

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS E TEMPOS DE REFRIGERAÇÃO
SOBRE A VIABILIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

FERNANDA NUNES MARQUI

Botucatu – SP
Setembro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DE DIFERENTES MEIOS E TEMPOS DE REFRIGERAÇÃO
SOBRE A VIABILIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

FERNANDA NUNES MARQUI

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa.Dra. Eunice Oba

Coorientador: Prof. Dr. Alicio Martins Júnior

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Marqui, Fernanda Nunes.

Efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre a viabilidade e expressão gênica de embriões bovinos produzidos in vitro / Fernanda Nunes Marqui. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Alicio Martins Júnior

Capes: 50504002

1. Bovino. 2. Embrião - Criopreservação. 3. Expressão gênica. 4. Estudos de viabilidade.

Palavras-chave: Embrião; Gene; In vitro; Refrigeração; Viabilidade.

Nome da Autora: Fernanda Nunes Marqui

Título: EFEITO DE DIFERENTES MEIOS E TEMPOS DE REFRIGERAÇÃO
SOBRE A VIABILIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO*

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eunice Oba

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landin

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Dra. Yeda Fumie Watanabe

Membro

Vitrogen Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução S/S
Ltda.

Data da defesa: 30 de Setembro de 2015

Agradecimentos

O primeiro e principal agradecimento é a Deus pelo dom da vida e por me reerguer a cada desafio que passei nestes anos, por me amparar e fortalecer, me permitindo concluir, de forma tão prazerosa, esse sonho de ser Mestre.

Aos meus pais Romildo e Ernestina que são meus eternos exemplos de humildade, perseverança e fé. Agradeço por todas as orações e pelo infinito apoio, amor e companheirismo que sempre me fizeram seguir em frente, mesmo nas horas em que tudo parecia impossível.

À orientadora Professora Eunice Oba, pela oportunidade e orientação, por toda a receptividade e empenho, e por ser um exemplo de pessoa e profissional batalhadora.

Ao Professor Alicio Martins Júnior, que além de coorientador, é um amigo, um conselheiro, sempre se doando incansavelmente, nunca hesitou em passar horas no laboratório ao meu lado me ajudando, socorrendo e aconselhando. Agradeço por todas as oportunidades e por contribuir para a minha construção profissional e pessoal. E também à sua esposa Maria Silvia Joaquim Martins, por toda amizade e apoio.

Aos amigos Diego Gouvêa Souza e Fernando Franco Polizel por não medirem esforços e colaborarem de forma significativa na realização deste trabalho.

À minha família e amigos (Ana Carolina Feltrin Corrêa e Silva, Mayra Mariano Toseto e Tammy Cardoso Serizava Melles) por toda compreensão e incansável apoio.

À amiga Priscila Chediek pela amizade e companheirismo desde a época de faculdade até os dias de hoje.

À Professora Tereza Cristina Cardoso da Silva por contribuir expressivamente na realização das análises de expressão gênica e técnica de TUNEL.

À Magna Galvão, técnica do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, e ao auxiliar agropecuário Esaú Oliveira, por toda ajuda e paciência.

À Professora Fernanda da Cruz Landin e Yeda Fumie Watanabe por gentilmente aceitarem participar desta banca, contribuindo com a experiência que possuem para enriquecer este trabalho.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu - UNESP e à Pós-graduação pela oportunidade de realização deste trabalho e em especial aos funcionários da Pós-graduação por toda receptividade e prontidão.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, por permitir a realização de toda a parte experimental.

Aos proprietários e funcionários do frigorífico BrasFrigo, de Birigui – SP, por estarem sempre dispostos a contribuir e por abrirem as portas para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Capes e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo: 2013/15905-9) que possibilitou a elaboração dessa Dissertação.

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota".

