**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DO SORO FETAL BOVINO E DO ETOSSULFATO DE FENAZINA
SOBRE O ACÚMULO LIPÍDICO, APOPTOSE E RESPOSTA À VITRIFICAÇÃO
EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

MATEUS JOSÉ SUDANO

BOTUCATU-SP

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DO SORO FETAL BOVINO E DO ETOSSULFATO DE FENAZINA
SOBRE O ACÚMULO LIPÍDICO, APOPTOSE E RESPOSTA À VITRIFICAÇÃO
EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

MATEUS JOSÉ SUDANO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para a
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof^a Dr^a Fernanda da
Cruz Landim e Alvarenga

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Sudano, Mateus José.

Efeito do soro fetal bovino e do estossulfato de fenazina sobre o acúmulo lipídico, apoptose e resposta à vitrificação em embriões bovinos produzidos *in vitro* / Mateus José Sudano. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Assunto CAPES: 50500007

1. Bovino - Reprodução 2. Embriões

Palavras-chave: Acúmulo lipídico; Apoptose; Criotolerância; Embriões bovinos; Etossulfato de fenazina; Soro fetal bovino

Nome do Autor: Mateus José Sudano

Título: EFEITO DO SORO FETAL BOVINO E DO ETOSSULFATO DE FENAZINA
SOBRE O ACUMULO LIPÍDICO, APOPTOSE E RESPOSTA A VITRIFICAÇÃO
EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Prof. Roberto Sartori Filho

Membro

Departamento de Zootecnia

ESALQ-USP – Piracicaba - SP

Dr. Rui Machado

Membro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Embrapa Pecuária Sudeste – CPPSE – São Carlos – SP

Data defesa: 12 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amor Andréia, aos meus pais Gilberto e Maria e aos meus irmãos Alessandra, Alexandre e Marcos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

Ao meu amor Andréia que ao longo de todos os momentos de dificuldades e incertezas sempre esteve presente, apoiando-me e amando-me e que, cada vez mais, tornou-se a minha maior certeza, definitivamente.

Aos meus pais Gilberto Luis Sudano e Maria Aparecida Risardi, pela exaustiva dedicação e empenho em minha educação, pelos exemplos que me deram e pelo amor com que sempre contei.

Aos meus irmãos Alessandra, Alexandre e Marcos, cunhados Eduardo e Sabrina, e as minhas sobrinhas Mayara e Mirela por todos os momentos compartilhados que tanto me alegraram e motivaram;

A Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, que me possibilitou uma formação diferenciada na graduação e orientou-me ao longo do mestrado, garantindo-me oportunidades que tanto valorizo. Por sua amizade, companheirismo, receptividade, paciência, incentivo e pelos ensinamentos. Muito obrigado!!

Aos professores da minha Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado Dr. Roberto Sartori Filho, um grande exemplo de professor e pesquisador, que valorizo muito; e Dr. Rui Machado, um amigo, um grande parceiro de experimentos e excelente pesquisador.

Aos professores Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira e Dr^a. Maria Denise Lopes pelas ricas contribuições no meu Exame Geral de Qualificação.

A professora Dra. Luzia Aparecida Trinca pelas dúvidas esclarecidas com relação à análise estatística.

Aos professores das Disciplinas que cursei ao longo do curso do mestrado pelos excepcionais ensinamentos proporcionados.

A Daniela Martins Paschoal pela amizade, parceria e ajuda nos experimentos.

Aos amigos de Laboratório Tatiana, João, Ieda, Midian, Luis, Cely, Letícia, Camila, Taila, Tatícia, Tassiana, Henrique e os estagiários por todo auxílio e amizade ao longo do mestrado.

A Adriano Seddon que possibilitou a execução da pesquisa experimental a campo.

A Carla Bianchini Ponchirolli, Elen S. C. Siqueira Pyles, e Claudia Barbosa Fernandes pela amizade e todos os conhecimentos compartilhados quando ingressei no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular e durante minhas iniciações científicas.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal Dr. Sony Dimas Bicudo, Dr. Marco Antonio Alvarenga, Dr. Frederico Ozanam Papa, Dr. Cezinande de Meira, Dr. Nereu Carlos Prestes e Dr^a. Eunice Oba pelos ensinamentos e amizade.

A Rosemary Cristina da Silva (Meire) pela amizade, atenção e paciência na correção das minhas referências bibliográficas.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Raquel, Walter, Cristina, Edílson, Cida, e Zé Luis por todo auxílio e ajuda fundamental.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (bolsa de mestrado e auxílio pesquisa) na elaboração desta dissertação.

**“É caminhando
Que se faz o caminho...”
Enquanto houver sol - Sérgio Britto - Titãs**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média ($\pm$ erro padrão) das diferentes concentrações de SFB e do uso do PES sobre porcentagem de clivagem, de blastocistos/ oócitos, de blastocistos/ estruturas clivadas, e os escores do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos blastocistos.	57
Tabela 2: Efeito principal do SFB e do PES sobre a média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem de clivagem, de blastocistos/ oócitos, de blastocistos/ estruturas clivadas, e os escores do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos blastocistos.	58
Tabela 3: Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células e de células apoptóticas dos blastocistos frescos e aquecidos, e da porcentagem de Re-expansão dos diferentes grupos.	66
Tabela 4: Efeito principal do SFB e do PES sobre a média ($\pm$ erro padrão) do número total de células e células apoptóticas dos blastocistos frescos e aquecidos, e da porcentagem de re-expansão.	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da contribuição relativa da glicólise no estágio de desenvolvimento inicial e na compactação embrionária e formação da blastocele.....	25
Figura 2: Modelo hipotético do gradiente de O ₂ nos estágios das primeiras clivagens (desenvolvimento inicial) e pós-compactação durante o desenvolvimento embrionário <i>in vivo</i>	26
Figura 3: Mecanismo de ação do EDTA, NaN ₃ , Cerulenin, DNP e PES.....	30
Figura 4: Representação esquemática dos eventos morfológicos e bioquímicos envolvidos no processo da apoptose	39
Figura 5: Delineamento Experimental em fatorial 4x3.....	46
Figura 6: Grade para quantificação lipídica dos embriões através da coloração de Sudan Black B.	52
Figura 7: Montagens das palhetas de vitrificação.....	53
Figura 8: Média (± erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas dos diferentes grupos.....	59
Figura 9: Média (± erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas médias dos diferentes grupos.	60
Figura 10: Média (± erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas grandes dos diferentes grupos.....	61
Figura 11: Efeito principal das diferentes concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%) sobre a média (± erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes.....	62
Figura 12: Efeito principal dos grupos Controle, PES D2,5 e PES D4 sobre a média (± erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes	63
Figura 13: Relação entre o aumento da concentração do SFB e a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes.....	64
Figura 14: Embriões submetidos a técnica do corante lipofílico Sudan Black B dos diferentes grupos experimentais <i>in vitro</i> e grupo Controle <i>in vivo</i>	65
Figura 15: Embriões frescos dos diferentes grupos submetidos a técnica de TUNEL.	69

Figura 16: Embriões aquecidos dos diferentes grupos submetidos a técnica de TUNEL.....	70
Figura 17: Efeito do SFB e PES sobre a média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos frescos e aquecidos.....	72
Figura 18: Efeito principal do SFB sobre a porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos frescos e aquecidos.....	73
Figura 19: Relação entre a concentração do SFB e a média da porcentagem de células apoptóticas dos blastocistos frescos e aquecidos.....	74
Figura 20: Efeito principal do PES sobre a porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos frescos e aquecidos.....	75
Figura 21: Relação entre a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes e a média da porcentagem de células apoptóticas dos embriões PIV frescos.....	76
Figura 22: Relação entre a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes e a média da porcentagem de células apoptóticas dos embriões PIV aquecidos.....	76
Figura 23: Relação entre a média da porcentagem células apoptóticas dos blastocistos frescos e a média da porcentagem de células apoptóticas dos blastocistos aquecidos.....	77

SUMÁRIO

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	17
2- REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1- Sensibilidade do embrião PIV à criopreservação	20
2.2- Acúmulo lipídico embrionário	21
2.2.1- SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO EMBRIONÁRIO COM SORO FETAL BOVINO	21
2.2.2- METABOLISMO ENERGÉTICO EMBRIONÁRIO	23
2.3- Uso de reguladores metabólicos no cultivo embrionário	27
2.3.1- ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO (EDTA)	28
2.3.2- AZIDA DE SÓDIO (NaN_3)	29
2.3.3- CERULENIN	31
2.3.4- 2,4 DINITROFENOL (DNP)	32
2.3.5- ETOSSULFATO DE FENAZINA (PES)	33
2.4- Criopreservação de embriões	35
2.5- Apoptose	38
3- OBJETIVOS	42
4- HIPÓTESES	44
5- MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1- <i>Delineamento experimental</i>	46
5.2- <i>Reagentes utilizados</i>	47
5.3- <i>Maturação in vitro (MIV)</i>	47
5.4- <i>Fertilização in vitro (FIV)</i>	47
5.5- <i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	48
5.6- <i>Produção in vivo de embriões</i>	49
5.7- <i>TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling)</i>	50
5.8- <i>Quantificação de lipídeos</i>	51
5.9- <i>Vitrificação</i>	52
5.10- <i>Aquecimento e re-cultivo dos embriões</i>	53
5.11- <i>Análise Estatística</i>	53
6- RESULTADOS	56

6.1- Produção embrionária	56
6.2- Acúmulo Lipídico	58
6.3- Apoptose celular e criotolerância embrionária.....	66
7- DISCUSSÃO	79
8-CONCLUSÕES.....	89
9- CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
10- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	94
11- BIBLIOGRAFIA	96

SUDANO, M. J. **Efeito do soro fetal bovino e do etossulfato de fenazina sobre o acúmulo lipídico, apoptose e resposta à vitrificação em embriões bovinos produzidos *in vitro***. Botucatu, 2010. 107p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação de diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) e do etossulfato de fenazina (PES), no meio de cultivo durante a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. Em um experimento fatorial 4x3, quatro concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%), e três períodos de exposição ao PES (Controle, a partir do 60 horas – PES D2,5, e a partir 96 horas – PES D4, de cultivo) foram avaliados sobre o desenvolvimento, acúmulo lipídico, criotolerância, e apoptose celular de embriões frescos e aquecidos. Tomando a fertilização *in vitro* como referência (D0), no D7 uma amostra dos embriões foi submetida a coloração de Sudan Black B (quantificação do conteúdo lipídico, n=15-60), e a técnica de TUNEL (apoptose, n=15-134). Os demais embriões (n=2647) foram vitrificados, para posterior aquecimento e re-cultivo em SOFaa a 10% de SFB por 12 horas. Passado este período, os embriões aquecidos foram avaliados quanto a re-expansão da blastocle e submetidos a técnica de TUNEL. Para a análise estatística, foi realizada ANOVA seguida do teste de Tukey, ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para análise da correlação foi utilizado o teste de correlação linear de Pearson. Foi adotado o nível de significância de 5%. A elevação da suplementação do SFB no meio de cultivo embrionário aumentou ($P<0,05$) o número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes. Além disso, esta elevação do SFB reduziu ($P<0,05$) a taxa de re-expansão dos embriões vitrificados e aumentou ($P<0,05$) a taxa de apoptose dos embriões frescos e aquecidos. A adição do PES ao meio de cultivo a partir do D2,5 e a partir do D4 reduziram ($P<0,05$) o acúmulo lipídico nos embriões bovinos PIV. O uso do PES a partir do D2,5 prejudicou ($P<0,05$) o desenvolvimento embrionário e não favoreceu ($P>0,05$) a criotolerância embrionária. Entretanto, a exposição dos embriões a este fármaco a partir do D4 não afetou ($P>0,05$) o desenvolvimento embrionário e aumentou ($P<0,05$) a sobrevivência embrionária após a

vitrificação. Os resultados deste experimento indicam que o aumento do acúmulo lipídico apresenta uma forte correlação com a taxa de apoptose em embriões frescos, e uma moderada correlação com o aumento da taxa de apoptose em embriões após a vitrificação. Porém, o fator que apresentou a correlação mais elevada com a taxa de apoptose após a criopreservação foi a taxa de apoptose dos embriões frescos.

Palavras- chave: Embriões bovinos, etossulfato de fenazina, soro fetal bovino, criotolerância, apoptose, acúmulo lipídico.

SUDANO, M. J. **Effect of fetal calf serum and phenazine ethosulfate on lipid accumulation, apoptosis and vitrification response of *in vitro* produced bovine embryos**. Botucatu, 2010. 107p. Dissertação (Mestrado) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu city, São Paulo State University.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of four FCS concentrations and the use of phenazine ethosulfate (PES) in the culture media during *in vitro* production (IVP) of bovine embryos. In a 4x3 factorial experimental design, four FCS concentrations (0%, 2,5%, 5% and 10%), and three PES exposure periods (control, after 60 hours - PES D2,5, and after 96 hours - PES D4, of embryo culture) were evaluated by embryo development, lipid accumulation, cryotolerance, and fresh and warmed apoptosis. Taking the *in vitro* fertilization as reference (D0), a sample of D7 embryos was submitted to Sudan Black B stain (lipid content, n=15-60), and to TUNEL reaction (apoptosis, n=15-134). The remaining embryos (n=2647) were vitrified / warmed and re-cultured in SOFaa with 10% of FCS for 12 hours. After this period, re-expansion and warmed apoptosis rate were determined. For statistical analysis, data were tested using ANOVA followed by Tukey's test, or Kruskal-Wallis followed by Dunn's test. For correlation analysis Pearson correlation test was used. It was adopted the significance level of 5%. The raise of FCS concentration increased ($P<0.05$) the number of small, medium and large cytoplasmic lipid droplets. Moreover, this raise of FCS reduced ($P<0.05$) the re-expansion rate and increased ($P<0.05$) the fresh and warmed apoptosis rate. The addition of PES in the culture media from D2,5 and D4 reduced ($P<0.05$) the lipid accumulation. The use of PES from D2,5 affected ($P<0.05$) embryo development and did not improve ($P>0.05$) cryotolerance. However, the PES treatment that started at D4 did not affect ($P>0.05$) embryo development and increased ($P<0.05$) embryo survival after vitrification. The increase of lipid accumulation had a strong and a moderate correlation with fresh and warmed apoptosis, respectively. However, the fresh apoptosis rate had a very strong correlation with the warmed apoptosis rate.

Key Words: bovine embryos, phenazine ethosulfate, fetal calf serum, cryotolerance, apoptosis, lipid accumulation.

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, ultrapassando 200 milhões de cabeças (IBGE, 2006). Neste contexto, estudos sobre biotecnologias capazes de aperfeiçoar a produção estão em franca ascensão, principalmente no que se refere às biotécnicas da reprodução.

O país se encontra em uma situação privilegiada, sendo líder mundial e referência na PIV de embriões bovinos. Em 2005, realizou cerca de 130 mil transferências de embriões bovinos PIV, o que equivale a 48% de toda movimentação mundial. Devido sua grande capacidade de produção de descendentes, uma vez atendida a demanda interna, a PIV deverá voltar-se ainda mais para o mercado externo, particularmente pela posição do país como referência em genética bovina adaptada aos trópicos, o que exigirá um grande esforço da pesquisa para superar algumas limitações ainda inerentes à técnica, principalmente na questão da criopreservação dos embriões (VIANA e CAMARGO, 2007).

No entanto, uma característica que persiste no mercado nacional é o predomínio das transferências realizadas a “fresco” tanto na TE convencional quanto na PIV (VIANA e CAMARGO, 2007), em função dos resultados insatisfatórios obtidos com a criopreservação dos embriões zebuínos e taurinos, atingindo taxas de concepção inferiores a 30% (HASLER et al., 2003).

As técnicas de conservação de embriões em nitrogênio líquido são utilizadas em rotina para embriões PIV. Entretanto, um protocolo crioprotetor eficiente para esses embriões bovinos ainda não foi estabelecido, sendo este tema amplamente discutido dentro da área da biotecnologia da reprodução animal. A técnica mais promissora até o momento consiste na vitrificação. Esta metodologia é usada, principalmente por permitir aos meios de criopreservação uma passagem direta do estado líquido para o estado vitrificado sem que haja cristalização deste meio, tendo como objetivo principal, prevenir danos causados pelo frio, evitando a formação de cristais de gelo.

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células por tempo indeterminado. Desde o primeiro sucesso na criopreservação de embriões de mamíferos (WHITINGHAM et al., 1972), é conhecido que os embriões advindos

de sistemas de produção *in vitro* são mais sensíveis à criopreservação do que embriões produzidos *in vivo* (LEIBO e LOSKUTOFF, 1993). Tal fato pode estar relacionado a algumas diferenças entre os embriões provenientes das duas técnicas. Dentre estas parece ser particularmente importante o maior conteúdo lipídico encontrado em embriões PIV.

Estudos comprovam que o meio de cultivo embrionário é um fator determinante na qualidade dos blastocistos (RIZOS et al., 2003), e que a suplementação do meio de cultivo com soro fetal bovino (SFB) parece estar intimamente associado ao aumento do conteúdo lipídico do embrião PIV (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002).

Como os embriões produzidos *in vitro* possuem uma grande sensibilidade às baixas temperaturas provenientes da congelação, o procedimento de vitrificação está sendo cada vez mais pesquisado com o objetivo de aumentar as taxas de sobrevivência desses embriões para posterior utilização. Porém, o aperfeiçoamento oriundo das mudanças da técnica de criopreservação é obtido até certo ponto, exigindo-se também, uma mudança do próprio embrião frente a sua elevada sensibilidade à criopreservação (SEIDEL Jr, 2006).

