>	21/27 (77,78) <sup>b</sup>
T2	C		13/13 (100) <sup>a</sup>	19/19 (100) <sup>a</sup>	20/20 (100) <sup>a</sup>	27/27 (100) <sup>a</sup>
	V		10/15 (66,67) <sup>b</sup>	13/17 (76,47) <sup>b</sup>	12/21 (57,14) <sup>b</sup>	12/25 (48,00) <sup>b</sup>
T3	C		17/18 (94,44) <sup>a</sup>	15/16 (93,75) <sup>a</sup>	17/17 (100) <sup>a</sup>	21/21 (100) <sup>a</sup>
	V		7/19 (36,84) <sup>c</sup>	6/14 (42,86) <sup>b</sup>	8/20 (40,00) <sup>c</sup>	7/22 (31,82) <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

**Tabela 8:** Taxas de *re-expansão em 48 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Re-expansão 48 h	Tratamentos		<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
			[N re-expandido/N Total (%)]		[N re-expandido/N Total (%)]	
			<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C		24/24 (100) <sup>a</sup>	13/14 (92,86) <sup>a</sup>	32/33 (96,97) <sup>a</sup>	29/30 (96,67) <sup>a</sup>
	V		16/29 (55,17) <sup>b</sup>	4/10 (40,00) <sup>c</sup>	26/36 (72,22) <sup>b</sup>	22/27 (81,48) <sup>b</sup>
T2	C		13/13 (100) <sup>a</sup>	17/19 (89,47) <sup>a</sup>	20/20 (100) <sup>a</sup>	27/27 (100) <sup>a</sup>
	V		10/15 (66,67) <sup>b</sup>	13/17 (76,47) <sup>b</sup>	13/21 (61,90) <sup>b</sup>	12/25 (48,00) <sup>c</sup>
T3	C		17/18 (94,44) <sup>a</sup>	12/16 (75,00) <sup>a</sup>	17/17 (100) <sup>a</sup>	21/21 (100) <sup>a</sup>
	V		6/19 (31,58) <sup>c</sup>	4/14 (28,57) <sup>c</sup>	8/20 (40,00) <sup>c</sup>	9/22 (40,91) <sup>c</sup>

<sup>a, b, c</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

**Tabela 9:** Taxas de *re-expansão em 72 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Re-expansão 72 h	Tratamentos		<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
			[N re-expandido/N Total (%)]		[N re-expandido/N Total (%)]	
			<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C		24/24 (100) <sup>a</sup>	12/14 (85,71) <sup>a</sup>	32/33 (96,97) <sup>a</sup>	29/30 (96,67) <sup>a</sup>
	V		14/29 (48,28) <sup>b</sup>	3/10 (30,00) <sup>b</sup>	25/36 (69,44) <sup>b</sup>	22/27 (81,48) <sup>b</sup>
T2	C		12/13 (92,31) <sup>a</sup>	19/19 (100) <sup>a</sup>	20/20 (100) <sup>a</sup>	26/27 (96,30) <sup>a</sup>
	V		10/15 (66,67) <sup>c</sup>	12/17 (70,59) <sup>c</sup>	13/21 (61,90) <sup>b</sup>	12/25 (48,00) <sup>c</sup>
T3	C		17/18 (94,44) <sup>a</sup>	11/16 (68,75) <sup>c</sup>	17/17 (100) <sup>a</sup>	20/21 (95,24) <sup>a</sup>
	V		5/19 (26,32) <sup>d</sup>	4/14 (28,57) <sup>d</sup>	8/20 (40,00) <sup>c</sup>	8/22 (36,36) <sup>c</sup>

<sup>a, b, c, d</sup> Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

**Tabela 10:** Taxas de *eclosão em 24 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Eclosão 24 h	Tratamentos	<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
		[N eclodido/N Total (%)]		[N eclodido/N Total (%)]	
		<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C	1/24 (4,17) <sup>a</sup>	2/14 (14,29) <sup>a</sup>	15/33 (45,45) <sup>a</sup>	11/30 (36,67) <sup>a</sup>
	V	0/29 (0,00) <sup>b</sup>	0/10 (0,00) <sup>b</sup>	2/36 (5,56) <sup>b</sup>	8/27 (29,63) <sup>a</sup>
T2	C	2/13 (15,38) <sup>a</sup>	0/19 (0,00) <sup>b</sup>	10/20 (50,00) <sup>a</sup>	11/27 (40,74) <sup>a</sup>
	V	0/15 (0,00) <sup>b</sup>	0/17 (0,00) <sup>b</sup>	5/21 (23,81) <sup>c</sup>	2/25 (8,00) <sup>b</sup>
T3	C	1/18 (5,56) <sup>a</sup>	0/16 (0,00) <sup>b</sup>	5/17 (29,41) <sup>c</sup>	8/21 (38,10) <sup>a</sup>
	V	0/19 (0,00) <sup>b</sup>	0/14 (0,00) <sup>b</sup>	1/20 (5,00) <sup>b</sup>	1/22 (4,55) <sup>b</sup>

a, b, c Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

**Tabela 11:** Taxas de *eclosão em 48 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

Eclosão 48 h	Tratamentos	<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
		[N eclodido/N Total (%)]		[N eclodido/N Total (%)]	
		<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C	12/24 (50,00) <sup>a</sup>	5/14 (35,71) <sup>a</sup>	25/33 (75,76) <sup>a</sup>	21/30 (70,00) <sup>a</sup>
	V	0/29 (0,00) <sup>b</sup>	0/10 (0,00) <sup>b</sup>	14/36 (38,89) <sup>b</sup>	11/27 (40,74) <sup>b</sup>
T2	C	6/13 (46,15) <sup>a</sup>	6/19 (31,58) <sup>a</sup>	14/20 (70,00) <sup>a</sup>	19/27 (70,37) <sup>a</sup>
	V	5/15 (33,33) <sup>c</sup>	3/17 (17,65) <sup>c</sup>	6/21 (28,57) <sup>b</sup>	5/25 (20,00) <sup>c</sup>
T3	C	8/18 (44,44) <sup>a</sup>	3/16 (18,75) <sup>c</sup>	13/17 (76,47) <sup>a</sup>	14/21 (66,67) <sup>a</sup>
	V	0/19 (0,00) <sup>b</sup>	0/14 (0,00) <sup>b</sup>	5/20 (25,00) <sup>b</sup>	2/22 (9,09) <sup>d</sup>

a, b, c, d Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

**Tabela 12:** Taxas de *eclosão em 72 horas* de observação após criopreservação. Diferença dos embriões dos grupos *Controle* (C) e *Vitrificado* (V), em distintos estágios de desenvolvimento (BL e BX) e idade (dias D6,5 e D7,5), produzidos em diferentes tratamentos (T1, T2, T3).