(Theodore Roosevelt)

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores da média de blastocistos bovinos que apresentavam colapso de blastocele no momento em que foram submetidos à refrigeração (Pré), imediatamente após a refrigeração (Pós), às 6, 24 e 48h de cultivo em incubadora de CO₂, dos grupos refrigerados em Meio 199* e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas..... 66
- Tabela 2. Valores da média (\pm DP) de blastocistos bovinos viáveis às 0h, 6h e 48h de cultivo, em incubadora de CO₂, dos grupos controle* e refrigerados em Meio 199** e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas..... 67
- Tabela 3. Porcentagem de reexpansão e eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* dos grupos controle* e refrigerados em Meio 199** e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas..... 68
- Tabela 4. Número total de células e taxa de apoptose em embriões bovinos dos grupos controle e refrigerados em Meio 199 e BotuEmbryo[®] por 24 e 48 horas..... 69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1- Representação esquemática das alterações celulares durante a apoptose..... 14

FIGURA 2 – Representação esquemática do mecanismo da apoptose, desencadeado por via intrínseca e extrínseca..... 15

CAPÍTULO 2

Figura 1. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, antes (A, C) e após refrigeração por 24 (B) e 48 horas (D), em Meio 199 + 25 mM de HEPES + 50% de SFB. (40x)..... 60

Figura 2. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, antes (A, C) e após refrigeração por 24 (B) e 48 horas (D), em meio BotuEmbryo[®]. (40x)..... 61

Figura 3. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, após cultivo por 6, 24 e 48 horas, refrigerados por 24 horas em Meio 199 (A, B e C) e em meio comercial BotuEmbryo[®] (D, E e F), respectivamente. (40x)..... 62

Figura 4. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, após cultivo por 6, 24 e 48 horas, refrigerados por 48 horas em Meio 199 (A, B e C) e em meio comercial BotuEmbryo[®] (D, E e F), respectivamente. (40x)..... 62

Figura 5. Embriões bovinos produzidos *in vitro* (A), cultivados em meio SOFaa por 6 (B), 24 (C) e 48 (D) horas, a 38,8 °C, em incubadora a 5% de CO₂ em ar (grupo controle)..... 63

Figura 6. Blastocistos bovinos avaliados pela técnica de TUNEL. Os núcleos corados em verde (FITC) indicam fragmentação de DNA em células apoptóticas. Os núcleos corados em azul (Hoechst) representam o número total de células. **A** e **A'**: Grupo controle; **B** e **B'**: grupo refrigerado em Meio 199 por 24 horas; **C** e **C'**: grupo refrigerado em Meio 199 por 48 horas; **D** e **D'**: grupo refrigerado em meio BotuEmbryo[®] por 24 horas; **E** e **E'**: grupo refrigerado em meio BotuEmbryo[®] por 48 horas..... 64

Figura 7. Abundância relativa de transcritos em blastocistos bovinos não submetidos à refrigeração (controle) e refrigerados em Meio 199 (A) e em meio BotuEmbryo[®] (B), por 24 e 48 horas..... 65

LISTA DE ABREVIATÖES E SIGLAS

- BSA – Albumina sérica bovina
- CIV – Cultivo *in vitro*
- CO₂ – Dióxido de carbono
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
- FITC – “Fluorescein isothiocyanate”
- FIV – Fertilização *in vitro*
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GLUT – “Glucose transporter”
- HSP – “Heat shock protein”
- mg – Miligrama
- MIV – Maturação *in vitro*
- mL – Mililitro
- mM – Milimolar
- mRNA – RNA mensageiro
- ng – Nanograma
- PBS – “Phosphate buffer saline”
- PIV – Produção *in vitro*
- PRDX – “Peroxirredoxin”
- PVA – Álcool polivinílico
- qPCR – “Quantitative Polymerase Chain Reaction”
- rTdT – “Recombinant Terminal Deoxynucleotidyl”
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SLC – “Solute carrier”
- SOD – “Superoxide dismutase”
- SOFaa – “Sintetic Oviduct Fluid Amino Acids”
- TALP – “Tyrodes Albumin, Lactate, Pyruvate”
- TCM – “Tissue Culture Medium”
- TE – Transferência de embrião
- TUNEL – “Terminal Deoxynucleotide Transferase Uridine Nick-end Labeling”
- UI – Unidades Internacionais