Recentemente, diversos trabalhos sugerem um novo conceito no cultivo embrionário, o uso de fármacos não fisiológicos como reguladores metabólicos (SEIDEL Jr, 2006; DE LA TORREZ-SANCHEZ et al., 2006b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a). A suplementação do meio de cultivo com esses reguladores metabólicos alterariam o metabolismo embrionário visando diminuir o acúmulo lipídico, produzindo um embrião de melhor qualidade e com uma maior resistência aos processos de criopreservação, resultando conseqüentemente, num aumento das taxas de sobrevivência embrionária e de concepção dos embriões criopreservados.

Frequentemente, a morfologia embrionária e as taxas de clivagem e de blastocistos têm sido critérios utilizados para avaliação da competência embrionária (ALIKANI et al., 2002). Entretanto, com o advento de novas biotecnologias, tem-se tornado claro que a competência embrionária pode ser severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis. A viabilidade do embrião pode ser mensurada de outras maneiras, tais como testes de crio-resistência, imunocitoquímica, biologia molecular e do padrão de expressão gênica (WRENZYCKI et al., 2004).

REVISÃO DE LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Sensibilidade do embrião PIV à criopreservação

Ao longo da década passada, houve um grande avanço na produção *in vitro* de embriões bovinos (GARDNER e LANE, 2002), no entanto, ainda persistem diversas dificuldades na aplicação comercial desta biotecnologia. Uma das principais limitações está relacionada com anormalidades morfológicas e metabólicas do embrião PIV, o que o torna mais sensível a criopreservação, dificultando a sua conservação e comércio (KHURANA e NIEMANN, 2000).

Diversos estudos indicam que os embriões bovinos produzidos *in vitro* não sobrevivem à criopreservação como os produzidos *in vivo*. O grande acúmulo lipídico nos embriões PIV é associado com sua baixa capacidade de criopreservação (ABE et al., 2002), provocando resultados insatisfatórios após a inovulação destes, com taxas de concepção abaixo de 30% (HASLER, 2003).

Este conceito foi demonstrado primeiro em embriões suínos, em que a criotolerância foi aumentada com a retirada das gotas lipídicas a partir de uma microcirurgia dos embriões nos estágios iniciais de clivagem (NAGASHIMA et al., 1995) e com alterações nas propriedades da zona pelúcida (POLLARD e LEIBO, 1994).

Zigotos bovinos fertilizados *in vitro*, mas cultivados *in vivo* tiveram a mesma criotolerância que os embriões produzidos inteiramente *in vivo* (RIZOS et al., 2002; LONERGAN et al., 2003). Entretanto, os embriões produzidos inteiramente *in vitro* têm a menor criotolerância (RIZOS et al., 2002; LONERGAN et al., 2003), sugerindo que a redução na criotolerância parece estar associada às alterações nas condições do cultivo embrionário bem como a quantidade de lipídios dos embriões.

O mecanismo específico em que o acúmulo lipídico em embriões produzidos *in vitro* altera a sua criotolerância é desconhecido, no entanto, está relacionado com o conteúdo de lipídio citoplasmático (ABE et al., 2002). De acordo com Seidel Jr (2006), um possível mecanismo para a redução da criotolerância dos embriões PIV é a peroxidação dos lipídios, que é acentuada pelo processo de criopreservação, resultando num aumento dos radicais livres oriundos da deteriorização de lipídios poliinsaturados (BEITZ, 1996). Portanto, a elevação do

conteúdo lipídico nos embriões pode aumentar a produção de radicais livres estimulando o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b).

Outra possível explicação é que o uso do SFB pode promover a incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol na membrana embrionária, fazendo com que ela fique menos permeável e mais rígida, explicando a grande susceptibilidade do embrião PIV frente à criopreservação (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b).

2.2- Acúmulo lipídico embrionário

Nos mamíferos, os ácidos graxos são sintetizados no citosol celular lipogênico a partir da Acetil-CoA, uma substância que pode originar-se de carboidratos e aminoácidos, bem como de ácidos graxos. A Acetil-CoA em uma seqüência de reações origina o palmitato, o principal ácido graxo produzido (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005). Através de reações de alongamento, dessaturação e hidroxilação, outros ácidos graxos são formados a partir de modificações do palmitato (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005).

Nos embriões produzidos *in vitro* ainda não se sabe ao certo como é que ocorre o acúmulo de lipídio citoplasmático, no entanto, acredita-se que este acúmulo ocorra em função da suplementação do meio de cultivo com SFB (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b), ou então devido a uma anormalidade do metabolismo energético embrionário ("Crabtree effect"), levando a um desbalanço das vias metabólicas (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

2.2.1- SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO EMBRIONÁRIO COM SORO FETAL BOVINO

A maioria dos meios usados para o desenvolvimento embrionário contém soro ou albumina sérica bovina (BSA) como fonte de proteína. É esperado que o soro forneça substrato energético, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados, entretanto, a presença e a concentração desses componentes variam entre as diferentes partidas (MUCCI et al., 2006).

Apesar de o SFB ter propriedades desejáveis, sua utilização tem sido associada à ocorrência da síndrome do neonato grande (*large offspring syndrome*) (LAZZARI et al., 2002), alterações metabólicas e acúmulo excessivo de lipídio (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b), anormalidades nas organelas (ABE et al., 1999, 2002), incluindo degeneração mitocondrial (DORLAND et al., 1994), ocorrência prematura da formação da blastocle (HOLM et al., 2002), e redução da sobrevivência embrionária após o descongelamento (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006).

O SFB pode ser ainda fonte de vírus patogênicos, e normas internacionais de transporte de embriões estão voltadas para a eliminação de produtos de origem animal dos meios embrionários (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b).

Diversos estudos demonstraram que o soro possui um efeito bifásico. A presença do soro pode inibir as primeiras divisões da clivagem, enquanto que posteriormente ele pode acelerar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002, 2003; ENRIGHT et al., 2000).

O mecanismo e a fonte do acúmulo lipídico citoplasmático em embriões bovino cultivados na presença de soro ainda não estão esclarecidos. Especulam-se alguns mecanismos que explicariam este evento, dentre eles pode-se citar: a) as lipoproteínas presentes no soro poderiam ser internalizadas pelas células embrionárias aumentando o conteúdo lipídico citoplasmático (SATA et al., 1999; ABE e HOSHI, 2003), b) a presença do soro alteraria a β -oxidação em função de uma disfunção mitocondrial (DORLAND et al., 1994; CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002), e c) o embrião seria induzido a realizar uma neo-síntese de triglicerídeos em função da presença do soro (RAZEK et al., 2000).

Sabe-se que os triglicerídeos são os lipídios mais comuns incluídos nas células, e que o seu acúmulo nos embriões é oriundo da presença de SFB (FERGUSON e LEESE 1999). Estima-se que blastocistos bovinos oriundos de sistemas de cultivo com a suplementação de 10% SFB possuam 62 ng de triglicerídeos, já os oriundos de sistemas livres de soro possuem apenas 36 ng (FERGUSON E LEESE, 1999), sugerindo-se que a fonte dos lipídios sejam as próprias lipoproteínas do soro (ABE et al., 2002).

Sata et al., (1999) demonstraram que a suplementação de 5% de soro no meio de cultivo resulta no aumento da composição dos ácidos graxos

saturados palmítico e esteárico, e os monoinsaturados oléico e palmitoléico, em blastocistos bovinos.

A presença de grandes quantidades de gotas lipídicas em embriões PIV em meios suplementados com soro, provavelmente prejudica os mecanismos celulares responsáveis pelo reparo da membrana plasmática após a criopreservação. A adição de soro pode promover a incorporação de ácidos graxos saturados na membrana plasmática, induzindo provavelmente a mudanças na composição da membrana plasmática, fazendo ela se tornar mais rígida, e incapaz de resistir à criopreservação (MUCCI et al., 2006).

Comparando a produção *in vitro* com a produção *in vivo* de embriões bovinos, elas exibem diferenças estruturais que podem ter sido resultado do sistema de cultivo utilizado. Alguns autores sugerem que o aumento no conteúdo lipídico dos embriões PIV é oriundo da suplementação do meio de cultivo com soro (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002) ou ainda resultante do metabolismo insuficiente da mitocôndria através da inabilidade de metabolizar complexos lipídicos através da β -oxidação (DORLAND et al., 1994).

A utilização de meios quimicamente definidos, sem a adição do SFB ou BSA, é uma alternativa para a produção *in vitro* de embriões bovinos visando à retirada de produtos de origem animal do meio de cultivo e o aumento da sobrevivência embrionária após a vitrificação (KESKINTEPE AND BRACKETT, 1996). Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007b) demonstraram que também é possível a PIV de embriões bovinos na ausência de SFB sem afetar a produção ou qualidade dos blastocistos, assim como foi observado por Mucci et al. (2006), em que embriões bovinos cultivados na ausência de soro tiveram melhores taxas de sobrevivência embrionária após a vitrificação.

2.2.2- METABOLISMO ENERGÉTICO EMBRIONÁRIO

As células animais podem produzir energia gerando adenosina trifosfato (ATP) basicamente por duas vias metabólicas: a) conversão da glicose em piruvato, através da glicólise, e b) oxidação dos substratos piruvato ou oxalacetato, via ciclo de Krebs/fosforilação oxidativa (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005).

Geralmente, embriões durante o período de desenvolvimento inicial, pré-compactação, são dependentes da fosforilação oxidativa via oxidação do piruvato e aminoácidos para gerar ATP necessário (THOMPSON et al., 2000). Entretanto, existe uma mudança na importância da glicólise no período de compactação e formação da blastocle, aumentando a sua contribuição para a produção de ATP (THOMPSON et al., 2000) (Figura 1).

Durante o desenvolvimento inicial, o metabolismo energético é relativamente baixo. Estima-se que aproximadamente 90% de todo ATP é derivado da oxidação, principalmente via fosforilação oxidativa (THOMPSON et al., 1996). Já no estágio de compactação e formação da blastocle, a demanda por ATP aumenta para acompanhar o aumento da síntese protéica (THOMPSON et al., 1998) e da atividade dos sistemas de transportes de íons, destacando a bomba de Na^+/K^+ envolvida na formação da blastocle (THOMPSON et al., 2000).

O aumento na demanda de ATP causa um aumento no consumo de substratos, incluindo oxigênio e piruvato (THOMPSON et al., 1996), aminoácidos (PARTRIDGE e LEESE, 1996), e glicose (THOMPSON et al., 1996). Porém, em embriões de ruminantes a maioria da glicose é metabolizada no estágio de blastocisto via glicólise, sendo o lactato o produto final (THOMPSON et al., 2000). Apenas uma pequena quantidade de glicose é oxidada na via da pentose-fosfato para a formação de ribose, em vez da via do ciclo de Krebs (THOMPSON et al., 1996).

Figura 1: Representação da contribuição relativa da glicólise no estágio de desenvolvimento inicial (a) e na compactação embrionária e formação da blastocle (b). Nota-se que no estágio inicial do desenvolvimento (a) o consumo da glicose é reduzido sendo representado por uma linha menos destacada, enquanto que o piruvato é o substrato preferencial. Por outro lado em (b), a utilização da glicose nos estágios de compactação e formação da blastocle aumenta, assim como o uso do piruvato, acompanhando o aumento da demanda de ATP neste estágio de desenvolvimento. Adaptado Thompson (2000).

Outro fator envolvido no controle do metabolismo energético embrionário é o oxigênio (HARVEY et al., 2002). O oxigênio é essencial para a conversão de ADP em ATP na fosforilação oxidativa, sendo um receptor de elétrons na cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, o uso do oxigênio como um substrato energético também resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^-). As ROS são altamente ativas como receptores de elétrons, e capazes de tirar elétrons de outras moléculas que, por sua vez, se tornam radicais livres (HARVEY et al., 2002).

A concentração de O_2 no oviduto é de aproximadamente 8% (LEESE, 1995) e parece que o ambiente uterino tem ainda uma menor concentração de O_2 (FISCHER e BAVISTER, 1993). Portanto, os embriões encontram uma

redução no gradiente de O_2 com o seu progresso ao longo do trato reprodutivo (HARVEY et al., 2002) e, de acordo com Leese (1995), durante o estágio de implantação inicial, condições de hipóxia e até anóxia estão presentes (Figura 2), indicando um ambiente mais favorável para a atividade glicolítica no útero (HARVEY et al., 2002).

Figura 2: Modelo hipotético do gradiente de O_2 nos estágios das primeiras clivagens (desenvolvimento inicial) e pós-compactação durante o desenvolvimento embrionário *in vivo*. Nas primeiras clivagens os blastômeros, individualmente, encontram um gradiente mínimo de O_2 . Entretanto, no estágio de pós-compactação os embriões encontram no útero uma concentração de O_2 muito reduzida (hipóxia), podendo ser potencializado devido à relação espacial dos blastômeros (anóxia). Adaptado Harvey et al.(2002).

Segundo Gardner et al. (2000) o metabolismo da glicose nos estágios de pré e pós-compactação é anormal em embriões produzidos *in vitro*, apresentando o “*Crabtree effect*”, definido por Bavister (1995) como sendo um excesso da metabolização da glicose, via glicólise, com uma conseqüente inibição da fosforilação oxidativa nos embriões produzidos *in vitro*.

Diferentemente do observado *in vitro*, os embriões produzidos *in vivo* não apresentam esta alteração do perfil metabólico da glicose, já que no ambiente fisiológico acredita-se que exista um regulador natural da glicólise inibindo este processo (BAVISTER, 1995).

Porém, nas condições do cultivo *in vitro*, os embriões perdem este regulador natural da glicólise e mostram excesso na atividade da via glicolítica e, na presença de grande tensão de oxigênio, a metabolização da glicose aumenta ainda mais (glicólise aeróbica) (KHURANA e NIEMANN, 2000).

Embriões que metabolizam uma grande quantidade de glicose podem comprometer a sua capacidade de desenvolvimento (KRISHER et al., 1999). Uma possível explicação é que sob estas condições, uma quantidade muito pequena de glicose é destinada para a via pentose-fosfato, já que esta via tem um importante papel na biossíntese embrionária (WALES e HUNTER 1990), fornecendo ao embrião a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADPH); que atua na síntese das membranas celulares e possui função antioxidante reduzindo a glutatona intracelular; e a ribose-5-fosfato, que é requerida para a síntese dos ácidos nucleicos (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005).

A estimulação excessiva da glicólise pode levar ao aumento da concentração dos precursores da síntese de proteínas e lipídios (RIEGER et al., 2002), favorecendo, não apenas a síntese protéica, mas também a formação de lipídios citoplasmáticos nos embriões produzidos *in vitro* (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a). Além disso, a ocorrência da glicólise em excesso pode resultar no desbalanço do estado de redução-oxidação dos embriões (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a), levando ao distúrbio da função mitocondrial e resultando no acúmulo lipídico embrionário (DORLAND et al., 1994).

2.3- Uso de reguladores metabólicos no cultivo embrionário

De acordo com SEIDEL Jr (2006) há duas maneiras para melhorar a sobrevivência embrionária após a criopreservação. a) Uma maneira é modificando os métodos de criopreservação, por exemplo, variando a concentração e o tipo do crioprotetor, estudando diferentes tempos e temperaturas dos procedimentos de criopreservação, e usando aditivos como açúcares e surfactantes. Apesar de geralmente essas mudanças levarem à melhora na sobrevivência embrionária, o avanço na criotolerância do embrião frente às mudanças dos métodos de criopreservação é limitado. b) Uma maneira alternativa é a mudança do próprio embrião, tornando-os mais resistentes à criopreservação.

Um novo conceito do cultivo embrionário é a utilização de compostos não fisiológicos para regular o metabolismo embrionário e favorecer o seu desenvolvimento. Isto inclui a adição de agentes farmacológicos ao meio de cultivo para corrigir aberrações do perfil metabólico dos embriões (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b).

Dentre os reguladores metabólicos já estudados pode-se citar: o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a azida de sódio (NaN_3), o cerulenin, o 2,4 dinitrofenol (DNP) e o etossulfato de fenazina (PES) (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

2.3.1- ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO (EDTA)

Talvez o melhor exemplo de regulador metabólico seja o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um quelante não seletivo de cátions divalentes utilizado durante o desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000).

A adição do EDTA ao meio de cultivo reduz a glicólise em embriões no estágio de desenvolvimento inicial e evita o efeito prejudicial do excesso de glicose nos embriões jovens de diversas espécies (OLSON e SEIDEL JR, 2000). Thompson et al. (1992) relataram que quando as concentrações *in vitro* de glicose são maiores que as *in vivo*, o desenvolvimento embrionário inicial é retardado ou bloqueado. Isto é associado com o “Crabtree effect”, em que a fosforilação oxidativa é inibida durante uma alta e anormal taxa glicolítica (BAVISTER, 1995).

Anteriormente, este efeito era controlado com a redução da concentração ou eliminação da glicose do meio de cultivo (CHATOT et al., 1989). Entretanto, esta condição não é fisiológica, já que a glicose é encontrada no fluído do lúmen do trato reprodutivo (GARDNER, 1998).

A suplementação do EDTA no meio de cultivo estimula a produção de blastocistos, possivelmente porque inibe a glicólise se ligando aos íons de Mg^{++} , uma vez que estes íons são necessários para as enzimas quinases envolvidas na glicólise (LANE e GARDNER, 1997) (Figura 3).

Porém, a suplementação do EDTA é favorável apenas quando introduzido durante o desenvolvimento inicial, em que altas taxas glicolíticas comprometem

o desenvolvimento embrionário (THOMPSON, 2000). Segundo Olson e Seidel Jr (2000), a suplementação do meio de cultivo com 3-5 μM de EDTA no estágio de desenvolvimento inicial aumenta em 13% as taxas de desenvolvimento embrionário.

2.3.2- AZIDA DE SÓDIO (NaN_3)

A NaN_3 é um agente inibitório da enzima 3-citocromo oxidase da cascata de transporte de elétrons que aumenta o desenvolvimento embrionário por regular a produção mitocondrial de ATP (DE LA TORRE-SANCHEZ e SEIDEL JR, 2002; MACHÁTY et al., 2001; THOMPSON et al., 2000) (Figura 3). De La Torre-Sanchez et al. (2006b) propuseram que a sua utilização no estágio de pós-compactação embrionária favorece a utilização da glicose pela via pentose-fosfato ao invés da glicólise.