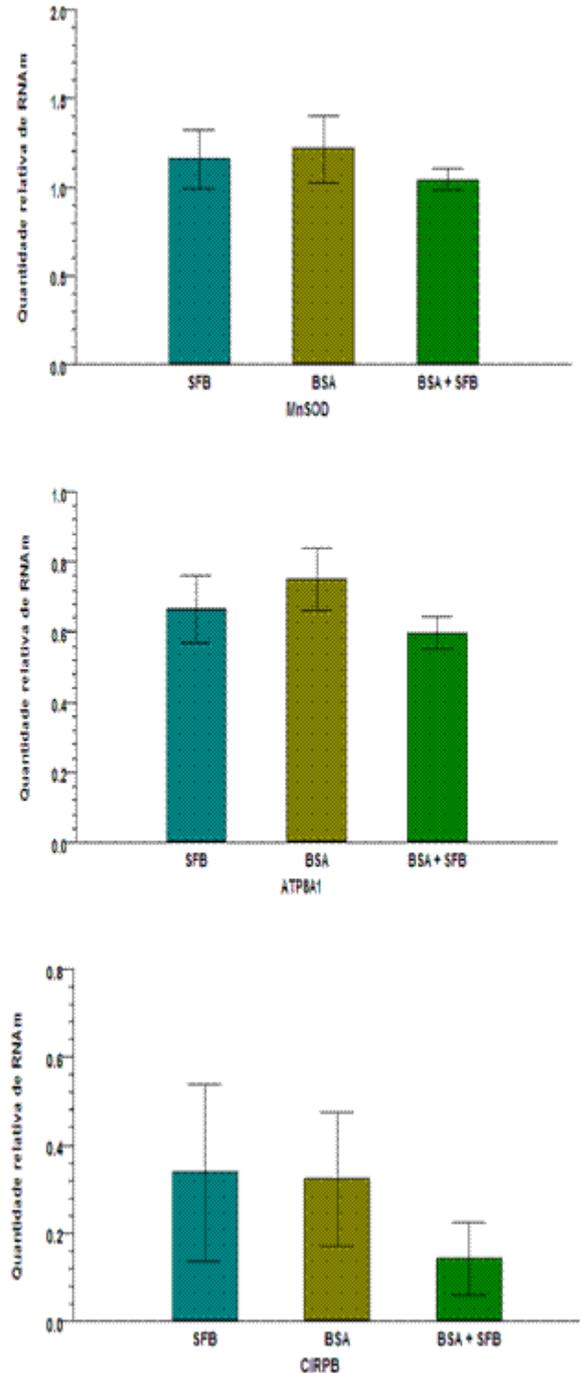
Eclosão 72 h	Tratamentos	<b>Blastocitos (BL)</b>		<b>Blastocisto Expandido (BX)</b>	
		[N eclodido/N Total (%)]		[N eclodido/N Total (%)]	
		<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>	<b>D6,5</b>	<b>D7,5</b>
T1	C	18/24 (75,00) <sup>a</sup>	6/14 (48,86) <sup>a</sup>	30/33 (90,91) <sup>a</sup>	23/30 (76,67) <sup>a</sup>
	V	5/29 (17,24) <sup>b</sup>	0/10 (0,00) <sup>b</sup>	14/36 (38,89) <sup>b</sup>	14/27 (51,85) <sup>b</sup>
T2	C	8/13 (61,54) <sup>a</sup>	8/19 (42,11) <sup>a</sup>	14/20 (70,00) <sup>a</sup>	21/27 (77,78) <sup>a</sup>
	V	5/15 (33,33) <sup>c</sup>	4/17 (23,53) <sup>c</sup>	6/21 (28,57) <sup>b</sup>	7/25 (28,00) <sup>c</sup>
T3	C	14/18 (77,78) <sup>a</sup>	6/16 (37,50) <sup>a</sup>	15/17 (88,24) <sup>a</sup>	18/21 (85,71) <sup>a</sup>
	V	2/19 (10,53) <sup>b</sup>	1/14 (7,14) <sup>b</sup>	5/20 (25,00) <sup>b</sup>	2/22 (9,09) <sup>d</sup>

a, b, c, d Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.001).

No experimento III, o efeito dos tratamentos na expressão de genes foi avaliado. Os genes selecionados para esse estudo foram: Bax, BCL-2, Mn-SOD, HSP-70, CIRP-b, ACAT-2 e ATP8A1. Os produtos amplificados desses genes são exibidos na **Figura 10**.

A expressão do gene BCL-2 foi detectada em apenas um *pool* de embriões do T1, não podendo, portanto, ser quantificada.

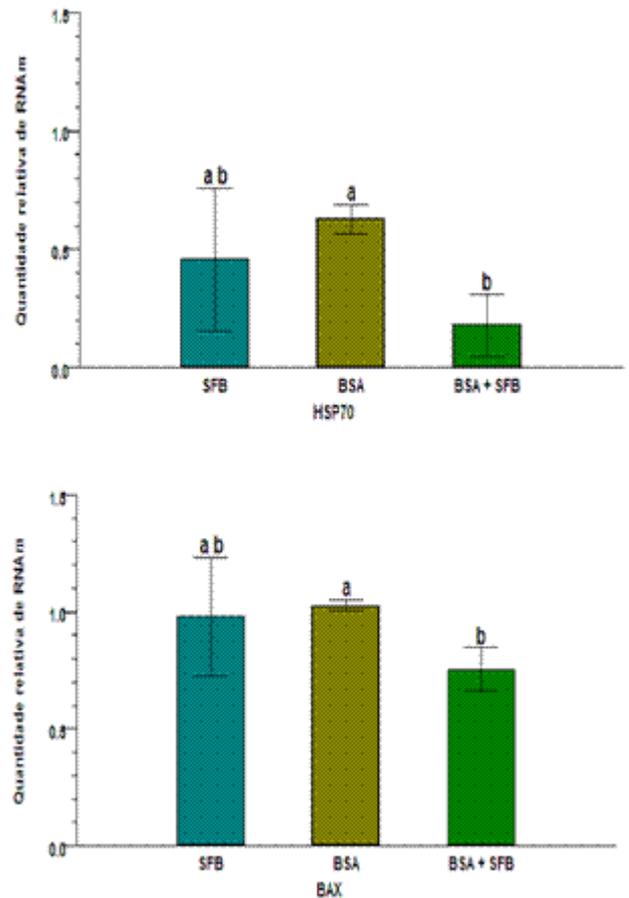
A quantidade relativa de RNAm para os genes MnSOD, ATP8A1 e CIRP-b não diferiu entre os tratamentos ( $P < 0.05$ ) – **Figura 7**.



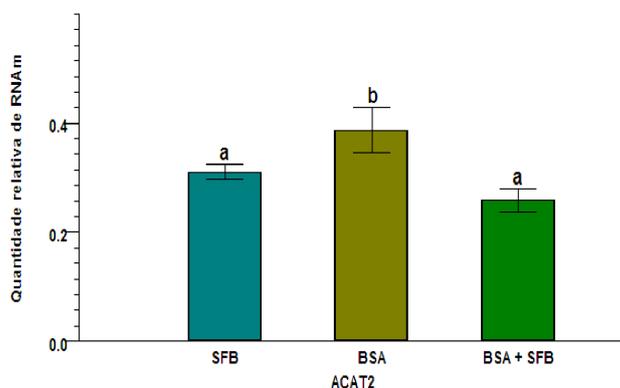
**Figura 7:** Quantidade relativa de RNAm (média ± S.E.M.) dos genes *Magnésio Superóxido Desmutase (MnSOD)*, *Chromaffin Granule ATPase II (ATP8A1)* e *Cold Inducible RNA-binding Protein B (CIRP-b)* em embriões eclodidos (4 *pools* com 9 BE, cada) em D8, cultivados nos diferentes tratamentos (T1=SFB; T2=BSA; T3=BSA+SFB). Não houve diferença significativa entre os grupos ( $P < 0.05$ ).

Na expressão dos genes Bax e HSP-70 (**Figura 8**), observaram-se maior quantidade de transcritos no T2. Não houve diferença significativa ( $P < 0.05$ ) dos T2 e T3, comparados ao T1, mas ocorreu diferença entre T2 e T3 no aparecimento de Bax ( $P = 0.047$ ) e HSP-70 ( $P = 0.021$ ).

**Figura 8:** Quantidade relativa de RNAm (média  $\pm$  S.E.M.) do gene *B-cell Lymphoma Protein 2 Associated Protein X (Bax)* e *Heat Shock Protein – 70 (HSP-70)* em embriões eclodidos (4 pools com 9 BE, cada) em D8, cultivados nos diferentes tratamentos (T1=SFB; T2=BSA; T3=BSA+SFB). <sup>a, b</sup> Diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $P < 0.05$ ).