μL – Microlitro

v/v – Volume por volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1-.....	01
INTRODUÇÃO.....	02
OBJETIVOS.....	05
REVISÃO DE LITERATURA.....	06
1 Refrigeração de Embriões.....	06
2 Avaliação da Viabilidade Celular Embrionária.....	13
3 Expressão Gênica.....	17
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2 – ARTIGO.....	32
Efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre a viabilidade e expressão gênica de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	33
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	37
Resultados.....	43
Discussão.....	45
Referências.....	55
CAPÍTULO 3.....	70
CONCLUSÕES GERAIS.....	71
ANEXOS.....	73

MARQUI, F.N. **Efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre a viabilidade e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Botucatu, 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre o desenvolvimento e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, blastocistos D7 foram divididos em três grupos: controle, embriões mantidos em meio SOFaa, em incubadora de CO₂, por 6 e 48h; refrigerados, embriões mantidos a 5 °C, em Meio 199, por 24 (M199-24h) e 48h (M199-48h) ou em meio BotuEmbryo[®], por 24 (BE-24h) e 48h (BE-48h). Após a refrigeração, os embriões foram cultivados sob as mesmas condições do grupo controle para avaliação da viabilidade embrionária às 6 e 48h, e das taxas de reexpansão e eclosão, às 24 e 48h, respectivamente. Às 6h de cultivo parte dos embriões foi retirada e armazenada para posterior análise de qPCR e TUNEL. Menor porcentagem (P<0,05) de blastocistos viáveis, às 6 e 48h, foi observada no grupo M199-48 em relação ao grupo controle. A taxa de reexpansão não diferiu entre os embriões refrigerados e o grupo controle, porém, menor (P<0,05) taxa de eclosão foi observada nos grupos M199-48h e BE-48h do que no grupo controle. Maior (P<0,05) porcentagem de células apoptóticas foi observada no grupo BE-48h do que nos grupos controle e BE-24h. Os meios e tempos utilizados não alteraram a expressão dos genes HSPA1A, PRDX1, SOD1 e SLC2A1. Portanto, de modo geral, o meio e o tempo de refrigeração não promoveram efeito potencial adverso sobre a viabilidade embrionária, taxa de reexpansão e eclosão, número de células apoptóticas e expressão gênica, sugerindo o emprego do meio BotuEmbryo[®], o qual é disponível comercialmente.

Palavras-chave: embrião, refrigeração, viabilidade, gene.

MARQUI, F.N. **Effects of different media and cooling times on viability and gene expression of in vitro-derived bovine embryos.** Botucatu, 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of different media and cooling times on the development and gene expression of in vitro-derived bovine embryos. Therefore, blastocysts D7 were divided into three groups: control, embryos kept in SOFaa medium, under CO₂ incubation, for 6, 24 and 48 hours; cooled embryos, kept in Medium 199, for 24 (M199-24h) and 48 hours (M199-48h) or in BotuEmbryo® medium, for 24 (BE-24h) and 48 hours (M199-48h). After cooling, the embryos were cultured under the same conditions used for the control group for evaluation of embryo viability at 6 and 48 hours, and of re-expansion and hatching rates, at 24 and 48 hours, respectively. At 6h of culture part of the embryos was removed and stored for later analysis of qPCR and TUNEL. Low percentage ($P<0.05$) of viable blastocysts, at 6 and 48 hours, was observed in group M199-48h than for control group. Re-expansion rate did not differ between cooled embryos and control group, however, lower ($P<0.05$) hatching rate was observed in M199-48h and BE-48h groups than for control group. Higher ($P<0.05$) percentage of apoptotic cells was found in BE-48h compared with control and BE-24h groups. Media and cooling times used did not alter the expression of genes HSPA1A, PRDX1, SOD1 and SLC2A1. Thus, overall, medium and cooling time did not promoted potential adverse effect on the embryonic viability, re-expansion and hatching rate, number of apoptotic cells and gene expression, suggesting the use of BotuEmbryo® medium, which is commercially available.

Key-words: embryo, cooling, viability, gene.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Desde o primeiro relato de sucesso na transferência de embrião bovino produzido *in vivo* (WILLETT *et al.*, 1951), as técnicas de reprodução assistida (TRAs) têm sido intensivamente utilizadas como instrumento para acelerar os programas de seleção animal. Inicialmente uma das grandes barreiras para a aplicação e expansão da transferência embrionária era a ausência de técnicas que permitissem a manutenção do embrião fora do ambiente uterino. Desde o final da década de 1940, estudos demonstravam a viabilidade de se empregar a refrigeração como forma de preservação e armazenamento de embriões mamíferos (CHANG, 1947), porém somente em 1970 Sreenan *et al.* (1970) obtiveram sucesso na refrigeração de embriões bovinos.