Figura 3: Mecanismo de ação do EDTA, NaN_3 , Cerulenin, DNP e PES. 1- EDTA indisponibilizando os íons de Mg^{++} das enzimas glicolíticas. 2- NaN_3 bloqueia a enzima 3-citocromo oxidase no complexo IV da cadeia de transporte de elétrons. 3- Cerulenin inibindo a síntese de ácidos graxos (SAG). 4- DNP se ligando a prótons e dissipando o gradiente de H^+ do espaço intermembrana da mitocôndria formado pela cadeia de transporte de elétrons. 5- PES oxida o NADPH em NADP^+ estimulando a via Pentose-Fosfato (PPP). Fonte: Adaptado Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a).

A azida de sódio pode ser também benéfica ao embrião, por favorecer um estado mais apropriado de redução-oxidação (THOMPSON et al., 2000). Segundo Harvey et al. (2002), uma alteração da redução-oxidação devido a condições inadequadas de cultivo, provavelmente modifica a produção de ATP e também pode ter efeitos nocivos na expressão gênica, com conseqüências no desenvolvimento embrionário após a transferência.

De acordo com Thompson et al. (2000), a adição da NaN_3 no cultivo embrionário aumenta o consumo da glicose sem um aumento significativo na produção de lactato via glicólise, o que sustenta a idéia de que a inibição parcial da produção mitocondrial de ATP cria um estado de redução-oxidação mais

favorável, e isso em parte aumenta a disponibilidade de produtos intermediários da metabolização da glicose para outras vias biossintéticas como a via da pentose-fosfato.

Concentrações não tóxicas de NaN_3 (5-10 μM) presentes no meio de cultivo do quinto ao sétimo dia de desenvolvimento (pós-compactação embrionária) estimularam o desenvolvimento embrionário, aumentando a proporção de mórula compacta e blastocisto de 50% para 60%, com um aumento similar na qualidade dos embriões transferíveis (40% para 50%) (THOMPSON et al., 2000).

No trabalho realizado por Macháty et al. (2001) o uso de 10-20 μM NaN_3 no meio de cultivo durante a compactação embrionária de embriões suínos (no 4º dia de cultivo) possui efeito favorável, provavelmente pela contribuição da produção glicolítica de ATP vs. produção mitocondrial de ATP, estabelecendo um estado apropriado de redução-oxidação o que favorece o metabolismo da glicose. Porém, a frequência de formação de blastocisto suíno não aumentou significativamente com o uso de NaN_3 , mas constatou-se um aumento na média do número de células por embrião (MACHÁTY et al., 2001).

De La Torre-Sanchez et al. (2006b) verificaram que o uso de 27 μM de NaN_3 no estágio de pós-compactação embrionária reduz a utilização da glicose via glicólise, mas não resultou em uma redução do acúmulo lipídico embrionário, assim como não aumentou o uso da glicose pela via da pentose-fosfato, apesar de obterem taxas de produção de blastocisto ao redor de 41%. Acredita-se que a dose de 27 μM de NaN_3 foi alta e resultou em um desbalanço no estado de redução-oxidação, provocando um distúrbio na função mitocondrial favorecendo o acúmulo lipídico embrionário (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b).

2.3.3- CERULENIN

O cerulenin é uma micotoxina que inibe a síntese de lipídios e reduz a produção de ATP, como já foi relatado em neurônios (LANDREE et al., 2004 apud BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a) (Figura 3). No entanto, segundo Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a), o uso desta micotoxina para a redução do acúmulo de lipídios em embriões bovinos não é eficaz devido ao fato da cerulenin

ser tóxica para os embriões, uma vez que a dose não tóxica para o embrião (1 $\mu\text{g/mL}$) não é capaz de bloquear a síntese de ácidos graxos. A dose de 3 $\mu\text{g/mL}$ de cerulenin reduz em 32% a produção de blastocistos e, aumentando a dose de cerulenin para 10 ou 50 $\mu\text{g/mL}$, leva a degeneração de todos os embriões (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a).

2.3.4- 2,4 DINITROFENOL (DNP)

O DNP é um ácido fraco lipofílico que se liga a prótons no espaço intermembrana da mitocondria e inibe severamente a produção mitocondrial de ATP, separando o transporte de elétrons do fluxo de prótons (RIEGER et al., 2002), como resultado, a energia da transferência de elétrons não pode ser usada para a síntese de ATP, inibindo a fosforilação oxidativa (VOET e VOET, 1995 apud BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a) (Figura 3).

Isto favorece o metabolismo da glicose sem ocasionar efeitos tóxicos ao embrião (THOMPSON et al., 2000; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b). O mecanismo exato dos efeitos benéficos do DNP não está totalmente esclarecido. Acredita-se que a inibição parcial da produção mitocondrial de ATP pode induzir a um estado mais suave de redução-oxidação do embrião que favorece o metabolismo glicolítico (MACHÁTY et al., 2001), porém a glicose é utilizada de outras maneiras sem ser a produção de lactato (THOMPSON e PETERSON, 2000).

De La Torre-Sanchez et al. (2006b) propuseram que a utilização do DNP no estágio de pós-compactação embrionária favorece a utilização da glicose pela via pentose-fosfato ao invés da glicólise.

Existem relatos de efeitos positivos do uso do DNP durante o período de cultivo embrionário em diferentes espécies e em várias concentrações (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a). Em embriões bovinos 10-30 μM de DNP aumentam o consumo de glicose (THOMPSON et al., 2000; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a), aumentam o número de células dos embriões (THOMPSON et al., 2000), e aumentam a taxa de produção de blastocistos (THOMPSON et al., 2000; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b). Entretanto, embriões bovinos cultivados em 90 μM de DNP possuem um desenvolvimento mais lento e uma aparência mais escura do que os embriões produzidos em

doses menores (10-30 μ M) (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b). Já em uma dose de 100 μ M de DNP reduz o desenvolvimento embrionário, e em uma dose de 1.000 μ M de DNP bloqueia o desenvolvimento embrionário (THOMPSON et al., 2000).

Segundo Macháty et al. (2001) a utilização de DNP no meio de cultivo no estágio de compactação embrionária de embriões suínos, além de aumentar as taxas de produção de blastocisto, aumenta também o número de células por embrião, fato este sendo parcialmente atribuído à produção de blastocistos de maior qualidade com a adição de 100 μ M de DNP.

De acordo com Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a), a adição de 30 μ M de DNP no estágio de pós-compactação embrionária reduziu significativamente o acúmulo lipídico citoplasmático dos embriões quando comparados ao grupo controle sem regulador metabólico. No entanto, De La Torre-Sanches et al. (2007b) não observaram redução do acúmulo lipídico com a adição da mesma dose de DNP no mesmo estágio embrionário, sugerindo um excesso de desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção da função mitocondrial dos embriões.

Rieger et al. (2002), utilizando a dose de 10 μ M de DNP, além de obterem um aumento no metabolismo glicolítico (via glicólise) e oxidativo (via ciclo de Krebs) dos embriões, observaram um aumento do desenvolvimento embrionário, atribuindo este fato a inibição parcial ou desacoplamento da fosforilação oxidativa que reduz a produção de espécies reativas de oxigênio, facilitando o desenvolvimento embrionário.

2.3.5- ETOSSULFATO DE FENAZINA (PES)

O PES é um redutor de elétrons do NADPH, oxidando o NADPH em NADP⁺ (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada), o que estimula a via pentose-fosfato. O NADP⁺ ativa as duas primeiras reações enzimáticas na fase oxidativa desta via, convertendo a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, e o 6-fosfogluconato em ribose-5-fosfato (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b) (Figura 3). Segundo Dufrasnes et al. (1993) um aumento na ordem de 10 vezes na utilização da glicose, na via pentose-fosfato induzido pelo PES, reduz a glicólise em 50%.

A adição de PES no período pós-compactação pode induzir a um maior balanço na utilização da glicose por estimularem a via pentose-fosfato e, conseqüentemente, aumentar a produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

Estes redutores já foram usados para oócitos de rato (DOWNS et al., 1998) e embriões bovinos (DE LA TORREZ-SANCHEZ et al., 2006b) e, além de estimular a via pentose-fosfato, eles também diminuem a produção de lipídio (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a), pois com a oxidação do NADPH, torna-o indisponível para a produção lipídica, já que esta coenzima é requerida para a biossíntese de vários lipídios, particularmente os ácidos graxos de cadeia longa (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b).

Segundo De La Torre-Sanchez et al. (2006a), a adição de PES na concentração de 0,9µM no meio de cultivo, no estágio de pós-compactação embrionária, teve um efeito tóxico. Entretanto, menores doses de PES (0,1 e 0,3 µM) não tiveram diferença com relação à taxa de produção de blastocisto, massa celular interna e número de células quando comparadas com o grupo Controle em que não foi utilizado nenhum regulador metabólico.

Em outro trabalho, De La Torre-Sanchez et al. (2006b) relataram que com o tratamento dos embriões PIV com 0,3 µM PES obtiveram um acúmulo lipídico significativamente menor quando comparado com o grupo DNP ou NaN₃ e o Controle *in vitro*, mas o acúmulo lipídico do grupo PES também foi maior que o Controle *in vivo*, em que teve menor acúmulo de lipídio citoplasmático. Da mesma maneira, Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a) utilizando 0,3 µM de PES obtiveram um menor acúmulo de lipídio citoplasmático quando comparado com o grupo Controle, e o grupo suplementado com 1 ou 3 µg/mL de cerulenin.

Recentemente, Gajda et al. (2008) estudando a qualidade embrionária de embriões suínos, observaram que o uso de 0,025-0,075 µM de PES em embriões no estágio de 1-2 células além de melhorar o desenvolvimento embrionário, resultou no aumento da qualidade do embrião, levando a redução da incidência de apoptose nos embriões tratados com PES.

Confirmando o efeito benéfico do PES, Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007b) observaram que a adição de PES ao meio de cultivo aumentou a sobrevivência embrionária após o congelamento convencional ou vitrificação (P<0,05; 92, 85 e 60% de sobrevivência, para os grupos PES, Controle e 10% SFB,

respectivamente), fato este atribuído a redução do conteúdo lipídico citoplasmático do embrião resultante da utilização do PES no estágio de pós-compactação embrionária.

2.4- Criopreservação de embriões

A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação dos embriões por tempo indeterminado. Desta maneira, a criopreservação possibilita a programação da utilização dos embriões, o transporte longo, como em casos de importações e exportações, e a formação de bancos genéticos.

O processo de criopreservação de embriões envolve: a exposição aos crioprotetores, o congelamento a temperaturas inferiores a zero, o armazenamento, o descongelamento e a posterior diluição e remoção dos crioprotetores com conseqüente retorno a um ambiente fisiológico que permitirá o desenvolvimento (ALVARENGA et al., 2007).

Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes de se proceder a sua congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL JR Jr., 1986). Desta forma a curva de congelamento deve ser ótima para permitir uma remoção de água eficiente, prevenindo a crioinjúria por formação de cristais de gelo, e ao mesmo tempo minimizar o efeito tóxico da exposição à alta concentração de solutos (CAMPOS-CHILLÓN et al., 2006).

Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células e tecidos durante a congelação e a descongelação. Sabe-se que o papel dos crioprotetores é reduzir o ponto de solidificação das soluções durante a congelação aumentando assim a taxa de sobrevivência das células (LEIBO et al., 1973).

De acordo com as propriedades de difusão através das membranas biológicas, os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias: intracelulares (solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das

células durante a congelação, como por exemplo, o glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol, etilenoglicol (EG) etc) e extracelulares (macromoléculas e açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular durante o aquecimento, como por exemplo a glicose, lactose, sacarose, galactose, polivinilpirrolidona (PVP), Ficoll 70, etc) (NIEMANN, 1991).

A maioria dos embriões bovinos obtidos *in vivo* é criopreservado pela técnica de congelamento tradicional (PALASZ e MAPLETOFT, 1996), uma vez que esta vem possibilitando resultados satisfatórios com taxas de concepção próximas de 40% (RODRIGUES et al., 2007). Por outro lado, os melhores resultados obtidos após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* são, geralmente, através da técnica de vitrificação (MUCCI et al., 2006; NEDANBALE et al., 2004).

De acordo com VAJTA (1997), a vitrificação é definida como a solidificação de uma solução à baixa temperatura sem formação de cristais de gelo. Isso pode ser conseguido através do aumento da viscosidade da solução associado à alta velocidade de resfriamento e aquecimento.

Comparando as duas técnicas, o congelamento lento é uma tentativa de manutenção do equilíbrio entre danos osmóticos e tóxicos utilizando baixas concentrações de crioprotetores, e controlando a formação de cristais de gelo através do congelamento do meio extracelular e desidratação do embrião (ALVARENGA et al., 2007).

Em contraste, a estratégia de vitrificação é mais radical, pois é baseada na eliminação total da formação de cristais de gelo. As altas concentrações de crioprotetores aumentam os danos osmóticos e tóxicos. No entanto, a alta velocidade de resfriamento e aquecimento resulta em uma rápida passagem através da temperatura de 0°C, o que minimiza os danos causados pelo resfriamento. Como a vitrificação é uma técnica relativamente nova e não foi padronizada até agora, existem diversos protocolos os quais apresentam diferentes detalhes técnicos (KASAI, 1996; PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Nos protocolos de vitrificação, o EG associado a outros crioprotetores não permeáveis tem se tornado a combinação mais comumente utilizada (HOCHI et al., 1996; MARTINO et al., 1996). Um agente crioprotetor não permeável comum é a sacarose, a qual exerce um efeito osmótico significativo, sendo portanto, empregada na re-hidratação após o descongelamento. Na presença de sacarose,

a estabilidade da membrana de oócitos é drasticamente aumentada após exposição prolongada a altas concentrações de EG (SZELL e SHELTON, 1986; TODOROV et al., 1993; RAYOS et al., 1994).

A vitrificação é uma alternativa para a criopreservação, a qual pode minimizar os danos pelo aumento nas taxas de congelamento e aquecimento. A “*Open Pulled Straw*” (OPS) e o “cryoloop” têm sido utilizados para promover taxas de congelamento e aquecimento muito rápidas. Além disso, o uso de técnicas ultra-rápidas de criopreservação como a vitrificação, melhora a sobrevivência do embrião PIV, e pode ajudar reduzir grande parte dos custos. A vitrificação não requer nenhum equipamento especial e pode ser facilmente adaptada à rotina (BARIL et al., 2001).

As técnicas de vitrificação utilizando baixos volumes de meios como o “cryoloop” e a OPS tem a desvantagem de não se adaptarem a protocolos de transferência direta dos embriões, uma vez que após o descongelamento os embriões necessitam passar por soluções de reidratação para posteriormente envasá-los e proceder a inovulação.

Eldridge-Panuska et al. (2005), desenvolveram uma técnica para vitrificação de embriões eqüinos a qual permite a transferência direta dos embriões. Neste experimento os embriões foram vitrificados em solução contendo 3,4M glicerol + 4,6M etilenoglicol e acondicionados em palhetas de 0,25 ml contendo bolhas laterais com 0,5M de galactose. Após o descongelamento os embriões foram transferidos para receptoras com taxa de prenhez de 78% (28/36).

Da mesma maneira em embriões bovinos, Campos-Chillón et al. (2006) desenvolveram a técnica de vitrificação direta passando os embriões em solução de 5M de EG e depois em solução contendo 7M de EG, 18% de Ficoll e 0,5M de galactose para finalmente serem acondicionados em palhetas de 0,25 mL separados por bolhas e colunas laterais de solução de 1M de galactose. Nesse trabalho, os autores obtiveram taxas de 82% re-expansão e 60% eclosão dos blastocistos PIV após a vitrificação (n=6, num total de 63 embriões). Já com embriões produzidos *in vivo* a taxa de re-expansão e eclosão foi de 95% (n=20).

2.5- Apoptose

Existem dois processos de morte celular distintos, a necrose e a apoptose. A necrose é o resultado de uma injúria que afeta um grande grupo de células, causando edema celular e ruptura de membrana que provocam uma resposta inflamatória em tecidos saudáveis adjacentes. Em contraste, a apoptose afeta células isoladas, não compromete tecidos próximos e não possui uma resposta inflamatória associada (HARDY, 1999).

A apoptose é uma forma altamente conservadora de morte celular que desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário e na homeostase celular, atuando como um mecanismo de controle de qualidade para remover células que estão danificadas, não funcionais, anormais, e em número excessivo (JACOBSON et al., 1997; MEIER et al., 2000; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002).

Uma série consecutiva de fases, morfologicamente distintas, está envolvida no processo de apoptose (Figura 4). Inicialmente a cromatina se agrega em uma grande massa compacta granular, o citoplasma condensa e as membranas nuclear e citoplasmática ficam grosseiramente recuadas (HARDY, 1999). O núcleo sofre fragmentação, ocorre a formação de vesículas na membrana celular, compostas por fragmentos nucleares e algumas organelas, denominadas corpúsculos apoptóticos. Esses corpúsculos apoptóticos são rapidamente reconhecidos e englobados por fagócitos e/ou células adjacentes onde são degradados e reciclados (BETTS e KING, 2001).

As características morfológicas da morte celular por apoptose, como a condensação da cromatina, marginalização e fragmentação nuclear, são visíveis nos estágios de mórula e blastocisto produzidos tanto *in vitro* como *in vivo* (GJORRET et al., 2003). Essas mudanças nucleares são observadas em 70-80% dos embriões produzidos *in vitro* de ratos (HANDYSIDE e HUNTER, 1986) e humanos (HARDY, 1999) e em praticamente todos os blastocistos bovinos (BYRNE et al., 1999).

Através da reação de TUNEL é possível a detecção *in situ* de células apoptóticas pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA gerado pela atividade de DNAases endógenas (eventos bioquímicos – Figura 4) durante o processo de apoptose (GJORRET et al., 2003).