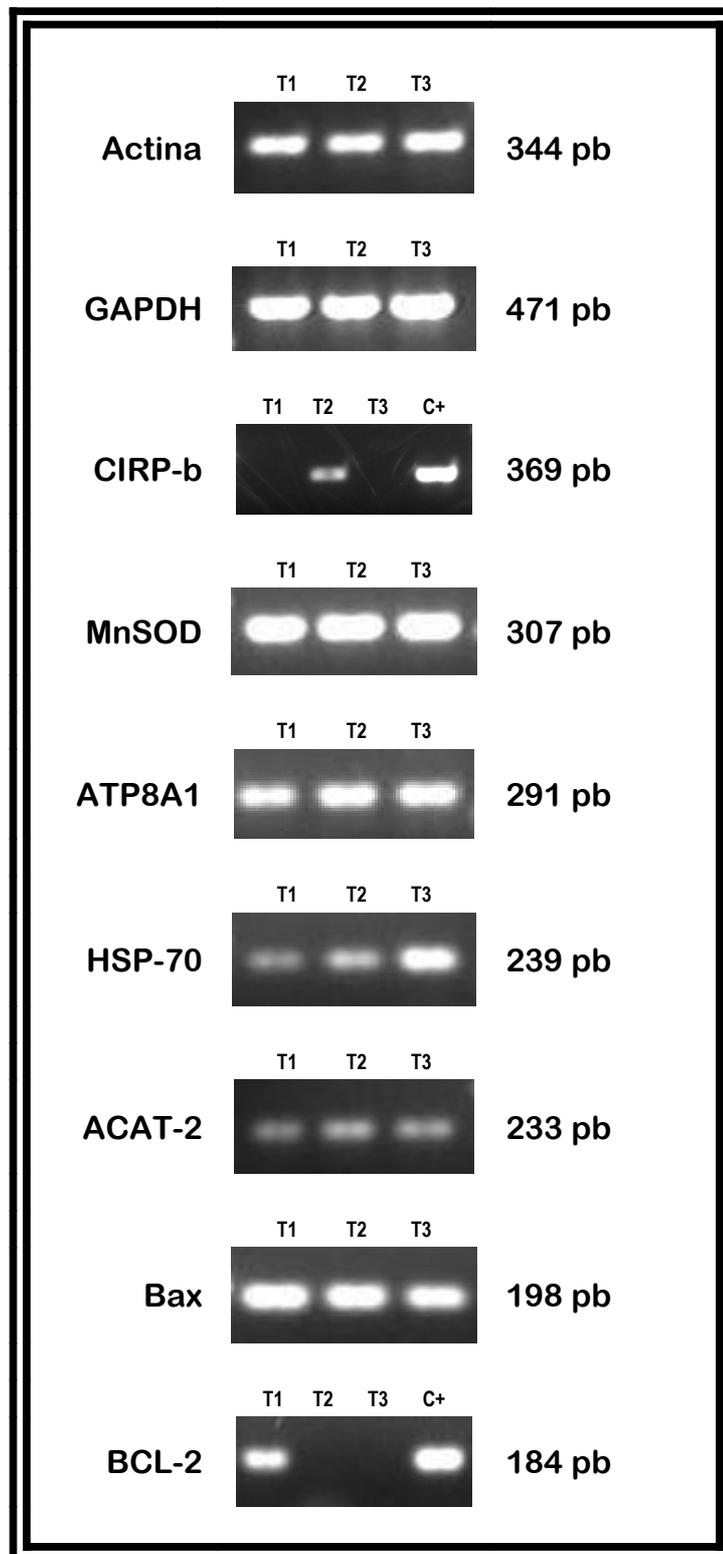


Para o gene *ACAT-2*, a expressão foi semelhante ( $P < 0.05$ ) para T1 e T3. Uma vez que apresentou maior quantidade em T2, esta foi diferenciada significativamente entre T1 ( $P = 0.057$ ) e T2 ( $P = 0.029$ ) – **Figura 9**.



**Figura 9:** Quantidade relativa de RNAm (média  $\pm$  S.E.M.) do gene *Acetyl-Coenzyme A Acetyl-Transferase 2 (ACAT-2)* em embriões eclodidos (4 pools com 9 BE, cada) em D8, cultivados nos diferentes tratamentos (T1=SFB; T2=BSA; T3=BSA+SFB). <sup>a, b</sup> Diferentes sobrescritos diferem significativamente ( $P < 0.05$ ).

**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose, representando os amplicons dos genes avaliados neste estudo (4 *pools*, com 9 BE de D8,5, para cada tratamento [T1, T2, T3]).



## 9. DISCUSSÃO

No estudo presente, os efeitos do SFB sendo substituído total ou parcialmente pela BSA-faf durante a PIV de embriões bovinos, nos meios de maturação e cultivo, foram investigados quanto à quantidade na produção de blastocistos e em termos de diferentes procedimentos avaliadores da qualidade embrionária.

Além da taxa de produção de blastocistos, um dos parâmetros adotados para avaliação da qualidade dos embriões produzidos nos diferentes tratamentos, foi o teste da criotolerância. Outro, foi avaliar a possível diferença na expressão de genes que cada um dos tratamentos pode vir a gerar nos embriões.

Os resultados obtidos no experimento I mostraram que a presença de SFB na PIV (T1) produz mais cedo, maior quantidade de blastocistos. Esses dados concordam com o descrito por OLIVEIRA *et al.* (2006), os quais mostraram que a suplementação com soro tanto durante a maturação como no cultivo foi capaz de modificar a cinética do desenvolvimento embrionário significativamente, e a ausência do soro durante a MIV-FIV aumentou a duração do primeiro e quarto ciclo celulares. O que também vai ao encontro dos dados resultantes do T3, que obteve adição de SFB no CIV final, apresentando taxas de blastocistos inferiores e embriões tardios em atingir tal estágio. No mesmo sentido, LONERGAN e colaboradores (2006) também dizem que a adição de soro ao meio de cultivo aumenta a velocidade de desenvolvimento manifestada entre o espaço de compactação de uma mórula normal e a aparência precoce de blastocisto.

Quanto ao T2, suplementado com BSA-faf, os resultados descobertos reforçam os encontrados por WANG *et al.* (1997) e OLIVEIRA *et al.* (2006), em que meios suplementados somente com BSA produziram maior quantidade de mórulas e menor porcentagem de blastocistos, bem como menor eclodibilidade dos mesmos, em relação

aos meios que continham SFB em todo o cultivo ou de forma seqüencial, isto é, presente somente nos estágios mais tardios (após 72h *pi*). Neste presente estudo, a quantidade de mórulas obtidas em T2 foi superior às de T1 e T3 nos dias de observação. Em D6,5: T1=10,96%, T2=16% e T3=12,03%. Em D7,5: T1=5,31%, T2=14,52% e T3=8,19%. Em D8,5: T1=4,79%, T2=10,67% e T3=5%.

Noutro estudo também comparando diferentes fontes de proteína durante MIV e CIV, WRENZYCKI *et al.* (2001) mostraram que a adição de SVE, BSA-v e PVA não apresentaram diferença na taxa de clivagem (71,5%, 66,4% e 65%, respectivamente), mas mostraram porcentagem de mórulas e de blastocistos, significativamente maior para o meio suplementado com SVE (41% e 30%, respectivo para mórulas e blastocistos) do que os meios adicionados de BSA-v (30% e 23,9%, respectivo para mórulas e blastocistos) e PVA (23,2% e 15,9%, respectivo para mórulas e blastocistos). Nos meios com BSA-v e PVA, essa diferença para os valores de obtenção de blastocistos foi significativa.

Embriões cultivados em meios simples ou compostos, quando transferidos para receptoras, têm resultado em bezerros normais ao nascimento – o que indica que a composição química pode não ser o mais importante para o desenvolvimento embrionário, podendo esta ser uma escolha empírica ou pessoal. Os resultados que a equipe de WANG (1997) apresentou, mostram que o tipo de proteína que suplementa o meio de cultivo influencia mais do que a sua composição. Portanto, a seleção quanto ao tipo de proteína a se utilizar parece ser a grande consideração para a maximização da PIV de embriões.

Este fato também é notado pelo trabalho de NEDAMBALE e colaboradores (2006), que além de testarem a composição do meio e tipo de fonte protéica acrescido, criopreservaram embriões bovinos e avaliaram a qualidade destes mediante a sobrevivência após a criopreservação; neste caso, foi adicionado  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) aos meios de cultivo pós-congelamento. Concluíram que este suplemento foi extremamente benéfico para embriões vitrificados, pois aumentaram sobrevivência, taxas de eclosão e número total de células dos mesmos.

A indefinição da composição e o comportamento bifásico que o SFB apresenta, induz a dúvidas permanentes quanto ao seu uso no sistema de PIV de embriões. A presença de

soro pode inibir estágios iniciais da clivagem, enquanto pode ter um efeito de aceleração nos estágios finais do desenvolvimento (WANG *et al.*, 1997; RIZOS *et al.*, 2003; NEDAMBALE *et al.*, 2006; SAGIRKAYA *et al.*, 2007). Mas apesar disso, há também diferenças entre os lotes de BSA que podem tanto inibir como favorecer o desenvolvimento do embrião cultivado *in vitro* (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996).

ALI & SIRARD (2002) não observaram diferença na taxa de mórula e de blastocisto de ovócitos maturados em meio SOF suplementados com BSA-v nas concentrações 1, 8 e 20 mg/ml. A substituição do BSA-v pela BSA-faf no meio de maturação de ovócito melhorou a porcentagem de blastocisto ( $18,1 \pm 1,2\%$  vs  $26,6 \pm 2,7\%$ , respectivamente). O acréscimo de PVP-40 ( $34,6 \pm 0,8\%$ ) ao meio de maturação aumentou a taxa de blastocisto quando se comparou com BSA-v ( $17,4 \pm 2,0\%$ ) e 10% de SFB ( $20,6 \pm 0,8\%$ ). E ainda, ovócitos maturados com BSA-v ( $44 \pm 7,5\%$ ) tiveram menor porcentagem de ovócitos em MII, em relação ao grupo de ovócitos maturados apenas em SOF ( $69 \pm 1,4\%$ ), SOF com PVP-40 ( $64 \pm 3,2\%$ ) e com SOF suplementado com 10% de SFB ( $66 \pm 2,6\%$ ).

Estes últimos dados concordam com ECKERT & NIEMANN (1995), que não encontraram diferenças na taxa de maturação de ovócitos quando utilizaram diferentes fontes protéicas: BSA em diferentes concentrações (1, 6 e 10 mg/ml), SVE e PVA, mas não com MASTROMONACO *et al.* (2004), os quais verificaram diferença na expulsão do corpúsculo polar após 22 horas de maturação quando se utilizou SFB ( $72,3 \pm 2,33\%$ ) e BSA-faf ( $58,6 \pm 2,7$ ).