Com o início dos programas de transferência de embriões a nível comercial, o aumento de estruturas excedentes e o interesse em preservação de material genético por longos períodos de tempo, levaram ao desenvolvimento de um protocolo de congelação de embriões bovinos (WILMUT e ROWSON, 1973). A evolução das técnicas de congelação e, posteriormente, vitrificação de embriões nesta espécie (MASSIP *et al.*, 1987) proporcionou uma série de vantagens na preservação e comercialização de embriões, inclusive após o advento da produção *in vitro* (PIV) de embriões na espécie (BRACKET *et al.*, 1982), os quais apresentam elevada sensibilidade ao processo de congelação/aquecimento.

Os avanços na produção de embriões bovinos foram crescentes, chegando a uma produção mundial de 1.143.119 embriões no ano de 2012, sendo a PIV responsável por 443.533 dos embriões disponíveis para transferência (IETS, 2012). Neste mesmo ano, a produção brasileira representou 35% do total de embriões produzidos no mundo (400.094) e 78,7% (349.171) dos embriões produzidos *in vitro*.

Apesar da crescente expansão na produção *in vitro* de embriões, a taxa de prenhez de embriões transferidos à fresco raramente ultrapassa 50%, sendo ainda inferior quando embriões criopreservados são transferidos. Os resultados modestos e inconsistentes obtidos com a transferência de embriões criopreservados limitam a maior difusão da técnica. De acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), no ano de 2012, 55,6% dos embriões PIV foram transferidos à fresco (348.238) e apenas 8% após

criopreservação (36.761). As diferenças morfológicas, de coloração, densidade, número total de células, bem como as alterações metabólicas e na expressão de importantes genes, observadas entre embriões obtidos *in vivo* e *in vitro* podem explicar a maior sensibilidade destes ao processo de criopreservação.

Embora diversas pesquisas sejam direcionadas na tentativa de superar os obstáculos oriundos da criopreservação, a refrigeração embriões bovinos, que até a década de 1980 era tida com uma técnica pouco eficaz de armazenamento por período de tempo superior a 48 horas (BONDURANT *et al.*, 1982; LEIBO e WINNINGER, 1986), tem surgido recentemente com resultados encorajadores como alternativa à criopreservação (IDETA *et al.*, 2013; IDETA *et al.*, 2015). Da mesma forma, a refrigeração de sêmen de touros (CRESPILHO *et al.* 2012; PAPA *et al.*, 2015) tem se mostrado alternativa, como forma de se disponibilizar um maior número de doses por ejaculado, sem as crioinjúrias da congelação.

A partir dos primeiros relatos de sucesso na refrigeração de sêmen e embrião bovino nas décadas de 1940 (FOOTE e BRATTON, 1949) e 1970 (SREENAN *et al.*, 1970), respectivamente, poucos relatos na literatura são encontrados, pois com o advento da criopreservação, o uso de sêmen e embrião refrigerados foi gradualmente substituído pela congelação e/ou vitrificação.

Contudo, nas espécies equina (NUNES *et al.*, 2006) e suína (GROBFELD *et al.*, 2008), devido à alta sensibilidade do espermatozoide aos danos provocados durante a criopreservação e descongelação, a refrigeração tem sido utilizada de forma eficaz e rotineira nos sistemas de produção.

A principal vantagem da utilização da refrigeração, como método de preservação hipotérmica, é permitir que o espermatozoide e o embrião sejam mantidos em um estado de baixa atividade sem, no entanto, provocar as injúrias características da criopreservação, bem como otimizar a utilização de receptoras não sincronizadas no momento da transferência e o transporte de embriões por período de tempo maior do que quando mantidos à temperatura ambiente. Trata-se de uma técnica simples, barata e que não requer equipamentos especiais sendo, portanto, de fácil aplicação em condições de campo, permitindo o aproveitamento de embriões excedentes até que receptoras sejam disponibilizadas.