Figura 4: Representação esquemática dos eventos morfológicos e bioquímicos envolvidos no processo da apoptose (Adaptado Hardy, 1999).

A apoptose espontânea é primeiramente observada nos embriões bovinos no estágio de 8-16 células, período coincidente com a ativação do genoma embrionário (MATWEE et al., 2000). A exposição dos embriões a ambientes adversos pode aumentar o número de células apoptóticas em resposta ao estresse ocasionado, como no caso de estresse térmico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002), e de condições desfavoráveis do meio de cultivo embrionário (HARDY, 1999).

Em diversas espécies a apoptose nos embriões é concentrada nas células da massa celular interna (MCI). Um exemplo são os blastocistos de camundongos produzidos *in vivo* lavados do trato reprodutivo da fêmea, onde a porcentagem de células mortas na MCI está ao redor de 10%, enquanto que nas células do trofoblasto é de apenas 3% (HARDY e HANDYSIDE, 1996). A apoptose na MCI pode regular a proliferação celular desde que o número de células da MCI chegue a um platô em estágios avançados de blastocistos sem uma redução na divisão celular mitótica (HANDYSIDE e HUNTER, 1986).

De acordo com Byrne et al. (1999) a concentração da apoptose na MCI de embriões bovinos está relacionada a um aprimorado controle de qualidade celular, uma vez que a MCI é de extrema importância por essa linhagem de células dar origem ao feto. Além disso, é possível que em estágios mais avançados de desenvolvimento, a apoptose na MCI atinja um limiar para evitar a formação de trofoblasto ectópico nas camadas germinativas iniciais (Byrne et al., 1999).

Basicamente, a apoptose pode ocorrer por duas vias, a via extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de morte (receptor Fas) presentes na membrana plasmática das células como ocorre com o ligante-Fas (Fas-L) quando se liga a seu receptor Fas (SHARMA, 2000). A via intrínseca da apoptose é dependente da mitocôndria, uma vez que é um reservatório de diversas proteínas apoptogênicas como é o caso do citocromo c que promove a liberação de fatores ativadores de caspase, mudanças no transporte de elétrons, perda do potencial de membrana mitocondrial, alteração no estado de redução-oxidação celular e participação na família de proteínas BCL-2 pró e anti-apoptóticas (GREEN e REED, 1998; PARONE et al., 2002).

Existem duas famílias de proteínas que estão envolvidas na regulação da apoptose, a família das caspases, que media processos proteolíticos, e aquelas que regulam a atividade das caspases, a família da *B cell leukemia/lymphoma 2* (BCL-2) (MESQUITA, 2005). Esta família de proteínas é composta por 15 genes, distribuídos em dois subgrupos, os anti-apoptóticos (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1, AL) e pró-apoptóticos (BAX, BAK, BOK, BIK, BLK, HRK, BNIP₃, BIM, BAD, BID, BCL-X_S), além de proteínas pró-apoptóticas que contém o domínio BH3 da família BCL-2 que são responsáveis pela indução da apoptose (ITM2B) (DHARAP et al., 2006; YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002).

Para Mesquita (2005) o que determina a sobrevivência de uma célula é a habilidade dos supressores da apoptose em inibirem a ação dos indutores do processo. Portanto, a concentração relativa das proteínas pró e anti-apoptóticas é que definirá a sobrevivência ou morte das células. Nesse contexto, Lonergan et al. (2003) sugeriram a relação do padrão de expressão dos genes Bax/BCL-2 como indicador da tendência para apoptose ou sobrevivência dos embriões. Além disso, o índice de células embrionárias em apoptose indica a qualidade dos blastocistos produzidos (BYRNE et al., 1999).

OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1- Avaliar o desenvolvimento embrionário bovino *in vitro* com a suplementação de diferentes concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%), assim como após a adição do etossulfato de fenazina (PES) ao meio de cultivo a partir do D2,5 e D4 (considerando D0 como a fertilização).

3.2- Quantificar as gotas lipídicas citoplasmáticas dos embriões oriundos dos diferentes grupos experimentais com a coloração de Sudan Black B no 7º dia após a fertilização.

3.3- Avaliar a ocorrência de apoptose, através da técnica de TUNEL, nos embriões PIV frescos produzidos nos diferentes grupos experimentais.

3.4- Analisar a viabilidade embrionária após a vitrificação / aquecimento dos embriões PIV na presença de diferentes concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%), bem como daqueles tratados com PES (Controle, PES D2,5 e PES D4), através da observação da taxa de re-expansão da blastocle e da ocorrência da apoptose (técnica de TUNEL).

3.5- Realizar a comparação das variáveis, acúmulo lipídico citoplasmático, e as porcentagens de apoptose fresco, de re-expansão e de apoptose aquecida, entre os grupos experimentais *in vitro* e o grupo Controle *in vivo*

3.6- E finalmente, estabelecer uma relação entre os parâmetros acúmulo lipídico vs porcentagem de apoptose dos embriões frescos, acúmulo lipídico vs porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos, e porcentagem de apoptose fresco vs porcentagem de apoptose aquecido.

HIPÓTESES

4- HIPÓTESES

4.1- A elevação da concentração de SFB no meio de cultivo embrionário aumenta o desenvolvimento embrionário, e a utilização do PES a partir do D2,5 e D4 não afeta o desenvolvimento embrionário.

4.2- Com a elevação da concentração do SFB aumenta o acúmulo lipídico citoplasmático, entretanto, o uso do PES (a partir do D2,5 ou D4) reduz o conteúdo lipídico dos embriões bovinos PIV.

4.3- A porcentagem de apoptose nos embriões frescos é aumentada com a elevação da concentração do SFB, no entanto, a adição do PES ao meio de cultivo não altera a porcentagem de apoptose fresco.

4.4- A sobrevivência embrionária após a vitrificação é diminuída pela elevação da concentração de SFB, e aumentada com a adição do PES a partir do D2,5 ou D4, com uma maior sobrevivência para o grupo PES D2,5.

4.5- O grupo Controle *in vivo*, quando comparado aos grupos experimentais *in vitro*, possui o menor acúmulo lipídico citoplasmático, menor porcentagem de apoptose fresco e aquecido e a maior porcentagem de re-expansão.

4.6- Quanto maior o acúmulo lipídico citoplasmático maior a porcentagem de apoptose dos embriões frescos e aquecidos, assim como quanto maior a porcentagem de apoptose dos embriões frescos maior a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Delineamento experimental

O presente estudo utilizou um delineamento experimental em fatorial 4 x 3, sendo quatro concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%), e três períodos de exposição ao PES (sem adição do PES – Grupo Controle, 0,3 μ M de PES iniciado após 60 horas de cultivo – PES D2,5, e após de 96 horas de cultivo- PES D4). Um total de 4320 oócitos oriundos de ovários de animais de abatedouro, a maioria com origem da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), foram utilizados para realização de 12 réplicas testando as diferentes concentrações de SFB e o uso do regulador metabólico sobre o desenvolvimento embrionário, acúmulo lipídico citoplasmático, apoptose celular dos embriões frescos e criotolerância frente à vitrificação (Figura 5).

Figura 5: Delineamento Experimental em fatorial 4x3.

5.2- Reagentes utilizados

Todas as substâncias utilizadas foram adquiridas da Sigma (Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, MO), exceto quando especificada.

5.3- Maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de abatedouro, predominantemente de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) foram utilizados para a obtenção dos oócitos de folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm. Foram utilizados somente oócitos que apresentaram três ou mais camadas compactas de células do *cumulus* e com coloração homogênea.

Os oócitos selecionados foram maturados *in vitro* (MIV) em estufa com umidade saturada a 38,5° C, com 5% de CO₂ em ar, por 22 a 24 horas. Foram utilizadas placas de Petri contendo gotas cobertas por óleo mineral com 30 oócitos por gota de 90µl de meio TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) e L-glutamina suplementado com 10% SFB, 0,2 mM piruvato de sódio, 5mg/mL LH (Lutropin-V®, Vetrepharm, Ontário, Canadá), 1mg/mL FSH (Pluset®, Calier, Barcelona, Espanha), e 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina.

5.4- Fertilização *in vitro* (FIV)

Ao final do período de maturação, grupos de 30 oócitos foram transferidos para gotas de 90 µl com meio de fertilização cobertas por óleo mineral. Os oócitos foram submetidos à FIV com o sêmen de uma única partida e de um mesmo touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Os espermatozóides foram selecionados pelo método de Percoll e a concentração foi ajustada para 2x10⁶ espermatozóides/mL. A fertilização ocorreu em meio HTF (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) acrescido de 5mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos, Sigma A-8806), 0,2mM de piruvato, 30µg/mL de heparina, 18µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina, e 1,8µM de epinefrina, 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina, sendo incubados os oócitos e espermatozóides em

estufa, sob as mesmas condições da MIV, por aproximadamente 18 horas. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

5.5- Cultivo *in vitro* (CIV)

Decorridas às 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e transferidos para placas de cultivo em gotas de 90µL do meio (30 estruturas/gota) cobertas de óleo mineral em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. O cultivo embrionário foi realizado no meio SOFaa acrescido de 2,7mM de mio-inositol, 0,2mM de piruvato, com 0%, 2,5%, 5% ou 10% de SFB, 5mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos- Sigma A-8806), 100mg/mL de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina. Após 60 horas de cultivo, ou seja, 2,5 dias após a fertilização (D2,5), a clivagem foi checada e as estruturas que não se encontravam clivadas foram descartadas.

Os embriões foram então transferidos para novas gotas de 90µL contendo os respectivos meios de cultivo, ou seja com 0%, 2,5%, 5% ou 10% de SFB. Entretanto, neste momento (60 horas após início do cultivo - D2,5) foi adicionado ou não 0,3µM de PES (Sigma - P4544), formando-se os grupos Grupo 0%, Grupo 0%+PES D2,5, Grupo 2,5%, Grupo 2,5% + PES D2,5, Grupo 5%, Grupo 5% + PES D2,5, Grupo 10% e Grupo 10% + PES D2,5 (Figura 5). Foram utilizadas as mesmas condições de cultivo anteriores. No D4, após 96 horas de cultivo, realizou-se mais uma troca de meio, respeitando os respectivos meios de cultivo anteriores utilizados para cada grupo, porém, novamente com a adição ou não de PES, ou seja, meio SOFaa com 0%, 2,5%, 5% ou 10% de SFB, com adição ou não de 0,3µM de PES a partir do D2,5 e a partir do D4 formando os grupos Grupo 0%, Grupo 0% + PES D2,5, Grupo 0% + PES D4, Grupo 2,5%, Grupo 2,5% + PES D2,5, Grupo 2,5% + PES D4, Grupo 5%, Grupo 5% + PES D2,5, Grupo 5% + PES D4, Grupo 10% e Grupo 10% + PES D2,5, Grupo 10% + PES D4 (Figura 5). Os embriões permaneceram nestas condições de cultivo até o 7º dia (D7), momento este em que foi avaliada a porcentagem de produção de blastocisto, com base no número total de oócitos que foram colocados para maturar e de estruturas clivadas, e atribuído escores com relação ao estágio de desenvolvimento (Blastocisto inicial - 5, Blastocisto - 6, Blastocisto Expandido- 7, Blastocisto Eclodido-8), e

grau de qualidade (grau I - excelente- 1, grau II -regular- 2, grau III - pobre- 3 e grau IV - estrutura degenerada- 4), de acordo com a classificação do manual da *International Embryo Transfer Society* (1998). As eventuais mórulas foram descartadas.

Após avaliação da produção embrionária, uma amostra dos embriões foram submetidos a técnica de TUNEL (n=15-134) e a coloração de Sudan Black B (n=15-60) para quantificação de lipídeos citoplasmáticos. O restante dos embriões foi vitrificado (n=2647).

5.6- Produção *in vivo* de embriões

Para o Controle *in vivo* foram realizadas colheitas de embriões em sete vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), adultas, cíclicas, não lactantes e com boa condição corporal (escore entre 5 e 7, numa escala de 1 a 9, de acordo com Richards et al., 1986).

O protocolo superovulatório (P36LH48) foi baseado no proposto por Nogueira & Barros (2003). Em um dia aleatório do ciclo estral (D0) as vacas receberam um implante auricular com 3mg de norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, Brasil) pela via intramuscular (IM). A partir do D4 as vacas receberam 200 mg de FSHp (Folltropin-V, Bioniche, Brasil) IM duas vezes ao dia em doses decrescentes (40%, 30%, 20%, e 10%), e no D6 foram administradas duas doses IM de 150µg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Schering-Plough, Brasil) com 12 horas de intervalo. O implante foi retirado 36 horas após a primeira aplicação de PGF_{2α}, e foi administrado 12,5mg de LH (Lutropin-V®, Bioniche, Brasil) IM 48 horas após a primeira dose de PGF_{2α}. As doadoras foram inseminadas artificialmente em tempo fixo 12 e 24 horas após a aplicação de LH, com a mesma partida de sêmen de um único touro da raça Nelore com fertilidade conhecida e previamente utilizado na FIV dos grupos experimentais *in vitro*.

A colheita dos embriões foi realizada por lavagem uterina com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Nutricell, Brasil) por meio da técnica não cirúrgica no D16 pela manhã (7,5 dias após a primeira inseminação artificial).

Uma amostra dos embriões foi submetida a técnica de TUNEL (n=15) e a coloração de Sudan Black B (n=15). O restante dos embriões foi vitrificado (n=15).

5.7- TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling)

Uma amostra dos blastocistos frescos e aquecidos (no mínimo, n= 20 / grupo) foi submetida a técnica de TUNEL que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento este resultante da apoptose. Esta avaliação foi realizada com o “*Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche® - 11 684 795 910, Mannheim, Alemanha).

Os embriões foram lavados com PBS acrescido de 1mg/mL de polivinil-pirolidona (PVP) e fixados em paraformaldeído 4% durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a lavagem em PBS acrescido de 0,1% PVP, os embriões foram permeabilizados em solução 0,1% de triton X-100 e 0,1% citrato de sódio em PBS durante 1 hora em temperatura ambiente e lavados em PBS acrescido de 0,1% PVP. Grupos de embriões fixados e permeabilizados foram subdivididos em 3 grupos: Controles positivos, negativos e amostras experimentais. O Controle positivo foi tratado com 1U/μL DNase (Promega, M6101, Madison, EUA) em solução com 400 mM de TRIS-HCL, 50mM de MgCL₂ e água ultrapura por 1 hora a 37°C. Após lavagem, o Controle positivo e as amostras foram incubadas em microgotas da mistura de reagentes de TUNEL do *Kit* (Mix TUNEL), contendo a proporção de 10% de solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídi transferase - TdT) com 90% de solução marcadora (conjugado fluorescente de d-UTP) por 1 hora a 37°C no escuro, em câmara úmida. O Controle negativo foi incubado em microgotas apenas com solução marcadora na ausência da solução enzimática para conferir a marcação. Após a lavagem em PBS/PVP, Controles e amostras foram submetidos a um contraste para visualização do DNA com solução de Hoechst 33342 (concentração final 1mg/mL) e glicerol em uma lâmina histológica com lamínula e foram analisados em microscópio de fluorescência. Com filtro de excitação de 450-490 nm e de emissão de 515 nm os núcleos fluorescentes em verde (isotiocianato de fluoresceína - FITC) foram considerados as células TUNEL positivas, ou seja, apresentaram o DNA fragmentado. Com filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm os núcleos fluorescentes em azul (Hoechst 33342) indicaram a presença e a localização do núcleo das células. Para a contagem do número de células apoptóticas (coradas em verde) e número

total de células (coloração azul) foi utilizado o programa ImageJ 1.41o (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA). Com base nestes dados, foi feito o cálculo da porcentagem de ocorrência da apoptose (número de células apoptóticas em relação ao número total de células do embrião).

5.8- Quantificação de lipídeos

Uma amostra dos blastocistos (no mínimo, $n = 15$ / grupo) foi selecionada aleatoriamente ao longo das réplicas do experimento e submetida à coloração de Sudan Black B (Sigma S-0395) para quantificação das gotas lipídicas citoplasmáticas dos embriões oriundos dos diferentes grupos.

Os embriões foram fixados em solução de 10% formalina em mPBS com pH 7,4 por 2 horas em temperatura ambiente, posteriormente foram lavados em água destilada com 0,05% PVA, e depois transferidos para uma gota de etanol 50% em água. Após 2 minutos, os embriões foram corados em quatro gotas de 1% de Sudan Black B (p/v) em solução de etanol 70% por 1- 2 minutos. Posteriormente, os embriões foram lavados três vezes em etanol 50%, sendo 5 minutos cada vez, e logo em seguida em 0,05% de PVA em água destilada também por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram montadas com gotas de 10 μ L de glicerol para colocar os embriões e cobri-las com lamínulas, para finalmente, serem lidas em microscópio de luz com aumento de 600x.

Visando a estimativa da quantidade de gotas de lipídeo em cada embrião foi montada uma grade com cinco quadrados de 1600 μm^2 , cada um, no Software AutoCAD 2000 (Autodesk, Inc., Califórnia, E.U.A.), sendo subdivididos por linhas, alternadas em pontilhadas ou contínuas, a cada 5 μm (Figura 6). Para a quantificação lipídica as gotas lipídicas citoplasmáticas foram classificadas em pequenas (menor que 2 μm), médias (entre 2 e 6 μm) e grandes (maiores que 6 μm) (adaptado de Abe et al., 2002), e posteriormente, foi contado o número de gotas de cada categoria presentes em cada quadrado de 1600 μm^2 . Em seguida, foi calculada a média dos cinco quadrados para cada categoria por embrião. Os dados do acúmulo lipídico estão apresentados em número de gotas lipídicas por 1000 μm^2 . Considerando a média do diâmetro de 1, 4 e 8 μm para as gotas pequenas, médias e grandes, respectivamente, e levando em

consideração que a comparação deve ser feita através do volume, uma gota lipídica grande equivale a 8 médias e 512 pequenas.