NEDAMBALE *et al.* (2004-b), usaram a BSA e o soro separadamente ou associados (uso do soro no início, sendo depois substituído pela BSA). Neste, observou-se menores taxas de eclosão e blastocistos expandidos, em D7, com menor número de células na ausência do soro. Estas observações enfatizam o efeito benéfico do soro durante o estágio final do desenvolvimento embrionário, citados por outros grupos de pesquisa e apóiam os resultados desse estudo. Os autores ainda expõem que o SFB no meio SOF durante todo o cultivo embrionário induziu à formação precoce de blastocisto, sem aumentar a proliferação celular.

Nota-se, todavia, que grande parte dos trabalhos relatando produção de blastocistos em BSA semelhantes às de soro, incluíram suplementação sérica (10%) na MIV, *feeding* com

soro (5%) no CIV ou outros aditivos que não fontes de proteína na MIV e/ou CIV para incremento da mesma (CARNEGIE *et al.*, 1999; YOTSUSHIMA *et al.*, 2004; NEDAMBALE *et al.*, 2004-b e 2006; PALASZ *et al.*, 2006; SAGIRKAYA *et al.*, 2007). Este fato pode explicar os baixos resultados que os nossos T2 e T3 apresentaram quanto à produção de blastocistos quando comparados ao T1, pois não foram expostos ao SFB durante a MIV e nenhuma suplementação durante o CIV inicial, indicando que a adição de SFB apenas no final do cultivo não influencia a produção de blastocistos, não contribuindo para o acréscimo na quantidade, por conseguinte.

Os muitos fatores envolvidos na composição do meio de cultura podem afetar a viabilidade do embrião PIV de modo geral, como é amplamente reportado, e isto inclui resistência aos métodos de criopreservação e sobrevivência após este procedimento. Conseqüentemente, a velocidade de recuperação após o descongelamento pode depender não apenas da integridade do embrião em si, mas também da natureza do ambiente de cultivo após este método (NEDAMBALE *et al.*, 2006).

Embriões produzidos com suplementação sérica possuem lipídeos intracelulares acumulados, comparados aos originados de meios livres de soro – os quais apresentam melhor sobrevivência após a criopreservação (NEDAMBALE *et al.*, 2004-b; MEN *et al.*, 2005; LONERGAN *et al.*, 2006).

Uma vez que a criopreservação é amplamente utilizada em embriões produzidos *in vivo*, RIZOS *et al.* (2002-a) e LONERGAN *et al.* (2006) demonstraram que a cultura de zigotos bovinos produzidos *in vitro* no oviduto de ovelhas pode aumentar drasticamente a sua criotolerância a um nível similar àquela de embriões produzidos *in vivo*.

Até o momento, muitos esforços têm sido feitos para a substituição de fontes protéicas indefinidas por fontes definidas nos meios de cultivo para melhoria dos resultados após a criopreservação de embriões PIV. Porém muitos desses dados não tem se mostrado constantes.

Estudos propõem que a sobrevivência de embriões PIV cultivados em meios com SFB possuem menor criotolerância em relação aos cultivados em meios acrescidos de BSA ou substituto sérico sintético (SSS) - (CARNEGIE *et al.*, 1999; NEDAMBALE *et al.*, 2004-b; LONERGAN *et al.*, 2006; SERAPIÃO, 2006).

NEDAMBALE *et al.* (2004-b) mostraram que o soro produziu embriões com menor criotolerância, mas maior número de células em embriões eclodidos do que o meio com BSA. Além do mais, os embriões oriundos do soro possuíam aparência mais escura, indicando presença de lipídeos no citoplasma, que é considerado prejudicial para a resistência à criopreservação. CARNEGIE *et al.* (1999) obtiveram taxas de eclosão muito baixas quando cultivaram embriões em SVE ( $2,2 \pm ,2$ ) e SSS ( $63,4 \pm 3,4$ ). Por outro lado, embriões suínos cultivados com soro tiveram maior sobrevivência após passarem pelo processo de vitrificação (MEN *et al.*, 2005).

Este trabalho presente não mostrou diferença entre embriões bovinos vitrificados dos tratamentos cultivados somente com SFB ou BSA, quanto às taxas de expansão e eclosão. Neste caso, a presença ou ausência total de soro (T1 e T2) não interferiu na criotolerância dos embriões produzidos. No entanto, o tratamento que recebeu suplementação de SFB no CIV final (T3) apresentou menores índices de re-expansão no final do período.

Na tentativa de melhorar a qualidade dos embriões PIV, com a idéia de a suplementação sérica nos estágios finais do desenvolvimento aumentaria a criotolerância dos mesmos foi instituído o T3. No entanto, adotou-se uma seqüência de suplementação diferente do que utilizam em diversos sistemas: o suporte inicial de proteína, feito com soro, aqui foi realizado com a BSA-faf. E ainda assim, a troca da suplementação protéica durante o cultivo obrigou a manipulação das estruturas num momento crítico da divisão celular do embrião (96h *pi*), ainda que rápida e planejada, podendo ter influenciado na obtenção dos baixos índices obtidos.

O fato da BSA não possuir composição totalmente definida, sendo ainda um derivado sérico, por ocorrer variações entre lotes do produto (KESKINTEPE & BRACKETT, 1996), e ser um componente biológico sujeito a contaminações (SERAPIÃO, 2006), podem justificar não ter ocorrido diferença nos resultados comparados ao SFB. Seu uso tem originado opiniões divergentes, levando à busca de suplementos – como hormônios sintéticos, a cisteína e o  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) – que possam minimizar esses efeitos, sem diminuir a variabilidade na produção de blastocistos (SERAPIÃO, 2006 e MEZZALIRA *et al.*, 2006). Além do mais, o sistema utilizado foi o de co-cultivo, o qual pode favorecer a re-estruturação dos embriões criopreservados (CARNEGIE *et al.*, 1999),

mas também pode influenciar negativamente no desenvolvimento no estágio inicial (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991) – que pode ter sido o fator da baixa taxa de produção de blastocistos nos tratamentos suplementados com BSA-faf (T2 e T3). Contudo, esta última opinião é amplamente discutida.

Um aumento da sobrevivência após a criopreservação tem sido alcançado com o uso de estratégias, como a indução da expressão de proteínas relacionadas ao estresse (com a elevada pressão hidrostática), o enriquecimento dos meios com aditivos ( $\beta$ -ME, cisteína) que aumentam a produção de antioxidantes endógenos (citado por MEZZALIRA *et al.*, 2006).

Num estudo citado por DINNYÉS *et al.* (2006), descobriu-se que a adição de *citocalasina-b* – um estabilizador de citoesqueleto, protege as estruturas microfilamentosas de embriões suínos durante a criopreservação, o que aumentou significativamente o desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* após o descongelamento. O grupo de NEDAMBALE (2006) adicionou  $\beta$ -ME ao meio de cultivo destinado aos embriões bovinos pós-criopreservados e verificaram que houve aumento significativo quanto à taxa de expansão e eclosão, em relação ao grupo controle, independentemente do tipo de meio de CIV adotado.

Este estudo não avaliou nenhum outro tipo de suplementação ao meio, se não as fontes protéicas necessárias para o desenvolvimento embrionário. Contudo, outras características foram observadas e podem ser adotadas quando se trata de melhorar ferramentas de avaliação para a conservação dos embriões produzidos, tais como os estágios e a idade do embrião.

Estudos criopreservando mórulas e blastocistos expandidos bovinos PIV, indicam melhores resultados com blastocistos (PUGH *et al.*, 2000 e citações de DINNYÉS *et al.*, 2006). Não foram encontrados relatos de comparações entre dois estágios de blastocistos (BL e BX). Os dados deste experimento mostraram que embriões BX obtiveram melhores taxas de re-expansão e eclosão, comparados aos do estágio de BL, independente do tratamento utilizado. Provavelmente pelo fato de terem alcançado primeiro um estágio mais avançado do seu desenvolvimento, indicando que possuem mais competência, têm melhor qualidade.

Alguns pesquisadores relataram que embriões no dia 7 toleram os tratamentos de criopreservação melhor do que embriões nos dias 6 e 8 (HASLER *et al.*, 1997; MARKKULA *et al.*, 2001), enquanto outros relatam que a idade do embrião à vitrificação não teve efeito na sobrevivência dos mesmos (MARTINEZ *et al.*, 1998) – citados por DINNYÉS *et al.*, 2006. Outros resultados de prenhez (ZUCOLLOTO *et al.*, 2003) mostraram que embriões obtidos em D6 apresentaram taxas ligeiramente superiores aos de D7, e estes apresentaram diferença significativamente superior em relação aos de D8. Neste estudo, os embriões de D6,5 e D7,5 mostraram diferença significativa quanto à taxa de eclosão apenas às 72h, mas os embriões de D6,5 tiveram índices de re-expansão e eclosão mais altos, podendo novamente relacionar a velocidade de desenvolvimento com a qualidade do embrião.