Em bovinos, a refrigeração de embriões obtidos *in vivo* demonstrou ser uma técnica eficaz de armazenamento, uma vez que 57,5 a 90% dos embriões

encontravam-se viáveis após 7-10 dias de refrigeração a 4-5 °C, com taxas de gestação semelhante àquela obtida com embriões transferidos à fresco (IDETA *et al.*, 2013; IDETA *et al.*, 2015).

A capacidade de desenvolvimento embrionário pós-refrigeração/criopreservação está diretamente relacionada à qualidade morfológica do embrião, sendo este critério utilizado para subjetivamente prever a viabilidade e o estabelecimento da prenhez após a transferência. Entretanto, a competência embrionária pode estar severamente comprometida sem que haja alterações morfológicas visíveis (ALIKANI *et al.*, 2000).

Sendo assim, a aplicação de técnicas mais fidedignas de avaliação da qualidade dos embriões têm se tornado essencial, à medida que a pressão por produção de animais geneticamente superiores tem aumentado. Neste contexto, técnicas que identificam a presença de genes associados à competência embrionária (PCR, reação em cadeia de polimerase e transcrição reversa-PCR, RT-PCR), bem como a utilização de colorações que identificam alterações características de apoptose nas células embrionárias (TUNEL) têm sido empregadas.

Em decorrência do exposto, ou seja, nas limitadas informações disponíveis em relação à refrigeração de embriões bovinos e, na falta de estudos envolvendo a determinação da expressão de genes em embriões refrigerados, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre a viabilidade embrionária pós-refrigeração, bem como a expressão gênica destes embriões, na expectativa de contribuir efetivamente com a expansão da transferência de embriões refrigerados, ao se promover maior período de tempo para sua utilização sem necessidade de criopreservação.

OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos de diferentes meios (Meio 199 e BotuEmbryo[®]) e tempos de refrigeração (24 e 48h) sobre o desenvolvimento e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a influência do Meio 199 + 25 mM de HEPES + 50% de SFB, bem como de diferentes tempos de refrigeração (24 e 48 horas), a 5 °C, sobre a viabilidade embrionária, taxas de reexpansão e eclosão, número total de células, ocorrência de apoptose e expressão gênica (genes SOD1, PRDX1, HSPA1A e SLC2A1) de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. Verificar a influência do meio BotuEmbryo[®], bem como de diferentes tempos de refrigeração (24 e 48 horas), a 5 °C, sobre a viabilidade embrionária, taxas de reexpansão e eclosão, número total de células, ocorrência de apoptose e expressão gênica (genes SOD1, PRDX1, HSPA1A e SLC2A1) de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

HIPÓTESE

A hipótese levantada é de que a refrigeração dos embriões a 5 °C, por 24 ou 48 horas, em diferentes meios não irá afetar a viabilidade embrionária, mas diferenciará a expressão gênica.

REVISÃO DE LITERATURA

1 Refrigeração de Embriões

A refrigeração surge como uma alternativa de preservação de embriões, produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, que por reduzir consideravelmente o metabolismo embrionário (BONDURANT *et al.*, 1982), permite a manutenção dos mesmos por até 10 dias, à temperatura de 4 °C, com elevada viabilidade no momento da transferência (IDETA *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços nos programas de TE e de PIV, a variabilidade de resposta superovulatória à aplicação de FSH exógena, aliada a falta de receptoras sincronizadas para receber embriões, no dia 7 após o estro, têm limitado o uso de embriões à fresco e pressionado o uso de métodos de preservação, principalmente criopreservação em nitrogênio líquido.

A criopreservação otimiza a utilização de embriões excedentes, porém, não é uma técnica apropriada de armazenamento por curtos períodos de tempo, pois inevitavelmente causa crioinjúrias às células embrionárias (IDETA *et al.*, 2013) e, conseqüentemente, reduz de forma significativa as taxas de gestação.

Segundo Ideta *et al.* (2013), os danos causados ao embrião, pelos métodos de criopreservação empregados rotineiramente, aliados ao controle rigoroso realizado pela Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA), quanto ao transporte de nitrogênio líquido, tornam relevante o desenvolvimento e aplicação de métodos de preservação embrionária através de refrigeração.