Figura 6: Grade para quantificação lipídica dos embriões através da coloração de Sudan Black B.

5.9- Vitrificação

Para a vitrificação dos embriões, utilizou-se a técnica “two step” com transferência direta descrita por Campos-Chilon et al. (2006). Os embriões D7 (blastocistos grau 1 e 2) foram lavados em uma solução de manutenção (SM) (Vigro-Bioniche) e transferidos para 500µL da solução de vitrificação - SV1 (5M de etilenoglicol em SM) durante 3 minutos. Posteriormente, os embriões foram colocados em uma gota de 10µL da solução de vitrificação - SV2 (7M etilenoglicol em SM + 0,5M de galactose + 18% peso/volume de Ficoll 70) por 45 segundos. Logo após, foi montada a palheta de 0,25mL contendo 1cm de solução de galactose (SG) (1M galactose em SM) + 0,5 cm de ar + 7cm de SG + 0,5 cm de ar + gota de SV2 com os embriões + 0,5 cm de ar + a SG até o final da palheta (Figura 7). As palhetas permaneceram por 1 minuto no vapor

de N₂ líquido para posteriormente serem mergulhadas no mesmo. Foi realizado a vitrificação em grupos de cinco a 10 blastocistos por palheta, exceto no grupo Controle *in vivo* onde foram vitrificados três blastocistos por palheta.

Figura 7: Montagem das palhetas de vitrificação.

5.10- Aquecimento e re-cultivo dos embriões

As palhetas de vitrificação foram retiradas do N₂ líquido e mantidas por 10 segundos no ar e depois por 15 segundos em água a 35-37°C. As palhetas de vitrificação foram agitadas levemente para misturar as colunas dos meios de vitrificação. Posteriormente, os embriões foram lavados e submetidos ao re-cultivo em gotas de meio SOFaa acrescido de 10% de SFB, 2,7mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, 5mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos- Sigma A-8806), 100 mg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina cobertos com óleo mineral em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ durante o período de 12 horas para que o embriões retomassem o seu desenvolvimento. Passado o período de re-cultivo, os embriões foram avaliados quanto a taxa de re-expansão e posteriormente foram submetidos a técnica de TUNEL. A sobrevivência embrionária foi definida como a re-expansão da blastocele e posterior reduzida taxa de apoptose.

5.11- Análise Estatística

Para análise estatística, as variáveis dependentes expressas em porcentagem (clivagem, blastocisto/oócitos, blastocisto/clidados, de re-expansão, apoptose) foram transformadas por arcoseno (transformação arcoseno $\sqrt{y/100}$), para posterior realização da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. A comparação da porcentagem de apoptose dos embriões frescos com a dos aquecidos foi realizada com a ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os dados são apresentados não transformados.

As variáveis dependentes discretas (número de gotas lipídicas pequenas médias e grandes, estágio de desenvolvimento, grau de qualidade embrionária, número total de células, número de células apoptóticas) foram submetidas ao teste de aderência de Kolmogorov e Smirnov, em seguida, se os dados passaram no teste de normalidade, foram analisados por ANOVA seguido do Teste de Tukey, caso contrário, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Foi realizada a análise da correlação linear de Pearson entre os diferentes parâmetros (Acúmulo lipídico vs porcentagem de Apoptose fresco, Acúmulo lipídico vs porcentagem de Apoptose aquecido, e Porcentagem de Apoptose fresco vs Porcentagem de Apoptose aquecido). A relação dos parâmetros (concentração de SFB vs Acúmulo lipídico, concentração SFB vs porcentagem de Apoptose fresco, e concentração de SFB vs porcentagem de Apoptose aquecido) foi realizada através da análise de regressão.

Os efeitos principais são apresentados na ausência de interação significativa entre as diversas concentrações de SFB e os momentos da adição do PES. Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

6- RESULTADOS

6.1- Produção embrionária

O uso do SFB e PES não afetou ($P>0,05$) a taxa de clivagem. No entanto, o grupo que utilizou 0% de SFB e PES a partir do D2,5 produziu menos blastocistos por oócito e também por estruturas clivadas ($P<0,05$) do que os grupos 2,5% PES D4, 10% Controle e 10% PES D4 (Tabela 1). O grupo 0% PES D4 apresentou um atraso (menor estágio) no desenvolvimento embrionário ($P<0,05$) em comparação com os grupos 2,5% (Controle, PES D2,5 e PES D4), 5% (Controle e PES D4) e 10% (PES D2,5 e PES D4). Além disso, a análise do grau de qualidade embrionária mostrou que o grupo 0% PES D2,5 foi inferior ($P<0,05$) aos grupos 2,5% PES D4 e 10% PES D4 (Tabela 1).

Tabela 1: Média ($\pm$ erro padrão) das diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) e do uso do etossulfato de fenazina (PES) sobre porcentagem de clivagem, de blastocistos/ oócitos, de blastocistos/ estruturas clivadas, e os escores do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo.

Tratamentos		Desenvolvimento				Parâmetros de Qualidade	
[SFB]	PES	Oócitos	% Clivagem **	% Blastocistos/ oócitos **	% Blastocistos/ clivados **	Estágio Desenvolvimento *	Grau Qualidade *
0%	Controle	360	86,1 $\pm$ 3,6	34,5 $\pm$ 5,4 ^{ab}	40,1 $\pm$ 5,9 ^{ab}	6,4 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,0 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D2,5	360	88,9 $\pm$ 2,4	25,4 $\pm$ 4,4 ^a	28,6 $\pm$ 4,9 ^a	6,4 $\pm$ 0,1 ^{ab}	3,1 $\pm$ 0,1 ^b
	PES D4	360	85,1 $\pm$ 3,1	31,5 $\pm$ 2,7 ^{ab}	37,0 $\pm$ 3,2 ^{ab}	6,2 $\pm$ 0,1 ^a	3,0 $\pm$ 0,1 ^{bc}
2,5%	Controle	360	84,6 $\pm$ 2,6	41,2 $\pm$ 3,4 ^{ab}	48,7 $\pm$ 3,9 ^{ab}	6,8 $\pm$ 0,1 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D2,5	360	81,9 $\pm$ 3,6	34,0 $\pm$ 3,9 ^{ab}	41,5 $\pm$ 4,4 ^{ab}	6,7 $\pm$ 0,1 ^b	2,9 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D4	360	80,3 $\pm$ 2,3	50,2 $\pm$ 2,7 ^b	62,5 $\pm$ 3,3 ^b	6,8 $\pm$ 0,1 ^b	2,5 $\pm$ 0,1 ^c
5%	Controle	360	88,4 $\pm$ 2,6	41,4 $\pm$ 6,1 ^{ab}	46,8 $\pm$ 6,6 ^{ab}	6,7 $\pm$ 0,1 ^b	2,9 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D2,5	360	83,7 $\pm$ 2,9	36,8 $\pm$ 3,5 ^{ab}	44,0 $\pm$ 4,0 ^{ab}	6,6 $\pm$ 0,1 ^{ab}	2,9 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D4	360	86,8 $\pm$ 1,9	43,3 $\pm$ 3,6 ^{ab}	49,9 $\pm$ 4,1 ^{ab}	6,7 $\pm$ 0,1 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^{bc}
10%	Controle	360	88,8 $\pm$ 1,9	50,8 $\pm$ 6,1 ^b	57,2 $\pm$ 6,7 ^b	6,5 $\pm$ 0,1 ^{ab}	2,8 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D2,5	360	86,9 $\pm$ 3,0	43,7 $\pm$ 4,6 ^{ab}	50,3 $\pm$ 5,1 ^{ab}	6,8 $\pm$ 0,1 ^b	2,7 $\pm$ 0,1 ^{bc}
	PES D4	360	85,4 $\pm$ 2,9	47,1 $\pm$ 3,6 ^b	55,2 $\pm$ 4,1 ^b	6,8 $\pm$ 0,1 ^b	2,5 $\pm$ 0,1 ^c

^{ab} Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$). **N=12. *N=91-183. Estágio de desenvolvimento embrionário - Escore: Blastocisto inicial-5; Blastocisto-6; Blastocisto Expandido-7, Blastocisto Eclodido-8. Grau de qualidade embrionária - Escore: Grau I (excelente)-1; Grau II (regular)-2; Grau III (pobre)-3; Grau IV (degenerado)-4.

Como efeito principal do SFB e PES, a taxa de clivagem também não diferiu ($P > 0,05$) entre as diversas concentrações do soro (0%, 2,5%, 5 e 10%), nem tão pouco com a adição do regulador metabólico (Controle, PES D2,5 e PES D4). A porcentagem de produção de blastocistos (por oócitos e estruturas clivadas) e o escore de desenvolvimento embrionário foram elevados com a suplementação do SFB ($P < 0,05$), inclusive o soro reduziu ($P < 0,05$) o escore do grau de qualidade dos embriões (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito principal do soro fetal bovino (SFB) e do etossulfato de fenazina (PES) sobre a média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem de clivagem, de blastocistos/ oócitos, de blastocistos/ estruturas clivadas, e os escores do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo.

Respostas	Desenvolvimento				Parâmetros de Qualidade	
	Oócitos	% Clivagem **	% Blastocistos/ oócitos**	% Blastocistos/ clivados **	Estágio Desenvolvimento *	Grau Qualidade *
SFB						
0%	1080	86,7 $\pm$ 1,7	30,5 $\pm$ 2,5 ^a	35,2 $\pm$ 3,0 ^a	6,3 $\pm$ 0,1 ^a	3,0 $\pm$ 0,1 ^a
2,5%	1080	82,3 $\pm$ 1,6	41,8 $\pm$ 2,4 ^b	50,8 $\pm$ 2,9 ^b	6,8 $\pm$ 0,1 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^b
5%	1080	86,3 $\pm$ 1,4	40,5 $\pm$ 2,6 ^b	46,9 $\pm$ 3,1 ^b	6,7 $\pm$ 0,1 ^b	2,8 $\pm$ 0,1 ^b
10%	1080	87,0 $\pm$ 1,5	47,2 $\pm$ 2,8 ^b	54,3 $\pm$ 3,3 ^b	6,7 $\pm$ 0,1 ^b	2,7 $\pm$ 0,1 ^b
PES						
Controle	1440	87,0 $\pm$ 1,3	42,0 $\pm$ 2,8 ^B	48,3 $\pm$ 3,3 ^B	6,6 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1 ^B
PES D2,5	1440	85,4 $\pm$ 1,5	35,0 $\pm$ 2,3 ^A	41,0 $\pm$ 2,8 ^A	6,6 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,1 ^A
PES D4	1440	84,4 $\pm$ 1,3	43,0 $\pm$ 2,0 ^B	51,0 $\pm$ 2,5 ^B	6,6 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1 ^B

^{ab}; ^{AB} Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem (P<0,05). ** N=12, * N=329-510. Estágio de desenvolvimento embrionário - Escore: Blastocisto inicial-5; Blastocisto-6; Blastocisto Expandido-7, Blastocisto Eclodido-8. Grau de qualidade embrionária - Escore: Grau I (excelente)-1; Grau II (regular)-2; Grau III (pobre)-3; Grau IV (degenerado)-4.

A utilização do regulador metabólico PES a partir do D2,5 reduziu (P<0,05) a taxa de produção de blastocistos e o escore do grau de qualidade dos embriões, porém, não afetou o estágio de desenvolvimento embrionário comparando-se aos grupos Controle e PES D4. Já a adição do PES a partir do D4 não alterou (P>0,05) a porcentagem de produção de blastocisto, escore do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos embriões (Tabela 2).

6.2- Acúmulo Lipídico

A elevação da concentração de SFB no meio de cultivo embrionário induziu ao aumento (P<0,05) no número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes (Figuras 8, 9, 10, 11, e 14) em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Além disso, o aumento da porcentagem do SFB, presente no meio de cultivo, apresentou elevados coeficientes de determinação com o aumento do

número médio de gotas lipídicas pequenas ($R^2=0,726$), médias ($R^2=0,954$) e grandes ($R^2=0,976$) (Figura 13).

Figura 8: Média ($\pm$ erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($<2\mu\text{m}$) dos diferentes grupos dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. (a, b, c) refere-se a diferença entre o grupo Controle; (A, B, C) refere-se a diferença entre o grupo PES D2,5; e (α , β , γ) refere-se a diferença entre o grupo PES D4; dentre as concentrações de SFB e o grupo Controle *in vivo*. ($P<0,05$). N=15.

A adição do PES não reduziu ($P>0,05$) a média de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas com a elevação da concentração do SFB (Figura 8). Porém, a adição do PES, tanto a partir do D2,5 como do D4, reduziu ($P<0,05$) o acúmulo de gotas lipídicas médias com a elevação do SFB comparado ao grupo Controle (Figura 9).

Figura 9: Média ($\pm$ erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas médias (2-6 μ m) dos diferentes grupos dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. (a, b, c, d, e) refere-se a diferença entre o grupo Controle; (A, B, C, D) refere-se a diferença entre o grupo PES D2,5; e (α , β , γ) refere-se a diferença entre o grupo PES D4; dentre as concentrações de SFB e o grupo Controle *in vivo*. (*) Indica diferença significativa entre os grupos Controle, PES D2,5 e PES D4 dentre as concentrações 2,5%, 5% e 10% de SFB. ($P < 0,05$). N=15.

O acúmulo de gotas lipídicas grandes foi reduzido ($P < 0,05$) pela adição do PES a partir do D2,5 em todas as concentrações de soro, quando comparados ao grupo Controle. Adicionalmente obteve-se um menor acúmulo lipídico do que no grupo onde o PES foi adicionado no D4 em presença de 10% de SFB. Da mesma maneira, a adição do regulador metabólico a partir do D4, reduziu ($P < 0,05$) o acúmulo de gotas lipídicas grandes na presença de 5% e 10% de soro (Figura 10).

Figura 10: Média ($\pm$ erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas grandes ($>6\mu\text{m}$) dos diferentes grupos dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. (a, b, c, d) refere-se a diferença entre o grupo Controle; (A, B, C, D) refere-se a diferença entre o grupo PES D2,5; e (α , β , γ , δ) refere-se a diferença entre o grupo PES D4; dentre as concentrações de SFB e o grupo Controle *in vivo*. (*, **) Indica diferença entre os grupos Controle, PES D2,5 e PES D4 dentre as concentrações 0%, 2,5%, 5% e 10% de SFB. ($P<0,05$). N=15

Como se pode constatar, na Figura 11, o efeito principal do SFB foi aumentar ($P<0,05$) o acúmulo das gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes. Já, o efeito principal da adição do PES a partir do D2,5 foi a redução da média do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes, comparando-se ao grupo Controle, além de também reduzir o acúmulo de gotas lipídicas grandes comparado ao grupo PES D4 (Figura 12).

Figura 11: Efeito principal das diferentes concentrações de soro fetal bovino (0%, 2,5%, 5% e 10%) sobre a média ($\pm$ erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($<2\mu\text{m}$), médias ($2-6\mu\text{m}$) e grandes ($>6\mu\text{m}$) dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. (a, b, c, d, e) indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nas categorias de gotas pequenas, médias e grandes. N=45 - grupos 0%, 2,5%, 5% e 10%. N=15 - grupo Controle *in vivo*.

A utilização do PES a partir do D4 também foi capaz de reduzir ($P < 0,05$) o acúmulo lipídico citoplasmático das gotas médias e grandes, porém não alterou ($P > 0,05$) o número de gotas pequenas quando comparado ao grupo Controle (Figura 12).

Figura 12: Efeito principal dos grupos Controle, PES D2,5 e PES D4 sobre a média ($\pm$ erro padrão) do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($<2\mu\text{m}$), médias ($2-6\mu\text{m}$) e grandes ($>6\mu\text{m}$) dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. (a, b, c, d) indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos nas categorias de gotas pequenas, médias e grandes. N=60 - Grupos Controle, PES D2,5 e PES D4. N=15 - grupo Controle *in vivo*.

Apesar da diminuição da concentração do SFB e do uso do PES resultarem numa redução do acúmulo lipídico citoplasmático, o grupo Controle *in vivo* foi o qual apresentou o menor acúmulo lipídico (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 14).

Figura 13: Relação entre o aumento da concentração do soro fetal bovino e a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas, médias e grandes dos embriões bovinos produzidos *in vitro* no D7 de cultivo. R^2 – Coeficiente de determinação.

Na Figura 14 são apresentadas as fotos dos blastocistos submetidos a técnica do corante lipofílico Sudan Black B dos diferentes grupos experimentais *in vitro* e do grupo Controle *in vivo*. Esta imagem ilustra o aspecto morfológico das gotas lipídicas, indicando um aumento destas de acordo com a elevação da concentração de soro utilizada, bem como uma diminuição com o uso do PES.

Figura 14: Embriões bovinos submetidos à técnica do corante lipofílico Sudan Black B dos diferentes grupos experimentais *in vitro* e grupo Controle *in vivo*. Pontos com coloração negra são referentes, de acordo com o diâmetro, as gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas (<2 μm), médias (2-6 μm) e grandes (>6 μm). Aumento de 600x.

6.3- Apoptose celular e criotolerância embrionária

Não foi observada diferença ($P>0,05$) com relação ao número total de células entre os grupos de blastocistos frescos, assim como entre os aquecidos (Tabela 3). No entanto, foi observada uma redução no número de células devido ao processo de vitrificação e aquecimento, reduzindo de 26,1 a 49,6% o número total de células em blastocistos aquecidos nos grupos experimentais (respectivamente para os grupos 0% PES D4 e 10% Controle) e de 12,9 % no grupo Controle *in vivo*, quando comparado a embriões frescos (Tabela 3).

Tabela 3: Média ($\pm$ erro padrão) do número total de células e de células apoptóticas dos blastocistos bovinos frescos e aquecidos, e da porcentagem de Re-expansão dos diferentes grupos.