A combinação dos dados do desenvolvimento (taxas de clivagem e formação de blastocistos) e dados de biologia molecular qualitativa, como a abundância relativa de RNAm em certos genes, poderiam oferecer uma idéia mais ampla das conseqüências dos tratamentos que antecedem ou sucedem a criopreservação. Além do mais, a análise das diferenças de expressão de genes também pode auxiliar na compreensão da tolerância à criopreservação, que é dependente do estágio de desenvolvimento do embrião (DINNYÉS *et al.*, 2006), características estas que foram confirmadas neste experimento, uma vez que BL do T2 e BX do T1 mostraram melhores índices de recuperação após serem submetidos à vitrificação.

Diversos autores afirmam que o ambiente de cultura pós-fecundação pode ter um efeito drástico no padrão de expressão de RNAm de muitos genes importantes para o desenvolvimento embrionário (LONERGAN *et al.*, 2006) e podem explicar a diferença na qualidade de cada embrião (RIZOS *et al.*, 2002-a). Este fato confirma que, enquanto a qualidade do ovócito é o principal determinante da taxa de blastocisto no sistema *in vitro*, a condição após a fecundação é o fator central que afetará a qualidade dos blastocistos resultantes, usando a criotolerância e o padrão genético como índices de mensuração da qualidade do embrião (RIZOS *et al.*, 2002-a; LONERGAN *et al.*, 2003 e TESFAYE *et al.*, 2007).

Estudos têm mostrado que o cultivo *in vitro* de embrião pode alterar o padrão de expressão de genes que estão envolvidos na formação de junções tipo *gap* das células, na apoptose celular, no estresse oxidativo, no processo de diferenciação celular

influenciando o desenvolvimento embrionário (LONERGAN *et al.*, 2003), na criotolerância (RIZOS *et al.*, 2002-a). Entretanto, até o momento, a maioria dos trabalhos nesta área têm-se concentrado na descrição diferencial da expressão de genes embrionários de vários tipos, no intuito de enfatizar a malha de regulação que definem a qualidade destes e poucos têm se detido quanto à funcionalidade destes genes descritos (TESFAYE *et al.*, 2007).

A composição do meio junto às fontes protéicas já citadas exerce um efeito na morfologia das células do embrião e na expressão de alguns genes (RIEF *et al.*, 2002). Os eventos que ocorrem durante a MIV de ovócitos bovinos podem influenciar sua capacidade em se desenvolver embrião. Contudo, não há consenso acerca da influência da suplementação protéica no meio de maturação com o desenvolvimento embrionário e expressão de genes. Da mesma forma no CIV, independente do meio de cultivo usado, as condições de cultivo podem também afetar a expressão gênica. Estes efeitos são normalmente mensurados em blastocistos no período final do cultivo, uma vez que, embriões originados de zigotos com um padrão pró-nuclear normal, clivam mais rápidos e formam embriões com melhor morfologia quando comparados aos padrões anormais de qualidade (LONERGAN *et al.*, 2006).

Nesta linha de raciocínio, sabe-se também que o padrão de expressão de diversos genes difere entre blastocistos produzidos pelo cultivo *in vitro* ou *in vivo*. Mais importante, no entanto, é que estas diferenças na expressão já estão presentes em alguns casos após apenas o primeiro dia de cultivo *in vitro*, nos primeiros estágios de divisão (no caso do Bax, SOX, Cx43 – por exemplo), segundo LONERGAN *et al.*, (2006). Anormalidades detectadas no padrão de transcrição dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, quando comparado aos produzidos *in vivo*, podem explicar a reduzida qualidade desses em termos de viabilidade após criopreservação (RIZOS *et al.*, 2002-a).

Dos genes propostos para avaliação neste trabalho, dois deles desempenham papel importante na regulação da apoptose – o *Bax* e o *BCL-2*. A apoptose, uma forma programada de morte celular, tem sido observada em embriões no estágio de pré-implantação em diversas espécies de mamíferos e está presumivelmente envolvida na eliminação de células anormais (RUBIO POMAR *et al.*, 2005). Além do importante papel no desenvolvimento do animal e na homeostase celular, também age como um

mecanismo de controle de qualidade, o qual remove células que estão danificadas, não funcionais, extraviadas ou supranumerárias (PAULA-LOPES & HANSEN, 2002).

Existem controvérsias quanto à expressão de esses genes ser benéfica ou não. Foi demonstrado que a razão de BCL-2 e Bax é o determinante crítico tanto da sobrevivência quanto da morte celular. RIZOS *et al.* (2003) e LECHNIAK (2002) afirmam que a expressão do gene Bax pode representar um usual marcador para qualidade de blastocistos. Isso implica que a relação de BCL-2 e Bax pode ser usada como indicador da tendência para apoptose ou sobrevivência dos embriões.

Quando o Bax está super-expressado nas células, a apoptose é acelerada. Há relatos em que a expressão da proteína do gene BCL-2 foi significativamente maior do que a expressão da proteína do Bax em ovócitos grau I e embriões de boa qualidade (de 2 a 8 células e blastocistos). Em contraste, a expressão de proteínas do Bax foi muito maior do que a expressão de proteínas do BCL-2 em ovócitos grau IV e embriões degenerados (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002).

Recentemente, VANDAELE *et al.* (2008) mostraram que a expressão de *RNAm* dos genes Bax e BCL-2 (além das caspase-3 e -7) não devem ser usados como marcadores para apoptose em embriões bovinos. Esses autores defendem a opinião de que a detecção de diferenças na expressão de *RNAm* somente indica uma significância biológica se confirmada a expressão e a atividade da proteína. Caso não seja confirmada presença e atividade da proteína, a expressão de *RNAm* pode mostrar, apenas, maior atividade celular, ou seja, maior proliferação e crescimento e, como consequência dessa maior atividade, mortes de algumas células também podem ocorrer.

Os resultados deste trabalho encontrados entre os tratamentos (T1=T2 e T1=T3, mas T2>T3), mostram que os embriões possuem qualidade semelhante mediante a expressão do gene Bax, mas também dão suporte a hipótese de que a expressão aumentada desse gene nem sempre é indicativo de melhor qualidade, uma vez que os embriões de T3 foram menos criotolerantes em relação aos outros dois tratamentos. A maior presença de Bax tem sido atribuída aos meios que contém SFB (PALASZ *et al.*, 2006; WARZYCH *et al.*, 2006).

Como não ocorreu a mensuração da expressão do gene BCL-2, este não pôde contribuir na correlação qualitativa com o Bax.

O estresse oxidativo tem sido indicado como uma das causas do declínio do desenvolvimento embrionário. A quantidade excessiva de ROS dentro da célula durante o cultivo de embriões mamíferos normalmente é atribuída como fator negativo ao seu desenvolvimento (RIZOS *et al.*, 2003). Dentre os numerosos agentes antioxidantes a enzima *Mn-SOD* desempenha um papel importante removendo o O<sub>2</sub> e protegendo a célula contra o estresse oxidativo (WRENZYCKI *et al.*, 2001).

Embriões adquirem mecanismos de proteção quando são submetidos a algum tipo de estresse, e esta aquisição de tolerância a fatores ambientais de estresse pode ser devido à aquisição de proteção bioquímica ou simplesmente devido ao aumento no número de células (EDWARDS *et al.*, 2001). Com relação à aquisição de proteção bioquímica, a Mn-SOD está localizada na mitocôndria e têm ação de detoxificação de espécies oxigênio reativas (ROS) – (RIZOS *et al.*, 2003).

GUÉRIN *et al.* (2001) associam o acúmulo de radicais superóxido e o declínio da enzima superóxido desmutase (SOD), como estando diretamente ligados ao aumento de apoptoses, pois a SOD tem capacidade de inibir a morte celular. Os processos de congelamento e descongelamento também provocam danos aos embriões, causando redução das concentrações de glutathione (um antioxidante natural produzido pelas células) e da atividade da SOD.

Normalmente embriões cultivados na presença de soro apresentam maior expressão de Mn-SOD. O que pode parecer paradoxo, pois embriões oriundos de sistemas séricos são considerados como de baixa qualidade (RIZOS *et al.*, 2003). Neste estudo, os tratamentos com diferentes fontes protéicas não apresentaram diferença (T1=T2=T3) na quantificação de RNAm do gene Mn-SOD. Uma vez que o SFB e a BSA são ambos componentes séricos, esta semelhança pode indicar que os embriões dos três tratamentos são qualitativamente parecidos, também sendo esse talvez o motivo para a analogia maior entre os T1 e T2.