Tratamentos		EMBRIÕES FRESCOS		EMBRIÕES AQUECIDOS			
[SFB]	PES	Nº Células	Células apoptóticas	Nº Células	Células apoptóticas	Embriões Vitrificados	% Re-Expansão
0%	Controle	123.6 $\pm$ 6.0	18.9 $\pm$ 3.2 ^{ab}	91.4 $\pm$ 6,9	37,6 $\pm$ 3,0 ^{ab}	99	85,9 $\pm$ 4,0 ^{bcd}
	PES D2,5	138.7 $\pm$ 5.7	24.6 $\pm$ 3.2 ^{abc}	97.3 $\pm$ 10,1	35,4 $\pm$ 5,4 ^{ab}	56	92,9 $\pm$ 5,0 ^{abc}
	PES D4	133.7 $\pm$ 9.2	19.4 $\pm$ 3.0 ^{abc}	98.8 $\pm$ 4,9	32,5 $\pm$ 1,9 ^{ab}	78	92,9 $\pm$ 5,0 ^{ab}
2,5%	Controle	129.6 $\pm$ 10.3	23.9 $\pm$ 3.1 ^{abc}	98.1 $\pm$ 4,3	42,1 $\pm$ 4,5 ^{abcd}	113	74,3 $\pm$ 3,2 ^{cde}
	PES D2,5	142.9 $\pm$ 11.5	25.5 $\pm$ 2,5 ^{abc}	95.5 $\pm$ 9,3	50,2 $\pm$ 6,2 ^{bcd}	87	85,2 $\pm$ 4,6 ^{abcde}
	PES D4	142.9 $\pm$ 8.2	26.1 $\pm$ 7.1 ^{abc}	98.5 $\pm$ 8,8	36,1 $\pm$ 3,6 ^{abc}	146	85,2 $\pm$ 4,4 ^{abcde}
5%	Controle	144.8 $\pm$ 14.3	31.1 $\pm$ 8.8 ^{abc}	91.9 $\pm$ 5,2	45,8 $\pm$ 4,2 ^{bcd}	114	70,5 $\pm$ 4,4 ^{de}
	PES D2,5	129.6 $\pm$ 16.6	31.5 $\pm$ 4.6 ^{abc}	73.9 $\pm$ 4,1	46,0 $\pm$ 3,9 ^{bcd}	97	75,2 $\pm$ 2,7 ^{bcdde}
	PES D4	146.4 $\pm$ 11.0	26.1 $\pm$ 5.8 ^{abc}	90.1 $\pm$ 9,6	36,0 $\pm$ 2,8 ^{abc}	121	88,3 $\pm$ 4,8 ^{abcd}
10%	Controle	144.8 $\pm$ 11.6	43.1 $\pm$ 6.7 ^c	81.9 $\pm$ 8,8	58,3 $\pm$ 4,7 ^{cd}	148	57,2 $\pm$ 6,6 ^e
	PES D2,5	148.5 $\pm$ 13.7	44.0 $\pm$ 4.8 ^{bc}	74.9 $\pm$ 9,3	60,3 $\pm$ 5,2 ^d	122	66,3 $\pm$ 4,6 ^{de}
	PES D4	154.0 $\pm$ 9.2	39.4 $\pm$ 7.0 ^{bc}	91.4 $\pm$ 7,4	46,3 $\pm$ 6,9 ^{bcd}	135	78,4 $\pm$ 4,4 ^{abcde}
Controle <i>in vivo</i> *		127.9 $\pm$ 6.5	8.1 $\pm$ 1.5 ^a	111.3 $\pm$ 7,1	17,5 $\pm$ 2,1 ^a	15	93,3 $\pm$ 6,7 ^a

^{abcd} Média com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$). N=20-42, *N=5-15,

A menor ($P < 0,05$) taxa de re-expansão foi observada no grupo 10% Controle comparado aos grupos 0% (Controle, PES D2,5, PES D4), 5% PES D4 e Controle *in vivo*. Além disso, a porcentagem de re-expansão dos grupos 10% PES D2,5 e 5% Controle foi menor ($P < 0,05$) que a dos grupos 0% PES D2,5, 0% PES D4 e Controle *in vivo*. Os demais grupos não diferiram ($P > 0,05$) entre si (Tabela 3).

O número de células apoptóticas observado nos blastocistos frescos foi maior ($P < 0,05$) no grupo 10% Controle quando comparado ao grupo 0% Controle e Controle *in vivo*, não se constatando diferença ($P > 0,05$) entre os demais grupos (Tabela 3). Já com relação ao número de células apoptóticas dos blastocistos aquecidos, pode-se observar maior ocorrência ($P < 0,05$) no grupo 10% PES D2,5 quando comparado aos grupos 0% (Controle, PES D2,5, PES D4), 2,5% PES D2,5, 5% PES D4 e Controle *in vivo* (Tabela 3).

Com o aumento da concentração do SFB no meio de cultivo embrionário pode-se verificar, como efeito principal, um aumento ($P < 0,05$) na média do número de células apoptóticas tanto em blastocistos frescos como aquecidos (Tabela 4), e uma redução ($P < 0,05$) na porcentagem de re-expansão após o aquecimento. Além disso, o número total de células por blastocisto após o aquecimento do grupo 10% foi inferior ($P < 0,05$) ao grupo Controle *in vivo* (Tabela 4).

O efeito principal da adição do regulador metabólico PES a partir do D2,5 ou D4 não afetou ($P > 0,05$) o número total de células nos blastocistos frescos, ou número total de células apoptóticas nos embriões frescos quando comparado ao grupo Controle, sendo, no entanto, inferior ($P < 0,05$) ao grupo Controle *in vivo* (Tabela 4). O número total de células dos blastocistos aquecidos dos grupos Controle, PES D4 e Controle *in vivo* foram similares ($P > 0,05$), porém a adição do PES a partir do D2,5 reduziu ($P < 0,05$) o número de células após o aquecimento (Tabela 4).

Ainda com relação ao efeito principal do PES, foi observado um aumento ($P < 0,05$) no número de células apoptóticas dos blastocistos aquecidos submetidos ao tratamento do PES a partir do D2,5, comparando-se ao grupo Controle *in vivo* e PES D4 (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito principal do soro fetal bovino (SFB) e do etossulfato de fenazina (PES) sobre a média ($\pm$ erro padrão) do número total de células e células apoptóticas dos blastocistos bovinos frescos e aquecidos, e da porcentagem de re-expansão.

Respostas	EMBRIÕES FRESCOS		EMBRIÕES AQUECIDOS			
	Nº Células	Células apoptóticas	Nº Células	Células apoptóticas	Nº Embriões Vitificados	% Re-Expansão
SFB						
0%	131,6 $\pm$ 4,1	20,8 $\pm$ 1,8 ^{ab}	95,1 $\pm$ 4,5 ^{ab}	35,7 $\pm$ 2,2 ^b	233	90,5 $\pm$ 2,7 ^a
2,5%	136,0 $\pm$ 5,9	25,1 $\pm$ 2,3 ^b	97,6 $\pm$ 4,0 ^{ab}	42,0 $\pm$ 2,8 ^b	346	81,6 $\pm$ 2,5 ^b
5%	141,0 $\pm$ 8,2	29,7 $\pm$ 3,6 ^b	83,4 $\pm$ 3,9 ^{ab}	43,2 $\pm$ 2,4 ^b	332	78,0 $\pm$ 2,8 ^{bc}
10%	148,8 $\pm$ 6,5	42,2 $\pm$ 3,6 ^c	81,1 $\pm$ 5,3 ^b	56,8 $\pm$ 3,2 ^c	405	67,3 $\pm$ 3,5 ^c
Controle <i>in vivo</i> *	127,9 $\pm$ 6,5	8,1 $\pm$ 1,5 ^{Aa}	111,3 $\pm$ 7,1 ^{Aa}	17,5 $\pm$ 2,1 ^{Aa}	15	93,3 $\pm$ 6,7 ^{aA}
PES						
Controle	136,6 $\pm$ 5,5	30,1 $\pm$ 3,2 ^B	90,2 $\pm$ 3,6 ^{AB}	46,1 $\pm$ 2,4 ^{BC}	474	72,0 $\pm$ 3,0 ^C
PES D2,5	138,2 $\pm$ 6,2	31,1 $\pm$ 2,2 ^B	83,0 $\pm$ 4,6 ^B	49,1 $\pm$ 2,9 ^C	362	79,9 $\pm$ 2,8 ^B
PES D4	144,8 $\pm$ 4,7	28,4 $\pm$ 3,3 ^B	94,7 $\pm$ 3,8 ^{AB}	37,7 $\pm$ 2,2 ^B	480	86,2 $\pm$ 2,4 ^{AB}

(a, b, c) refere-se a diferença entre médias, na mesma coluna, dos grupos 0%, 2,5%, 5% e 10% de SFB e (A, B, C) refere-se a diferença entre as médias, na mesma coluna, dos grupos Controle, PES D2,5, e PES D4; comparados ao grupo Controle *in vivo*. (P<0,05). N=73-134, *N=5-15.

A redução do número total de células nos blastocistos frescos, comparado aos blastocistos aquecidos, variou de 34,5 a 39,9%, em relação ao efeito principal do uso do PES, e 27,7 a 45,0%, em relação ao efeito principal da elevação da concentração de SFB. Ambas as reduções foram maiores que os 12,9% de perda de células apresentada pelo grupo Controle *in vivo* (Tabela 4). O grupo Controle, foi o que apresentou a menor (P<0,05) taxa de re-expansão após o aquecimento, comparado aos grupos PES D2,5, PES D4 e Controle *in vivo*. Além disso, a taxa de re-expansão do grupo PES D4 não diferiu (P>0,05) do grupo Controle *in vivo* (Tabela 4). Tanto o efeito da elevação da concentração do SFB como a adição do PES no meio de cultivo embrionário pode ser observada nas Figuras 15 e 16, em que se visualiza o número total de núcleos (corados em azul) e a ocorrência de apoptose (núcleos fragmentados corados em verde), através da técnica de TUNEL, dos blastocistos fresco e aquecidos, respectivamente. Vale se ressaltar o predomínio da ocorrência da apoptose nas células da MCI nos embriões frescos, e distribuída aleatoriamente nas células dos aquecidos.

Figura 15: Embriões bovinos frescos dos diferentes grupos submetidos à técnica de TUNEL. A coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Os núcleos corados em azul (Hoescht) representam o número total de células. A coloração azul e verde que aparecem no citoplasma é *background*. Aumento de 400x.

Figura 16: Embriões bovinos vitrificados / aquecidos dos diferentes grupos submetidos à técnica de TUNEL. A coloração verde (FITC) indica o DNA fragmentado de células apoptóticas. Os núcleos corados em azul (Hoescht) representam o número total de células. A coloração azul e verde que aparecem no citoplasma é *background*. Aumento de 400x.

Na figura 17 A, pode-se observar que a elevação da concentração do SFB levou a um aumento ($P<0,05$) da média da porcentagem de ocorrência de apoptose nos blastocistos frescos do grupo Controle. Porém, a elevação do soro não afetou ($P>0,05$) a porcentagem de ocorrência de apoptose nos embriões frescos tanto do grupo PES D2,5 e PES D4.

Da mesma forma, o acréscimo do SFB aumentou a porcentagem de ocorrência de apoptose nos blastocistos aquecidos nos grupos Controle e PES D2,5, no entanto, não influenciou ($P>0,05$), as a taxa de apoptose no grupo PES D4, sendo que neste grupo foi observada uma redução ($P<0,05$) da porcentagem de células em apoptose após o aquecimento, em relação aos grupos Controle e PES D2,5, com o uso de 10% de SFB (Figura 17 B).

O grupo Controle *in vivo*, apresentou a menor porcentagem de ocorrência de apoptose com relação aos outros grupos, independentemente de ser fresco ou aquecido (Figuras 17 A e B).

Figura 17: Efeito do soro fetal bovino (SFB) e do etossulfato de fenazina (PES) sobre a média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos bovino frescos (A) e aquecidos (B) produzidos *in vitro* ou *in vivo*. (a, b, c) refere-se a diferença entre o grupo Controle; (A, B, C, D) refere-se a diferença entre o grupo PES D2,5; e (α , β) refere-se a diferença entre o grupo PES D4; dentre as concentrações de SFB e o grupo Controle *in vivo*. ($P < 0,05$). N= 20-42, exceto Controle *in vivo* N=15.

Figura 18: Efeito principal do soro fetal bovino (SFB) sobre a porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos bovino frescos e aquecidos produzidos *in vitro* ou *in vivo*. (a, b, c) refere-se a diferença entre os grupos frescos; (A, B, C, D) refere-se a diferença entre os grupos vitrificados/ aquecidos; ($P < 0,05$). (*) indica diferença entre fresco e vitrificado/aquecido dentre as diferentes concentrações de SFB ($P < 0,001$). $N = 73-84$, exceto Controle *in vivo* $N = 15$.

Como efeito principal, a elevação da concentração do SFB aumentou a porcentagem de ocorrência de apoptose tanto dos blastocistos frescos como aquecidos (Figuras 18 e 19). Além disso, a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos foi superior ($P < 0,001$) a dos embriões frescos independente das concentrações de SFB (Figura 18).

Figura 19: Relação entre a concentração do soro fetal bovino e a média da porcentagem de células apoptóticas dos blastocistos bovino produzidos *in vitro* frescos e aquecidos. R^2 – Coeficiente de determinação.

Em contrapartida, a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos do grupo Controle *in vivo* não diferiu ($P > 0,05$) da porcentagem de apoptose fresco, além disto, este grupo foi o grupo que apresentou a menor taxa de apoptose celular comparado aos demais (Figuras 18 e 20).

Figura 20: Efeito principal do etossulfato de fenazina (PES) sobre a porcentagem de apoptose, em relação ao número total de células, dos blastocistos bovinos frescos e aquecidos produzidos *in vitro* ou *in vivo*. (a, b) refere-se a diferença entre os grupos frescos; (A, B, C) refere-se a diferença entre os grupos aquecidos; ($P < 0,05$). (*) indica diferença entre fresco e aquecidos dentre os grupos Controle, PES D2,5 e PES D4 ($P < 0,001$). N= 82-134, exceto Controle *in vivo* *N=15.

Já o efeito principal da adição do PES a partir do D2,5 ou D4 não alterou ($P > 0,05$) a porcentagem de apoptose dos blastocistos frescos, quando comparados ao grupo Controle. Porém, a adição do PES a partir do D4, reduziu ($P < 0,05$) a ocorrência de apoptose nos embriões aquecidos, quando comparados aos grupos Controle e PES D2,5 (Figura 20). Além disso, a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos também foi superior ($P < 0,05$) a dos frescos (Figura 20).

Figura 21: Relação entre a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($r=0,81$; $P=0,0008$), médias ($r=0,80$; $P=0,0009$) e grandes ($r=0,75$; $P=0,0034$) e a média da porcentagem de células apoptóticas dos embriões bovinos frescos. R^2 – Coeficiente de determinação.

Figura 22: Relação entre a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($r=0,71$; $P<0,0001$), médias ($r=0,70$; $P<0,0001$) e grandes ($r=0,63$; $P<0,01$) e a média da porcentagem de células apoptóticas dos embriões bovinos aquecidos. R^2 – Coeficiente de determinação.

Na Figura 21, pode-se observar uma forte correlação e coeficiente de determinação entre o acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($r=0,81$ e $R^2=0,656$; $P=0,0008$), médias ($r=0,80$ e $R^2=0,645$; $P=0,0009$) e grandes ($r=0,75$ e $R^2=0,555$; $P=0,0034$) sobre a ocorrência da apoptose celular em embriões frescos.

Da mesma forma, pode-se observar na Figura 22, uma moderada correlação e coeficiente de determinação entre o acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas pequenas ($r=0,71$ e $R^2=0,592$; $P=0,0058$), médias ($r=0,69$ e $R^2=0,563$; $P=0,0079$) e grandes ($r=0,62$ e $R^2=0,541$; $P=0,0223$) sobre a ocorrência da apoptose celular em embriões aquecidos.

Figura 23: Relação entre a média da porcentagem células apoptóticas dos blastocistos bovino frescos e a média da porcentagem de células apoptóticas dos blastocistos bovino aquecidos ($r=0,94$; $P<0,0001$). R^2 – Coeficiente de determinação.

No entanto, apesar da média do número de gotas lipídicas apresentar uma correlação considerável com a apoptose celular em embriões aquecidos (Figuras 23), a maior correlação e coeficiente de determinação foi observada entre a porcentagem de apoptose fresco e a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos ($r=0,94$ e $R^2=0,878$; $P<0,0001$).

DISCUSSÃO

7- DISCUSSÃO

O Brasil possui uma posição estratégica no mercado mundial de produção de bovinos. Atualmente possuímos o maior rebanho comercial do mundo com aproximadamente 200 milhões de cabeças (IBGE, 2006), e ainda, somos líderes e referência mundial na PIV de embriões bovinos (VIANA e CAMARGO, 2007). Marca esta alcançada devido a grande adaptação da raça Nelore frente as mudanças que foram ocorrendo ao longo das décadas passadas para o avanço dos resultados da técnica de PIV (GARDNER e LANE, 2002).

No entanto, no mercado nacional, predomina o uso de transferências realizadas com embriões frescos (VIANA e CAMARGO, 2007), uma vez que as taxas de concepção oriundas da inovulação de embriões criopreservados ainda são insatisfatórias (HASLER, 2003). Associado a isso, os embriões PIV possuem uma maior susceptibilidade a criopreservação do que os produzidos *in vivo*, o que frequentemente, é associado com o grande conteúdo lipídico presente nestes embriões (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006).

Com o intuito de colaborar na superação dos desafios inerentes a criopreservação de embriões PIV, este experimento objetivou testar o uso de diferentes concentrações de SFB (0%, 2,5%, 5% e 10%) e a adição do regulador metabólico PES, a partir do D2,5 e D4, no meio de cultivo embrionário visando a produção de embriões com melhor resposta ao processo de vitrificação. Os resultados do presente estudo indicaram que a adição do SFB no meio de cultivo aumentou a porcentagem de produção de blastocistos (por oócitos e por estruturas clivadas) e o escore de desenvolvimento embrionário, no entanto, sem alteração da taxa de clivagem (Tabela 2).

Segundo a literatura, a presença do SFB pode inibir as primeiras divisões da clivagem, enquanto que posteriormente ele pode acelerar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (RIZOS et al., 2002, 2003; ENRIGHT et al., 2000). Neste trabalho, apesar de o SFB não afetar a taxa de clivagem, tanto a porcentagem de produção de blastocistos como o escore do grau de desenvolvimento embrionário foram favorecidos pela presença deste componente, concordando com o estudo de Van Wagtenonk et al. (1997). Entretanto os resultados do presente experimento diferem dos obtidos por Mucci et al. (2006) e Barceló-Fimbres & Seidel Jr (2007b) que não verificaram diferenças, com

relação ao uso do soro, tanto em relação as taxas de clivagem como de produção de blastocistos utilizando a suplementação de 0, 5 ou 10% de SFB, respectivamente.

Alguns autores relataram que a suplementação do soro aumenta o número de células por embrião aumentando conseqüentemente, a sua qualidade (VAN WAGTENDONK et al. 1997; FOULADI-NASHTA et al., 2005; MUCCI et al., 2006). Entretanto, outros autores não observaram este efeito (GOMEZ e DIEZ, 2000) ou verificaram um efeito negativo sobre o número total de células e qualidade embrionária (BYRNE et al., 1999; SUDANO et al., 2008). No presente experimento, a suplementação do SFB não alterou o número total de células dos embriões (Tabela 3 e 4).

Esta variação de resultados encontrados na literatura indica que o efeito do soro sobre a produção, desenvolvimento e qualidade embrionária é complexo. Além disso, deve-se considerar que a variação dos resultados pode ter ocorrido devido as diferenças inerentes aos sistemas de cultivo embrionário utilizado em cada trabalho, fazendo-se necessário mais estudos e padronização dos sistemas de cultivo para aprofundar os conhecimentos relevantes a este tema.

O PES é um regulador metabólico que inibe a síntese de ácidos graxos e favorece a via pentose-fosfato por oxidar o NADPH em NADP⁺ (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b). A adição de 0,3 µM deste regulador no meio de cultivo a partir do dia D2,5 não afetou a taxa de clivagem e o escore do estágio de desenvolvimento embrionário. Porém, a adição do mesmo a partir do D2,5 reduziu a porcentagem de produção de blastocistos / oócitos e blastocistos / estruturas clivadas.

Já a adição do PES no meio de cultivo a partir do D4 não alterou as porcentagens de clivagem, blastocistos / oócitos, blastocistos / estruturas clivadas, e os escores do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade embrionária quando comparado ao grupo Controle sem a adição deste regulador (Tabela 2).

No trabalho de De La Torre-Sanchez et al. (2006a), apesar da adição de PES na concentração de 0,9 µM no meio de cultivo, a partir do D2,5, apresentar um efeito tóxico, doses menores de PES (0,1 e 0,3 µM) não apresentaram diferença com relação à taxa de produção de blastocisto, massa celular interna e número de células quando comparadas com o grupo Controle.

Da mesma maneira, Gajda et al. (2008) estudando a qualidade embrionária de embriões suínos, observaram que o uso de 0,025-0,075 μ M de PES no meio de cultivo com embriões no estágio de duas células além de melhorar o desenvolvimento embrionário, resultou no aumento da qualidade levando a redução de 25% da incidência de apoptose nos embriões tratados com PES.

Os embriões PIV, apresentam um maior acúmulo lipídico citoplasmático quando comparado a embriões oriundos da produção *in vivo*. Este fato pode ser comprovado nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 14, estando em consenso com a literatura (FAIR et al., 2001; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b).

Entretanto, a causa do elevado conteúdo lipídico dos embriões PIV ainda não é totalmente conhecida. Acredita-se que este acúmulo possa ocorrer em função da suplementação do meio de cultivo com SFB (ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b), ou então devido a uma anormalidade do metabolismo energético embrionário, levando a um desequilíbrio das vias metabólicas (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

No presente experimento foi possível observar, claramente, que a elevação da concentração do SFB no meio de cultivo embrionário afeta diretamente o acúmulo lipídico citoplasmático (Figuras 8, 9, 10, 11, 14), e possui um alto coeficiente de determinação com o aumento do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes (Figura 13). Estes resultados concordam com a literatura, uma vez que o acúmulo lipídico em embriões PIV é maior com a suplementação de 5% (ABE et al., 2002; GEORGE et al., 2008) ou 10% (BARCELO-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a) de SFB, quando comparados a meios livres de soro.

De fato, estima-se que blastocistos bovinos oriundos de sistemas de cultivo com a suplementação de 10% SFB possuam 62 ng de triglicerídeos, sendo que os oriundos de sistemas livres de soro possuem apenas 36 ng (FERGUSON e LEESE, 1999). Sata et al. (1999) demonstraram que a suplementação de 5% de soro no meio de cultivo resulta no aumento da composição dos ácidos graxos saturados palmítico e esteárico, e os monoinsaturados oléico e palmitoléico em blastocistos bovinos.

Especulam-se alguns mecanismos que explicariam o acúmulo lipídico devido a suplementação do SFB no meio de cultivo, dentre eles pode-se citar: a) as lipoproteínas presentes no soro poderiam ser internalizadas pelas células embrionárias aumentando o conteúdo lipídico citoplasmático (SATA et al., 1999;

ABE e HOSHI, 2003), b) a presença do soro alteraria a β -oxidação em função de uma disfunção mitocondrial (DORLAND et al., 1994; CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002), e c) o embrião seria induzido a realizar uma neo-síntese de triglicerídeos em função da presença do soro (RAZEK et al., 2000).

Por outro lado, o acúmulo lipídico também pode ocorrer devido uma alteração do metabolismo energético, originando um aumento expressivo dos precursores da síntese lipídica, e um desbalanço do estado de redução-oxidação afetando o metabolismo mitocondrial o que prejudica a metabolização de complexos lipídicos através da β -oxidação (DORLAND et al., 1994; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

Visando regular o metabolismo embrionário e propiciar um equilíbrio das vias metabólicas para reduzir o acúmulo lipídico, foi adotado o uso do fármaco PES no meio de cultivo a partir do D2,5 e D4 a fim de inibir a síntese de ácidos graxos e favorecer a metabolização do substrato energético através da via da pentose e fosfato (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; b; BARCELO-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007a; b).

A adição do PES ao meio de cultivo foi eficiente em reduzir o acúmulo de lipídios citoplasmáticos em embriões PIV, uma vez que a utilização deste fármaco, no período de pós-compactação embrionária, proporcionou uma redução expressiva do número de gotas lipídicas (Figura 12). Entretanto, mesmo com o uso do PES, a redução do conteúdo lipídico dos embriões PIV não se equiparou ao Controle *in vivo*, o qual apresentou o menor acúmulo lipídico (Figuras 12, 13 e 14). Observação semelhante também foi constatada por DE LA TORRE-SANCHEZ et al. (2006b).

A adição do PES a partir do D2,5, proporcionou uma redução mais pronunciada no conteúdo lipídico embrionário, diminuindo o número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes em relação ao grupo Controle, além de também reduzir o número de gotas grandes em relação ao grupo PES D4 (Figura 12). Já o uso do PES a partir do D4 reduziu a média do número de gotas lipídicas citoplasmáticas médias e grandes, porém, não diminui o número de gotas pequenas.

Em trabalhos de outros grupos de pesquisa, já foi constatada a atuação efetiva do PES na redução do acúmulo lipídico embrionário. No estudo de De La Torre-Sanchez et al. (2006b), o tratamento dos embriões PIV com 0,3 μ M PES a

partir do D2,5 possibilitou um acúmulo lipídico menor quando comparado com o grupo DNP ou NaN_3 e o Controle *in vitro*. Da mesma maneira, Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a) utilizando 0,3 μM de PES obtiveram um menor acúmulo de lipídio citoplasmático quando comparado com o grupo Controle, e o grupo suplementado com 1 ou 3 $\mu\text{g/mL}$ de cerulenin.

A duração do período de exposição do embrião ao PES é decisiva no que se refere ao acúmulo lipídico (Figura 12), uma vez que uma exposição mais curta a este regulador resultou em uma menor redução do acúmulo lipídico. No entanto, um fator a se considerar nesta redução lipídica menos intensa do grupo PES D4 comparado ao PES D2,5, é o provável maior conteúdo lipídico prévio presente no embrião no início do período de exposição a este fármaco (D4).

Sabe-se que existe um aumento do número de gotas lipídicas citoplasmáticas médias e grandes nos estágios de dois e de oito células até o estágio de mórula, que é o estágio onde ocorre o maior acúmulo lipídico embrionário em meios suplementados com soro (ABE et al., 2002). Este fato coincide exatamente, com o período de exposição do PES a partir do D4, iniciando a sua atuação em embriões com maior acúmulo lipídico prévio do que a partir do D2,5, o que provavelmente, reflete numa redução mais branda do acúmulo lipídico nos embriões oriundo deste tratamento.

O motivo da importância dada pela literatura ao acúmulo lipídico embrionário é a aparente redução da criotolerância embrionária (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELO-FIMBRES & SEIDEL JR, 2007b). Além disso, o acúmulo lipídico está relacionado com a apoptose celular (Figura 20).

A porcentagem de ocorrência de apoptose observada nos embriões frescos apresentou uma forte correlação e coeficiente de determinação (Figura 20) com a média do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes, ou seja, quanto maior o acúmulo lipídico embrionário maior a ocorrência de apoptose nos embriões frescos PIV.

A apoptose é definida como uma forma altamente conservada de morte celular e desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário e na homeostase celular, atuando como um mecanismo de controle da qualidade celular através da remoção de células danificadas, anormais, não funcionais, e em número excessivo (JACOBSON et al., 1997; PAULA-LOPES e HANSEN, 2002).

Apesar da apoptose ser considerada um mecanismo endógeno, benéfico para melhora da qualidade embrionária (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002), uma alta incidência deste processo é associada com a redução da viabilidade embrionária (BYRNE et al., 1999).

Uma das formas de quantificação da apoptose é através da reação de TUNEL, que possibilita a detecção *in situ* de células apoptóticas, pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA geradas pela atividade de DNAases endógenas durante o processo de apoptose (GJORRET et al., 2003).

No presente experimento a elevação do SFB aumentou a média da porcentagem de apoptose nos embriões frescos e aquecidos (Figuras 15, 18 e 19), assim como também aumentou a média do número de células apoptóticas, sem alterar o número total de células por blastocisto frescos (Tabela 4). Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Byrne et al. (1999) onde também se pode observar que a adição de 10% de SFB no meio de cultivo provocou o aumento da porcentagem de apoptose (4%) comparado ao grupo sem a suplementação de soro (2,5%).

A adição do PES a partir do D2,5 ou D4 não afetou a média da porcentagem de apoptose (Figura 20 e 15), a média do número de células apoptóticas e a do número total de células por blastocisto fresco (Tabela 4), comparado ao grupo Controle. Fato este, concorda com o observado em blastocistos suínos submetidos ao tratamento com o PES nos quais o número total de células e porcentagem de apoptose também não foi afetado (GAJDA et al., 2008).

Independente da concentração do SFB ou da adição do PES, o grupo Controle *in vivo* possui a menor média da porcentagem de apoptose, e do número de células apoptóticas (Tabela 4, e Figuras 15, 18 e 20), como descrito por Gjorret et al. (2003) em que os embriões produzidos *in vivo* apresentaram uma menor porcentagem de apoptose que o embrião PIV (5,4% vs 8,9%, respectivamente). Além disso, a ocorrência de apoptose após a vitrificação / aquecimento não diferiu da dos embriões frescos, evidenciando a maior criotolerância e qualidade destes embriões. Como se pode observar na Figura 15, a maior incidência de apoptose se deu nas células da massa celular interna quando comparado as do trofoblasto, característica esta já descrita anteriormente em camundongos (HARDY e HANDYSIDE, 1996) e bovinos (BYRNE et al., 1999), afetando em torno de 10% das células da MCI e apenas 4% das do trofoblasto.

Acredita-se que esta maior ocorrência de apoptose na MCI seja para a remoção de células lesadas, em excesso, e que não são necessárias ou competentes para o desenvolvimento do conceito, atuando como um rigoroso controle da qualidade na MCI uma vez que essa linhagem de células originará o feto (BYRNE et al., 1999).

Todos os processos que desencadeiam alguma forma de estresse ao embrião são apontados como causas da ocorrência de apoptose, como por exemplo, o estresse térmico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002; HANSEN, 2007), estresse oxidativo (GUERIN et al., 2001), o estresse devido a condições desfavoráveis do sistema de cultivo, destacando-se a composição do meio (DEVREK e HARDY, 1997; MOLEY et al., 1998) e o estresse devido a criopreservação dos embriões.

No presente trabalho, foi possível constatar o estresse gerado pela criopreservação dos embriões. Observou-se um aumento da porcentagem de ocorrência de apoptose após a vitrificação / aquecimento nos grupos experimentais *in vitro* comparado aos embriões dos respectivos grupos frescos (Figuras 18 e 20). Além disso, diferente do que ocorre com os embriões frescos, em que a apoptose se concentra nas células da MCI, nos embriões aquecidos pode-se constatar uma distribuição aleatória da incidência da apoptose (Figura 16), afetando tanto as células da MCI como do trofoblasto, comprovando a redução da qualidade embrionária frente ao processo de vitrificação (Marquez et al., 2005). Outro aspecto relevante é a redução do número total de células apresentada pelos embriões aquecidos após a vitrificação quando comparado ao número de células dos embriões frescos (Tabelas 3 e 4), fato este associado com o processo de degeneração celular, fazendo com que estas células não sejam coradas pelos corantes nucleares fluorescentes em função dos danos associados ao estresse sofrido pelos embriões durante a criopreservação.

De acordo com a literatura, a adição do SFB no meio de cultivo embrionário reduz a criotolerância embrionária (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b). De fato, como observado na Tabela 4 e Figura 18, não só a adição, mas também, a elevação da concentração do SFB reduziu a criotolerância embrionária expressa através da diminuição da taxa de re-expansão, e confirmada com o aumento da taxa de apoptose nos embriões aquecidos. Além disso, a adição do SFB reduziu o número

total de células, e aumentou o número de células apoptóticas dos blastocistos aquecidos (Tabela 4).

Em contrapartida, adição do PES, a partir do D4, aumentou a taxa de re-expansão (Tabela 4) e reduziu a porcentagem de apoptose nos embriões aquecidos (Figura 20). Porém, a adição do PES, a partir do D2,5, apesar de aumentar a taxa de re-expansão em relação ao grupo Controle (Tabela 4), aumentou também o número de células apoptóticas (Tabela 4), mas sem alteração da porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos (Figura 20).

Talvez, a maior exposição dos embriões ao PES, a partir do D2,5, tenha alterado o equilíbrio do estado de redução-oxidação pela possibilidade de ter atuado como uma NADPH oxidase provocando um aumento na produção das ROS devido a oxidação do NADPH (GEISZT e LETO, 2004), uma vez que esta coenzima desempenha um grande papel na redução da glutathione intracelular (GARDNER e LANE, 1997), um importante antioxidante para o embrião (RIEGER, 1992). Associado a isto, a maior sensibilidade dos embriões criopreservados às ROS (GUERIN et al., 2001) pode ter potencializado este efeito e originado uma maior incidência de apoptose neste tratamento. Outra hipótese pode estar relacionada a elevada redução do conteúdo lipídico, induzida por esta droga, comprometendo a síntese das membranas celulares e desencadeando o processo de apoptose.

Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007b) observaram que a adição de PES, a partir do D2,5, ao meio de cultivo aumentou a sobrevivência embrionária após congelamento convencional ou vitrificação (92^a, 85^b e 60^c % de sobrevivência, para os grupos PES, Controle e 10% SFB, respectivamente; $P < 0,05$), contrariando os resultados obtidos no presente estudo com relação ao grupo PES D2,5, mas concordando com os resultados do uso da droga a partir do D4.

Aparentemente, a principal causa da reduzida criotolerância apresentada pelos embriões PIV, atribuída pela literatura, é o seu excessivo acúmulo lipídico citoplasmático (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b). Concordando com estas observações, no presente experimento foi observada uma moderada correlação e coeficiente de determinação entre a média do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes com a média da taxa de apoptose dos embriões aquecidos (Figura 22). Além disso, existe uma forte correlação e coeficiente de

determinação entre a elevação da média do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes com a porcentagem de apoptose nos embriões frescos (Figura 21). No entanto, a maior correlação e coeficiente de determinação foi observada entre a média de apoptose dos embriões frescos e a média da apoptose dos embriões aquecidos (Figura 23). A partir desses dados, ressalta-se a grande importância da qualidade dos embriões para a sua viabilidade após a criopreservação.

Apesar disso, um dado conflitante está presente nas figuras 10 e 17B, tomando-se como base a concentração de 10% de SFB em ambas as figuras, onde o uso do PES a partir do D2,5 reduziu consideravelmente a média do número de gotas lipídicas grandes tanto em relação ao grupo Controle como ao grupo PES D4 (Figura 10), mas, ao invés de reduzir a taxa de apoptose dos embriões aquecidos, a exposição ao PES a partir do D2,5 aumentou a apoptose em relação ao grupo PES D4 (Figura 17B).