O estresse térmico estimula um complexo programa de expressão e respostas bioquímicas adaptativas na célula. As CSPs – neste caso a CIRP-b, podem ser definidas

como proteínas que são induzidas durante o período de exposição à hipotermia moderada. A expressão da CIRP pode ser aumentada por vários fatores; além do frio, radiação ultravioleta e hipóxia (citado por SONNA *et al.*, 2002).

As HSPs foram originalmente identificadas como proteínas, cuja expressão foi marcadamente aumentada pelo calor. Apesar da intensidade e duração do estímulo do calor necessário para induzir a expressão das HSPs variar consideravelmente entre os tecidos celulares, pode-se notar que uma exposição típica de manipulações *in vitro* já promove alteração. A indução da expressão das HSPs inicia poucos minutos após o princípio do estresse térmico, podendo seu pico de expressão ocorrer até diversas horas depois do procedimento (citado por SONNA *et al.*, 2002).

O estudo de OLIVEIRA *et al.* (2006) mostrou que diferentes fontes de proteína não necessariamente afetam a relativa abundância de HSP-70.1 [e Glut-1], indicando que os suplementos protéicos podem não ser o fator crítico contribuindo para a variação no conteúdo de RNAm entre os embriões derivados *in vivo* ou *in vitro*. As HSPs podem também ser afetadas por condições de cultivo inadequadas, sendo sua expressão facilmente induzida por uma variedade de agentes, incluindo aminoácidos análogos, calor, hormônios esteróides e outros, como a presença do SFB (WARZYCH *et al.*, 2006). Este último grupo de pesquisadores menciona que as HSPs desempenham um importante papel de proteção dentro da celular e também exercem ação anti-apoptótica. Segundo WRENZYCKI *et al.* (2001), essas proteínas são um indicado sensível do estresse causado pelas condições de cultivo.

Neste, os dados relativos à expressão o CIRP-b não diferiram entre os tratamentos estudados (T1=T2=T3). Por somente terem sido utilizados embriões do grupo Controle, de cada tratamento, a diferença na expressão desses genes pode não ter sido tão evidente, principalmente em se falando do CIRP-b – que ocorre sob estresse ao frio. Talvez, se fosse comparado aos embriões do grupo Vitricado ou se houvessem sido removidos do cultivo em momentos distintos do cultivo (ex.: antes e após as exposições das estruturas em placa aquecedora), tivesse sido mais manifesto, como ocorreu nos estudos de BOONKUSOL *et al.* (2006).

Porém o HSP-70 foi inferior no T3 e superior no T2, mas ambos foram semelhantes ao T1 (T1=T2, T2=T3, mas T2>T3). Pelo fato de que todos os embriões do grupo controle foram

submetidos ao mesmo estresse térmico (temperatura de estufa e/ou placa aquecedora durante os procedimentos da PIV e criopreservação do grupo Vitricado), assume-se que estes não foram os fatores atuantes na diferença ocorrida na expressão de HSP-70. A semelhança de expressão do HSP-70 entre os T1 e T2 pode ser indicativa do equilíbrio da qualidade apresentada entre esses tratamentos diante dos outros aspectos observados, visto que foram produzidos com distintas fontes protéicas, mas ambas de origem sérica. Todavia, o cultivo final sob as mesmas condições nos T1 e T3, pode ser a influência que venha explicar a equidade da expressão entre esses. A diferença presente entre T2 e T3 vem a contribuir como sinal de que este último tratamento tenha produzido embriões em condições sub-ótimas de cultivo, que os tornaram mais sensíveis, com menor tolerância aos tipos de estresse submetidos (baseado nos relatos de WARZYCH *et al.*, 2006 e WRENZYCKI *et al.*, 2001).

Tem sido sugerido que o conteúdo lipídico elevado em embriões PIV é derivado do soro incluso no meio de cultivo ou pode ser resultante do metabolismo insuficiente das mitocôndrias (RIZOS *et al.*, 2003).

Não têm sido encontrados relatos da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos com embriões, mas sabe-se que o gene ACAT-2 deve desempenhar importante função no processo de absorção do colesterol (LIN *et al.*, 2003). A ACAT-2 é regulada mediante a disponibilidade de substratos de gordura no conteúdo celular, e suas quantidades/atividade afetam dramaticamente a disposição de lipoproteínas na célula. Os resultados dos estudos apresentados por TEMEL *et al.* (2007), mostram que mesmo sob condições de excesso lipídico, a redução na expressão de ACAT-2 pode reduzir o conteúdo de éster de colesterol, e então o potencial aterogênico de novas lipoproteínas secretadas. Este relato apóia o resultado encontrado neste trabalho, em que apresentou maior expressão do gene ACAT-2 para o T2. Os T1 e T3, que supostamente tiveram maior oferta de lipídeos pela presença do SFB nos meios, não diferiram entre si, apresentando menores taxas de expressão.

Os lipídeos são distribuídos não aleatoriamente nas membranas biológica através de bicamadas. A distribuição assimétrica da bicamada de fosfolipídeos na membrana plasmática e vesículas secretórias de mamíferos são mantidas, em parte, por um transportador ATP-dependente (PATERSON *et al.*, 2006). Além disso, a distribuição variada de amino-fosfolipídeos em distintos compartimentos celulares podem aumentar

as diferenças funcionais intrínsecas entre as isoformas de ATPase-II, diferentes cofatores que são necessários para esta função, ou enzimas inteiramente distintas (DING *et al.*, 2000). Dentre essas proteínas, a *ATP8A1*, tem sido muito relatada em diversos tipos celulares, mas não em embriões. A elucidação desses problemas facilitaria o estudo do sistema de translocação de amino-fosfolipídeos, um sistema enzimático de suma importância, mas ainda não bem compreendido (DING *et al.*, 2000). Neste estudo, os diferentes tratamentos não apresentaram diferença de expressão do gene *ATP8A1* (T1=T2=T3), mostrando que esta atividade (transportadora de lipídeos) não foi influenciada pela diferença de conteúdo lipídico do meio e os embriões produzidos com distintos tipos de suplementação protéica não apresentaram acúmulo de lipídeos diferenciado e não parecendo possuir deficiência metabólica mitocondrial entre eles.

As pesquisas recentes têm focado na correlação entre morfologia e ultra-estrutura do embrião bovino, expressão gênica e criotolerância, e isto tem provado que se podem concluir muito mais do que se imaginava antes através da avaliação morfológica, tais como a coloração dos blastômeros, a compactação, cinética do desenvolvimento, tempo de formação e expansão de blastocistos, e diâmetro embrionário à eclosão (LONERGAN *et al.*, 2006).

A menor produção nas taxas de blastocisto em T2 e T3, a maior quantidade de mórulas obtidas em T2 e por não haver diferença significativa na taxa de clivagem entre os tratamentos, neste trabalho, pode evidenciar o efeito benéfico de alguns componentes do SFB que são importantes na compactação e transformação de mórula em blastocisto (WANG *et al.*, 1997; RIZOS *et al.*, 2003; SARGIKAYA *et al.*, 2007). Além do mais, o melhor desempenho de embriões que em D6,5 alcançaram o estágio de BX apontam para a mesma evidência: embriões que atingem estágios avançados do desenvolvimento, mais cedo possuem melhor qualidade – o que é normalmente atribuído ao soro. O aumento da criotolerância pode ter sido devido ao efeito estimulatório do soro na divisão celular embrionária (MEN *et al.*, 2005). Neste estudo, além da menor produção de blastocistos, o tratamento suplementado apenas com BSA não mostrou diferença quando comparado ao tratamento controle (adicionado de SFB) em termos de criotolerância e expressão da maioria dos genes, exceto para o *ACAT-2* – o qual se diferenciou devido à composição protéica do meio.

De forma geral, os genes expressos pelo T3 e T2, tiveram menor e maior expressão – respectivamente, mesmo quando não foram significativamente considerados diferentes dos demais tratamentos. Esses dados sugerem que a produção suplementada com SFB (T1) não é tão prejudicial ao desenvolvimento embrionário, como tem sido relatado freqüentemente. Além do mais, este tratamento produziu quantidade significativamente superior aos demais sistemas.

A variabilidade varia muito entre os relatos e as condições nas quais os embriões são produzidos. É necessário que um mesmo laboratório, use a mesma metodologia testando diferentes composições de meios, distintos tipos de suplementações, diversos testes de tolerância ao estresse, sob condições semelhantes para que se alcance um desfecho mais concreto quanto aos fatores aqui analisados.

## 10. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos neste estudo e aqui apresentados, conclui-se que existe interação qualitativa e quantitativa dos diferentes tipos de proteínas utilizadas na PIV de embriões bovinos. Porém, discorda da hipótese levantada – de que embriões produzidos na ausência de soro são melhores quanto à qualidade e criotolerância.

Uma vez que o sistema de produção com suplementação de SFB produziu maior quantidade de embriões, mais precocemente e estes não apresentaram diferença na qualidade das estruturas produzidas quanto à criotolerância e expressão dos genes avaliados, pode-se afirmar que os constituintes séricos não são tão prejudiciais ao desenvolvimento embrionário, como tem sido relatado freqüentemente.

No entanto, devido à alta variabilidade entre os relatos e as condições nas quais os embriões são produzidos, é necessário que haja outros testes – diferentes composições de meios, distintos tipos de suplementações, diversos testes de tolerância ao estresse, taxas de prenhez e reabsorção embrionária/fetal – sob condições semelhantes, isto é, seguindo-se um mesmo protocolo, para que se alcance um desfecho mais concreto quanto aos fatores aqui analisados.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, A., & SIRARD, M. (2005). Protein kinases influence bovine oocyte competence during short-term treatment with recombinant human follicle stimulating hormone. *Reproduction*, 130, 303-310.
- ALI, A., & SIRARD, M.-A. (2002). Effect of the Absence or Presence of Various Protein Supplements on Further Development of Bovine Oocytes During In Vitro Maturation. *Biology of Reproduction*, 66, 901-905.
- ALIKANI, M., SADOWY, S., & COHEN, J. (2002). Human embryo morphology and developmental capacity. In: A. VAN SOOM, & M. BOERJAN, *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques* (pp. 1-31). Dordrecht, Netherlands: Kluwer's Academic Publishers.
- AVERY, B., & GREVE, T. (1995). Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*, 44, 871-878.
- AYOUB, M., & HUNTER, A. (1993). Inhibitory Effect of Bovine Follicular Fluid on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes. *Journal Dairy Science*, 76, 95-100.
- BOONKUSOL, D., GAL, A., BODO, S., GORHONY, B., KITIYANANT, Y., & DINNYÉS, A. (2006). Gene Expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 700-708.
- CARNEGIE, J. A., MORGAN, J., McDIARMID, N., & DURNFORD, R. (1999). Influence of protein supplements on the secretion of LIF by mitomycin-pretreated Vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocysts with high cryotolerance. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 41-48.
- CHANDRAKANTHAN, V., LI, A., CHAMI, O., & O'NEILL, C. (2006). Effects of in vitro fertilization and embryo culture on TRP53 and Bax expression in B6 mouse embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4 (61).
- CHO, S.-K., CHO, S.-G., BAE, I.-H., PARK, C.-S., & KONG, I.-K. (2002). Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*, 73, 151-158.
- CORÊA, G., RUMPF, R., MUNDIM, T., FRANCO, M., & DODE, M. (2008). Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, 104 (2-4), 132-142.

- CORCORAN, D., FAIR, T., PARK, S., RIZOS, D., PATEL, O. V., SMITH, G. W., et al. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Society for Reproduction and Fertility*, 1741–7899 (on line version).
- DAS, A., DAVIS, M. A., & RUDEL, L. L. (Downloaded from www.jlr.org by on June 4, 2008). Identification of putative active site residues of acyl-Coenzyme A:cholesterol acyl-transferase enzymes. *Journal of Lipid Research* , 34p.
- DING, J., WU, Z., CRIDER, B. P., MA, Y., LI, X., SLAUGHTER, C., et al. (2000). Identification and Functional Expression of Four Isoforms of ATPase II, the Putative Aminophospholipid Translocase - effect of isoform variation on the atpase activity and phospholipid specificity. *The Journal of Biological Chemistry* , 275 (30), 23378-23386.
- DINNYÉS, A., MENG, Q., POLGAR, Z., BOONKUSOL, D., & SOMFAI, T. (2006). Criopreservação de Embriões de Mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl 1), pp. 171-190. UFRGS.
- DODE, M. A. (2006). Avanços na Maturação Ovocitária em Bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl 1), pp. 115-130. UFRGS.
- DODE, M., & ADONA, P. (2001). Developmental capacity of bos indicus oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. *Animal Reproduction Science*, 65, 157-170.
- DODE, M., & RUMPF, R. (2002). Produção in vitro de embriões na espécie bovina. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento* (26), 32-37.
- DODE, M., MATTOS, L., & RUMPF, R. (2002-a). In vitro production of embryos in SOF medium under high oxygen tension. *Theriogenology* , 57, 661 (abstract).
- DODE, M., RODOVALHO, N., UENO, V., & FERNANDES, C. (2002-b). The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science* , 69, 15-23.
- ECKERT, J., & NIEMANN, H. (1995). In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* , 43 (7), 1211-1225.
- EDWARDS, J., KING, W., KAWARKY, S., & EALY, A. (2001). Responsiveness Of Early Embryos To Environmental Insults: Potential Protective Roles Of Hsp70 And Glutathione. *Theriogenology* , 55, 209-223.
- EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN, D., THOLEN, E., et al. (2006). Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* , 28, 84-96.
- ENRIGHT, B., LONERGAN, P., DINNYÉS, A., FAIR, T., WARD, F., YANG, X., et al. (2000). Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology* , 54, 659-673.
- GEORGE, F., VRANCKEN, M., VERHAEGHE, B., VERHOEYE, F., SCHNEIDER, Y.-J., MASSIP, A., et al. (2006). Freezing of in vitro produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. *Theriogenology* , 66, 1381-1390.

- GOMEZ, E., & DIEZ, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science* , 58, 23-37.
- GONÇALVES, P., VISINTIN, J., OLIVEIRA, M., de MONTAGNER, M., & COSTA, L. d. (2002). Produção de Embriões in vitro. In: P. GONÇALVES, J. d. FIGUEIREDO, & V. d. FREITAS, *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal* (pp. 195-226). São Paulo, SP, Brasil: Varela.
- GUÉRIN, P., MOUATASSIN, S. E., & MÉNÉZO, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* , 7 (2), 175-189.
- HYTTELL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., & GREVE, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* , 47, 23-32.
- KESKINTEPE, L., & BRACKETT, B. (1996). In Vitro Developmental Competence of In Vitro-Matured Bovine Oocytes Fertilized and Cultured in Completely Defined Media. *Biology of Reproduction* , 55, 333-339.
- KUSHWAHA, R., ROSILLO, A., RODRIGUEZ, R., & MCGILL Jr, H. (2005). Expression levels of ACAT1 and ACAT2 genes in the liver and intestine of baboons with high and low lipemic responses to dietary lipids. *Journal of Nutritional Biochemistry* , 16, 714-721.
- LECHNIAK, D. (2002). Quantitative aspect of gene expression analysis in mammalian oocytes and embryos. *Reproductive Biology* , 2 (3), 229-241.
- LEQUARRE, A., VIGNERON, C., RIBAUCCOUR, F., HOLM, P., DONNAY, I., DALBIESTRAN, R., et al. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* , 63, 841-859.
- LIM, K., JANG, G., KO, K., LEE, W., PARK, H., KIM, J., et al. (2007). Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal Reproduction Science* , doi 10.1016, 1-10.
- LIN, S., LU, X., CHANG, C., & CHANG, T. (2003). Human Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells: Membrane Topology and Active Site Location. *Molecular Biology of the Cell* , 14, 2447-2460.
- LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., & EVANS, A. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* , 65, 137-152.
- LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M., & GORDON, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development* , 37, 48-53.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ, A. A., FAIR, T., & BOLAND, M. (2003). Oocyte and embryo quality effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Domest Animals* , 38, 259-267.
- LOPATAROVA, M., CECH, S., HOLY, L., & DOLEZEL, R. (2006). The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. *Veterinarni Medicina* , 51 (9), 454-460.