Na literatura, existem algumas controvérsias considerando a relação do acúmulo lipídico com a criotolerância de embriões produzidos *in vivo* assim como as observadas no presente estudo com embriões PIV. Apesar das mórulas serem o estágio embrionário, notadamente, com o maior acúmulo lipídico (ABE et al., 2002), no estudo conduzido por Rodrigues et al. (2007) foi constatado que são exatamente esses embriões que possuem a maior taxa de concepção após descongelação e inovulação em receptoras. E ainda, apesar dos embriões taurinos (*Bos taurus taurus*) produzidos *in vivo* apresentarem maior acúmulo de lipídio citoplasmático que os zebuínos (*Bos taurus indicus*), são os embriões taurinos que se mostram mais resistentes ao processo de vitrificação (VISINTIN et al., 2002).

Tanto os dados apresentados neste trabalho como os referenciados na literatura (VISINTIN et al., 2002; RODRIGUES et al., 2007) dão subsídio para questionar a real contribuição do acúmulo lipídico sobre a criotolerância embrionária e indagar se o acúmulo lipídico não é uma consequência de uma série de eventos depreciativos da qualidade dos embriões PIV, tais como os efeitos nocivos da suplementação do SFB no meio de cultivo, o desequilíbrio do estado de redução-oxidação do metabolismo e o aumento das ROS, que culminariam na grande sensibilidade do embrião PIV frente a criopreservação.

CONCLUSÕES

8- CONCLUSÕES

8.1- A elevação da suplementação do SFB no meio de cultivo favoreceu o desenvolvimento embrionário. O uso do PES a partir do D2,5 prejudicou a produção de blastocistos, entretanto, quando adicionado a partir do D4 não apresentou nenhum efeito deletério.

8.2- Com a elevação da concentração do SFB houve um aumento do acúmulo lipídico citoplasmático, porém, o uso do PES (a partir do D2,5 ou D4) reduziu o conteúdo lipídico dos embriões bovinos PIV.

8.3- A porcentagem de apoptose nos embriões frescos foi aumentada com a elevação da concentração do SFB, no entanto, a adição do PES ao meio de cultivo, tanto a partir do D2,5 como do D4, não alterou a porcentagem de apoptose fresco.

8.4- A sobrevivência embrionária após a vitrificação foi diminuída pela elevação da concentração de SFB, e aumentada com a adição do PES apenas a partir do D4. O tratamento realizado com PES iniciando no D2,5 não aumentou a criotolerância embrionária.

8.5- Independente da retirada do SFB e do uso do PES no meio de cultivo embrionário, o grupo Controle *in vivo* apresentou o menor acúmulo lipídico, a menor porcentagem de apoptose fresco, e a maior sobrevivência após a vitrificação.

8.6- O aumento do acúmulo lipídico embrionário possui uma forte correlação com o aumento da taxa de apoptose dos embriões frescos, e uma moderada correlação com o aumento da taxa de apoptose dos embriões aquecidos. No entanto, a maior correlação foi observada entre a porcentagem de apoptose fresco e a porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

9- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O maior obstáculo para uma ampla disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos está associado com a grande sensibilidade apresentada por estes embriões frente às técnicas de criopreservação. Os embriões PIV não toleram a criopreservação como os produzidos *in vivo*, e segundo a literatura essa reduzida criotolerância está associada com a presença de um grande acúmulo lipídico citoplasmático.

O presente trabalho estudou maneiras de aumentar a sobrevivência embrionária após a vitrificação através da análise de diferentes concentrações de soro fetal bovino (0, 2,5, 5 e 10%) e da exposição ao regulador metabólico etossulfato de fenazina em três períodos distintos (Controle – sem exposição ao PES; PES D2,5 – exposição a partir de 60 horas do cultivo; PES D4 – exposição a partir de 96 horas de cultivo). Foi constatado que a redução da concentração do SFB no meio de cultivo embrionário e a adição do PES a partir do D4 aumentam a sobrevivência embrionária após a vitrificação, sendo, o tratamento com 2,5% de SFB e a adição do PES a partir do D4 o que obteve o maior equilíbrio entre produção e criotolerância embrionária.

A suplementação do SFB na concentração de 2,5% propiciou uma elevada produção embrionária sem afetar sua sobrevivência após a vitrificação, uma vez que obteve taxas de apoptose dos embriões aquecidos após a criopreservação comparáveis as apresentada pelo grupo sem o uso do SFB no meio de cultivo embrionário.

Além disso, contrariando a literatura, foi possível constatar que a qualidade embrionária, expresso em porcentagem de apoptose, é mais determinante do que o acúmulo lipídico citoplasmático para a sobrevivência dos embriões PIV após a vitrificação. Fato este fornece subsídios para questionar a real contribuição do acúmulo lipídico para a reduzida criotolerância apresentada por estes embriões, e ainda, indagar se o acúmulo lipídico não é uma consequência de uma série de eventos depreciativos da qualidade dos embriões PIV ao longo do cultivo *in vitro*, tais como os efeitos nocivos da suplementação do SFB no meio de cultivo, o desequilíbrio do estado de redução-oxidação do metabolismo e aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (ROS), que além de

culminar no acúmulo lipídico resultam na grande sensibilidade do embrião PIV frente às técnicas de criopreservação.

Aparentemente, a adição do PES a partir do D4 favoreceu um maior equilíbrio do estado de redução-oxidação, que associado a concentrações reduzidas de SFB proporcionaram o aumento da criotolerância embrionária devido, provavelmente, uma redução do estresse oxidativo sofrido por estes embriões, que por sua vez, tiveram maior condição de suportar o estresse ocasionado pelo processo de criopreservação. Por outro lado, o uso do PES a partir do D2,5, assim como a suplementação de elevadas concentrações de SFB, possivelmente, alteraram o equilíbrio do estado de redução-oxidação (devido a uma oxidação excessiva do NADPH, sabidamente uma coenzima que desempenha funções biossintéticas importantes tais como a atuação na síntese de membranas celulares e função antioxidante, reduzindo a glutatona intracelular), e ocasionou uma disfunção mitocondrial (alterando o processo de β -oxidação), respectivamente, resultando em um grande estresse oxidativo em função da elevação das ROS.

PERSPECTIVAS FUTURAS

10- PERSPECTIVAS FUTURAS

Com objetivo de melhorar a criopreservação dos embriões PIV e compreender a real contribuição do acúmulo lipídico citoplasmático para a redução da sua criotolerância, alguns estudos devem ser realizados:

1) Estudar o estresse oxidativo sofrido pelos embriões PIV ao longo do período de cultivo embrionário e após o processo de vitrificação e aquecimento, através da quantificação dos ROS presentes no meio de cultivo, pelo padrão de expressão de genes alvos marcadores do estresse oxidativo e pelo uso de agentes antioxidantes;

2) Avaliar as diferenças morfológicas e ultra-estruturais entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* das subespécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* visando elucidar as diferenças com relação a criotolerância destes embriões.

3) Estabelecer a comparação do padrão da expressão gênica entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* das subespécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* visando esclarecer as diferenças com relação a criotolerância destes embriões.

4) Avaliar as taxas de concepção dos embriões criopreservados e compará-los com os parâmetros *in vitro* de sobrevivência após a vitrificação, tais como taxa de re-expansão, eclosão e apoptose;

5) Testar outras técnicas de criopreservação e estudar o perfil de ácidos graxos dos ao longo de todas as fases de desenvolvimento embrionário;

6) Analisar e pontuar os danos causados pela criopreservação dos embriões, avaliando as características morfológicas, ultra-estruturais e moleculares antes e após o processo de criopreservação.

BIBLIOGRAFIA

11- BIBLIOGRAFIA

ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **J. Reprod. Dev.**, v. 49, p.193–202, 2003.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p. 57–66, 2002.

ABE, H.; YAMASHITA, T.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitromatured and-fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serumfree medium or in serum-supplemented medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 325-335, 1999.

ALIKANI, M.; SADOWY, S.; COHEN, J. Human embryo morphology and developmental capacity. In: A. VAN SOOM.; BOERJAN, M. **Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer's Academic Publishers. 2002. p.1-31.

ALVARENGA, M.A.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Criopreservação de embriões eqüinos. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 799-809, 2007.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JUNIOR, J.E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid acumulation in Vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 1406-1418, 2007a.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JUNIOR, J.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate an either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embrionic development alter cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 74, p. 1395-1405, 2007b.

BARIL, G.; TRALDI, A-L.; COGNIÉ, Y.; LEBOEUF, B.; CBECKERS, J.F.; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v. 56, p. 299-305, 2001.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Hum. Reprod. Update**, v. 1, p. 91–148, 1995.

BEITZ, D.C. Metabolismo dos Carboidratos; Metabolismo dos Lipídios. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.398-429.

BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p. 171–191, 2001.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol. Reprod.**, v. 27, p. 147–158, 1982.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **J. Reprod. Fertil.**, v. 117, p. 97–105, 1999.

CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE- SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JUNIOR, G.E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 1200-1214, 2006.

CHATOT, C.L.; ZIOMEK, C.A.; BAVISTER, B.D.; LEWIS, J.L.; TORRES, I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 86, p. 679–688, 1989.

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

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; GARDNER, D.K.; PRIEIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18, p. 597-607, 2006b.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; PRIEIS, K.; SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro bovine embryos. I. Effect of metabolica regulators at different glucosa concentrations with embryos produced by semen from different bulls. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 18, p. 585-596, 2006a.

DEVREKER, F.; HARDY, K. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 921–928, 1997.

DHARAP, S.S.; CHANDNA, P.; WANG, Y.; KHANDARE, J.J.; QIU, B.; STEIN, S.; MINKO, T. Molecular Targeting of BCL2 and BCLXL Proteins by Synthetic BCL2 Homology 3 Domain Peptide Enhances the Efficacy of Chemotherapy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 316, p. 992-998, 2006.

DORLAND, M.; GARDNER, D.K.; TROUNSON, A.O. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 13, p.70, 1994.

DOWNS, S.M.; HUMPHERSON, P.G.; LEESE, H.J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: Involvement of the pentose phosphate pathway. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 1084–1094, 1998.

DUFASNES, E.; VANDERHEYDEN, I.; ROBIN, D.; DELCOURT, J.; PAMPFER, S.; DE HERTOOGH, R. Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocysts from normal and diabetic rats. **J. Reprod. Fertil.**, v. 98, p. 169–177, 1993.

ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; BRIENZA, V.C.; SEIDEL JUNIOR, G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308-1319, 2005.

ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro versus in vivo: Implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, p. 659–673, 2000.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTEL, D.C.; HITTEL, P. Ultrastructure of bovine blastocysts following criopreservation: effect of method of blastocyst production. **Mol. Reprod. Dev.**, v.58, p.186-195, 2001.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 116, p. 373–378, 1999.

FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 673–679, 1993.

FOULADI-NASHTA, A.A.; ALBERIO, R.; KAFI, M.; NICHOLAS, B.; CAMPBELL, K.H.S.; WEBB, R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. **Reprod. Biomed. Online**, v.10, p.497–502, 2005.

GAJDA, B.; BRYLA, M.; SMORAG, Z. Effects of protein source, vitamin E and phenazine ethosulfate on development competence and quality of porcine embryos cultured in vitro. **Folia Biol. (Kraków)**, v. 56, p. 57-63, 2008.

GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. **Theriogenology**, v. 49, p. 83-102, 1998.

GARDNER, D.K.; LANE, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? **Hum. Reprod. Update**, v. 3, p. 367-382, 1997.

GARDNER, D.K.; LANE, M. Development of viable mammalian embryos in vitro: Evolution of sequential media. In: CIBELLI, J.; LANZA, R.P.; CAMPBELL, K.H.S.; WEST, M.D. (Eds.). **Principles of cloning**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 187–213.

GARDNER, D.K.; POOL, T.B.; LANE, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. **Semin. Reprod. Med.**, v. 18, p. 205–218, 2000.

GEISZT, M.; LETO, T.L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 51715–51718, 2004.

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

GJORRET, J.O.; KNIJIN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; HYTTEL, M. Cronology of apoptosis un bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 1193-1200, 2003.

GOMEZ E, DIEZ C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.58, p.23–37, 2000.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GUERIN, P.; EI MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative strees and protection against reactive oxygen species in the pré-implantation embryo and its surrondings. **Hum. Reprod. Update**, v. 7, p. 175-189, 2001.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division in the mouse blastocyst before implantation. **Roux's Arch. Dev. Biol.**, v.195, p. 519-526, 1986.

HANSEN, P.J. To be or not to be—Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v. 68, p. 40-48, 2007.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Rev. Reprod.**, v. 4, p. 125-134, 1999.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H. Metabolism and cell allocation during parthenogenetic mouse preimplantation development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 43, p. 313-322, 1996.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. Redox regulation of early embryo development. **Reproduction**, v. 123, p. 479-486, 2002.

HASLER, J.F. The current status and the future of the commercial embryo transfer in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 15, p. 245–264, 2003.

HOCHI, S.; KOZAWA, M.; FUJIMOTO, T.; HONDO, E.; YAMADA, J.; OGURI, N. In vitro maturation and transmission electron microscope observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v. 33, p. 300-310, 1996.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; CALLESEN, H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. **Reproduction**, v. 123, p. 553–565, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Brasília: IBGE, 2006. v. 34.

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

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 847– 856, 2000.

KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryoscultured in semi-defined and defined culture media. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 1345–1352, 1999.

LANE, M.; GARDNER, D.K. EDTA stimulates development of cleavage stage mouse embryos by inhibiting the glycolytic enzyme 3-phosphoglycerate kinase. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 193, 1997.

LANE, M.; MAYBACH, J.M.; GARDNER, D.K. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 2686–2693, 2002.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine in

vitroproduced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 767–775, 2002.

LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development **Hum. Reprod. Update**, v. 1, p. 63–72, 1995.

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

LEIBO, S.P.; MAZURP, P.; JACKOWSKI, S.C. Factors affecting the survival of frozen thawed mouse embryos. **Cryobiology**, v.11, p.509, 1973.

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

MACHÁTY, Z.; THOMPSON, J.G.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.; PRATHER, R.S. Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compactation improve development of *in vitro* produced porcine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 58, p. 39-44, 2001.

MARQUEZ, Y.C.; GALINA, C.S.; MORENO, N.; RUIZ, H.; RUIZ, A.; MERCHANT, H. Seasonal Effect on Zebu Embryo Quality as Determined by Their Degree of Apoptosis and Resistance to Cryopreservation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 40, p. 553–558, 2005.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57–68, 2000.

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

MESQUITA, L.G. **Bloqueio da fosforilação oxidativa no cultivo de embriões bovinos**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

MOLEY, K.H.; CHI, M.M.Y.; KNUDSON, C.M.; KORSMEYER, S.J.; MUECKLER, M.M. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. **Nat. Med.**, v. 4, p. 1421–1424, 1998.

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

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; NOTTLE, M.B. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature**, v. 374, p. 4-16, 1995.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparasion on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 64, p. 437-449, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: WH Freeman and Company, 2005. 237p.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, p. 109-124, 1991.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Sci. Vet.**, v. 31, p. 509, 2003.

OLSON, S.E.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically definedmedium. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 152–157, 2000.

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

PARONE, P.A.; JAMES, D.; MARTINOU, J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. **Biochimie**, v. 84, p. 105-111, 2002.

PARTRIDGE, R.J.; LEESE, H.J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 945–950, 1996.

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

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-112, 1994.

RAYOS, A.A.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with saccharose or trehalose. **J. Reprod. Fertil.**, v. 100, p. 123-129, 1994.

RAZEK, I.A.E.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C. Differences in lipid composition between in vivo- and *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 346, 2000.

RICHARDS, M.W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M.B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.62, p.300-306, 1986.

RIEGER, D. Relationship between energy metabolism and development of the early embryo. **Theriogenology**, v. 37, p. 75– 93, 1992.

RIEGER, D.; MCGROWAN, L.T.; COX, S.F.; PUGH, P.A.; THOMPSON, J.G. Effect of 2,4 dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by in vitro fertilization and culture. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 14, p. 339-343, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 236–243, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 61, p. 234–238, 2002.

RODRIGUES, C.A.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; TEIXEIRA, A.A.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção (abstract). **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 1256, 2007.

SATA, R.; TSUJI, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum free and serum-containing medium during early embryonic development. **J. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 97–103, 1999.

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

SEIDEL JUNIOR, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. In: SHORT COURSE PROCEEDINGS, 6., 1986, Fort Collins, Colorado. **Proceedings...** Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C.; JIANG, R.F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D.W.; SHI, Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, p. 333-347, 2000.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MACEDO, C.C.; ULIANI, R.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Effect of different concentration of fetal calf serum on production and quality of bovine embryo produced in vitro. In: 22° Anual meeting of brazilian society of embryo tecnology. **Acta Sci. Vet.**, v.36, p.495, 2008.

SZELL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 699-703, 1986.

THOMPSON, J.G. In vitro and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compactation and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 118, p. 47-55, 2000.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, p. 299–306, 1996.

THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 59-67, 2000.

THOMPSON, J.G.; SHERMAN, A.N.M.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Protein content, synthesis and uptake in pre-elongation stage bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 50, p. 139–145, 1998.

THOMPSON, J.G.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 253–257, 1992.

TODOROV, I.; BERNARD, A. G.; MCGRATH, J.J.; FULLER, B.J.; SHAW, R.W. Studies on 2,3 butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: use of saccharose to avoid damage during exposure or removal. **Cryo Lett.**, v. 14, p. 37-42, 1993.

VAJTA, G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter.**, v. 15, p. 12-18, 1997.

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

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Bovine embryo production in Brazil: A new scenario*. **Acta Sci. Vet.**, v. 35, p. 915-924, 2007.

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

WALES, R.G.; HUNTER, J. Participation of glucose in the synthesis of glycoproteins in preimplantation mouse embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 2, p. 35-50, 1990.

WHITTNGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryo frozen to -196°C and -269°C. **Science**, v. 178, p. 411-414, 1972.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LEMME, E.; KORSWE, K.; NIEMANN, H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 593-603, 2004.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of BCL-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 70, p. 159-169, 2002.