- LUCIANO, A., LODDE, V., & BERETA, M. (2005). Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-cultured system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and glutathione. *Molecular Reproduction Development* , 71, 389-397.
- MASTROMONACO, G., SEMPLE, E., ROBERT, C., RHO, G., BETTS, D., & KING, W. (2004). Different culture media requirements of IVF and nuclear transfer bovine embryos. *Reproduction of Domestic Animal* , 39, 462-467.
- MATSUDA, D., OHTE, S., OHSHIRO, T., JIANG, W., RUDEL, L., HONG, B., et al. (2008). Molecular Target of Piperine in the Inhibition of Lipid Droplet Accumulation in Macrophages. *Biol. Pharm. Bull* , 31 (6), 1063-1066.
- MEN, H., AGCA, Y., CRITSER, E., & CRITSER, J. (2005). Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology* , 64, 1340-1349.
- MENDES Jr, J., BURNS, P., SANCHES, J. d., & SEIDEL Jr, G. (2003). Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* , 60, 331-340.
- MERTON, E., de ROOS, A., MULLAART, E., de RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P., et al. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* , 59, 651-674.
- MEZZALIRA, A., & VIEIRA, A. D. (2006). Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl 1), pp. 191-196. UFRGS.
- MORTIMER, D. (1994). Sperm Recovery Techniques to Maximize Fertilizing Capacity. *Reproduction, Fertility and Development* , 6, 25-31.
- MUCCI, N., ALLER, J., KAISER, G., HOZBOR, F., CABODEVILA, J., & ALBERIO, R. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* , 65, 1551-1562.
- NAGAI, T. (2001). The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* , 55, 1291-1301.
- NEDAMBALE, T., DINNYÉS, A., GROEN, W., DOBRINSKY, J., TIAN, X., & YANG, X. (2004-a). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology* , 62, 437-449.
- NEDAMBALE, T., DINNYÉS, A., YANG, X., & TIAN, X. (2004-b). Bovine Blastocyst Development In Vitro: Timing, Sex, and Viability. *Biology of Reproduction* , 71, 1671-1676.
- NEDAMBALE, T., DU, F., YANG, X., & TIAN, X. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with B-mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science* , 93, 61-75.
- NURSE, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 344, 503-508.

- OLIVEIRA, A. T., LOPES, R., & RODRIGUES, J. (2006). Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. *Reproduction of Domestic Animals* , 41, 129-136.
- PALASZ, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., BELTRAN-BREÑA, P., PEREZ-GARNELO, S., MARTINEZ, M., GUTIERREZ-ADAN, A., et al. (2006). Effects of Hyaluronan, BSA e Serum on Bovine Embryo In Vitro Development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Molecular Reproduction and Development* , 73, 1503-1511.
- PALMA, G. (2001). Producción in vitro de Embriones Bovinos. In: G. PALMA, *Bioteconología de la Reproducción*. Argentina: INTA.
- PARRISH, J., KROGENAES, A., & SUSKO-PARRISH, J. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* , 44, 859-869.
- PATERSON, J., RENKEMA, K., BURDEN, L., HALLECK, M., SCHLEGEL, R., WILLIAMSON, P., et al. (2006). Lipid Specific Activation of the Murine P4-ATPase Atp8a1 (ATPase II). *Biochemistry* , 45, 5367-5376.
- PAULA-LOPES, F., & HANSEN, P. (2002). Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 295, 37-42.
- PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A., & NIEMANN, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction Development* , 31, 63-67.
- PINYOPUMMINTR, T., & BAVISTER, B. D. (1991). In Vitro-Matured/In Vitro-Fertilized Bovine Oocytes Can Develop into Morulae/Blastocysts in Chemically Defined, Protein-Free Culture Media. *Biology of Reproduction* , 45, 736-742.
- PUGH, P., TERVIT, H., & NIEMANN, H. (2000). 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* , 58, 9-22.
- QUEIROZ, L. (1994). Capacitação Espermática em Bovinos. *Capacitação Espermática em Bovinos* , 46p. Uberlândia, MG, Brasil: Centro de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia.
- RIEF, S., SINOWATZ, F., STOJKOVIC, M., EINSPANIER, R., WOLF, E., & PRELLE, K. (2002). Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction* (124), 543-556.
- RIZOS, D., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PÉREZ-GARNELO, S., FUENTE, J. d., BOLAND, M., & LONERGAN, P. (2003). Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance and mRNA expression. *Biology of Reproduction* , 68, 236-243.
- RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M., ARROYO-GARCÍA, R., PINTADO, B., de la FUENTE, J., et al. (2002-b). Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction* , 66, 589-595.

- RIZOS, D., LONERGAN, P., WARD, F., DUFFY, P., & BOLAND, M. (2002-a). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction Development* , 61, 234-248.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., TIENTHAI, P., SUZUKI, K., FUNAHASHI, H., EKWALL, H., & JOHANNISSON, A. (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction Supplement* , 58, 129-145.
- RUBIO POMAR, F., TEERDS, K., KIDSON, A., COLENBRANDER, B., THARASANIT, T., AGUILAR, B., et al. (2005). Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 63, 2252-2268.
- SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., ABDULLAH, K., FIRST, N. L., PARRISH, J. J., & MEMILI, E. ( 2006 ). Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction* , 131, 895–904.
- SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N. L., PARRISH, J. J., & MEMILI, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* , 101, 225-240.
- SENBON, S., FUKUMI, Y., HAMAWAKI, A., YOSHIKAWA, M., & MIYANO, T. (2004). Bovine oocytes grown in serum-free medium acquire fertilization competence. *Journal of Reproduction and Development* , 50 (5), 541-547.
- SEO, T., OELKERS, P., GIATTINA, M., WORGALL, T., STURLEY, S., & DECKELBAUM, R. (2001). Differential Modulation of ACAT1 and ACAT2 Transcription and Activity by Long Chain Free Fatty Acids in Cultured Cells. *Biochemistry* , 40, 4756-4762.
- SERAPIÃO, R. V. (ABR/MAI/JUN de 2006). Sistemas de Cultivo e Qualidade Embrionária. *O Embrião* , pp. 4-7.
- SIRARD, M., & BLONDIN, P. (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* , 42, 417-426.
- SIRARD, M., & FIRST, N. (1988). In vitro inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biology of Reproduction* , 39, 229-234.
- SIRARD, M., COENEN, K., & BILODEAU, B. (1992). Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* , 37, 39-58.
- SIRARD, M.-A., RICHARD, F., BLONDIN, P., & ROBERT, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* , 65, 126-136.
- SONNA, L. A., FUNJITA, J., GAFFIN, S., & LILLY, C. (2002). Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *Journal of Applied Physiology* , 92, 1725-1742.
- SOUPENE, E., & KUYPERS, F. A. (2006). Identification of an erythroid ATP-dependent aminophospholipid transporter. *British Journal of Haematology* , 133, 436-438.
- TEMEL, R., HOU, L., RUDEL, L., & SHELNESS, G. (2007). ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *Journal of Lipid Research* , 48, 1618-1627.

- TESFAYE, D., LONERGAN, P., HOELKER, M., RINGS, F., NGANVONGPANIT, K., HAVLICEK, V., et al. (2007). Suppression of Connexin 43 e E-Cadherin transcripts in In vitro derived bovine embryos following culture in vitro or in vivo in the homologous bovine oviduct. *Molecular Reproduction and Development* , 74, 978-988.
- THOMPSON, J. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* , 45, 27-40.
- THOMPSON, J. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science* , 60-61, 263-275.
- VAJTA, G., RINDOM, N., PEURA, T., HELM, P., GREVE, T., & CALLESEN, H. (1999). The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* , 52, 939-948.
- VANDAELE, L., GOOSSENS, K., PEELMAN, L., & VAN SOOM, A. (2008). mRNA expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and -7 cannot be used as marker for apoptosis in bovin blastocysts. *Animal Reproduction Science* , 106, 168-173.
- VIEIRA, A., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D., LEHMKUHL, R., RUBIN, M., & VAJTA, G. (2002). Calves born after open pulled straw vitrification. *Cryobiology* , 45, 91-94.
- WANG, S., LIU, Y., HOLYOAK, G., & BUNCH, T. (1997). The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and post-cleavage stage bovine embryos culture in modified CR2 and M199 media. *Animal Reproduction Science* , 48, 37-45.
- WARZYCH, E., WRENZYCKI, C., PEIPPO, J., & LECHNIAK, D. (2006). Maturation Medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development* (DOI 10.1002/mrd), 1-10.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., CARNWATH, J., & NIEMANN, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction Development* , 53 (1), 8-18.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS, A., SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., et al. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reproduction* , 16, 893-901.
- WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., LEMME, E., KORSWE, K., & NIEMANN, H. (2004). Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science* , 82-83, 593-603.
- YANG, M., & RAJAMAHENDRAN, R. (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science* , 70, 159-169.
- YOTSUSHIMA, K., SAKAGUCHI, M., SHIMIZU, M., OKIMURA, T., & IZAIKE, Y. (2004). Effects of Fatty Acid-Free Bovine Serum Albumin and Fetal Calf Serum Supplementing

Repair Cultures on Pre- and Post-warm Viability of Biopsied Bovine Embryos Produced In Vitro. *Journal of Reproduction and Development* , 50 (4), 471-476.

YUAN, Y., VAN SOOM, A., LEROY, J., DEWULF, J., VAN ZEVEEREN, A., de KRUIF, A., et al. (2005). Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology* , 63, 2147-2163.

ZUCOLLOTO, J., OLIVEIRA, M., PEREIRA, D., RUMPF, R., & DODE, M. (2004). Influence of the growth rate and stage of development of bovine embryos produced in vitro on the pregnancy rate. *Acta Scientiae Veterinariae*. 31, p. 630. Porto Alegre: UFRGS.