Os primeiros relatos de refrigeração de embriões ocorreram na década de 1940. Assim Chang (1947) demonstrou que embriões de coelho, no estágio de duas células, armazenados em soro de coelho a 10 °C, por 144 horas, continuaram o desenvolvimento normal após cultivo a 37 °C. Em 1948, o mesmo autor, trabalhou com embriões de coelho com duas células, refrigerados em soro de coelho, e obteve de 24 a 28% de embriões viáveis após refrigeração a 0-15 °C, por 2 a 4 dias.

Mesmo após seis décadas do primeiro relato de refrigeração embrionária, poucos trabalhos a respeito da aplicação da técnica em embriões bovinos têm sido relatados. Tais estudos focaram, principalmente, no desenvolvimento de

sistemas (meios, temperaturas e períodos de tempo) de refrigeração ideais para manter a viabilidade dos embriões produzidos *in vivo* (BONDURANT *et al.*, 1981; BONDURANT *et al.*, 1982; LINDNER *et al.*, 1983; LINDNER e ELLIS, 1985; LEIBO e WINNINGER, 1986; POOL *et al.*, 1986; PINTO NETO *et al.*, 1999) e *in vitro* (YANG *et al.*, 1991; SCHNEIDER *et al.*, 1998).

Com resultados promissores na técnica de congelação de embrião de ratos (WHITTINGHAM *et al.*, 1972; WILMUT, 1972) e coelhos (BANK e MAURER, 1974; WHITTINGHAM e ADAMS, 1974), porém não tão satisfatórios para animais de produção, Wilmut *et al.* (1975) compararam a sobrevivência de embriões bovinos em estágio de mórula inicial (8-16 células) e mórulas produzidas *in vivo*, mantidas em temperatura ambiente (~20 °C) e refrigeradas a 0 °C, em meio PBS, por 15 minutos, após transferência para ovidutos de coelhas em estro. Notaram diferente sensibilidade pós-refrigeração de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário, sendo que somente 1/19 mórulas iniciais se desenvolveu para blastocisto, enquanto 7/9 mórulas chegaram a esse estágio; observaram que os blastocistos provenientes de embriões refrigerados apresentaram maior número de células com núcleo picnótico, evidenciando os efeitos da refrigeração sobre a viabilidade embrionária.

Na tentativa de aperfeiçoar a técnica de refrigeração, BonDurant *et al.* (1981) avaliaram a técnica de transferência e local de deposição de embriões bovinos produzidos *in vivo* coletados 7-8 dias após o estro, após refrigeração a 4 °C, por 48 horas, em meio PBS com 10% de SFB. Os autores observaram taxa de gestação semelhante à de embriões criopreservados a -196 °C, não diferindo entre a transferência cirúrgica e não cirúrgica, e melhores resultados foram obtidos quando um único embrião foi inovulado no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo.

Contudo, em 1982, os mesmos autores encontraram influência do método de transferência, com resultados superiores quando utilizada a técnica cirúrgica, sugerindo que, o embrião já prejudicado pelo procedimento de refrigeração e depositado em local inadequado, explicaria a baixa taxa de gestação de embriões transferidos não cirurgicamente. Observaram ainda, influência raça da doadora, com melhores taxas de sobrevivência à refrigeração para embriões oriundos de animais da raça Hereford do que Angus (BONDURANT *et al.*, 1982).

Lindner *et al.* (1983) avaliaram o efeito da idade do embrião de TE sobre a sobrevivência pós-refrigeração. Para tanto, utilizaram embriões coletados cirurgicamente nos dias 2 e 4, e através de lavagem uterina nos dias 6 e 8 após o estro, seguido de refrigeração a 4 °C, em DPBS, suplementado com 10% de SFB, 5 mM de lactato e 0,25 mM de piruvato de sódio, por 48 horas. Observaram maior taxa de sobrevivência de blastocistos D8, a qual foi semelhante entre os grupos refrigerado (8/13) e controle (11/13); embriões D6 e D8 apresentavam-se morfológicamente normais após 48 horas de refrigeração, o que não foi observado para embriões D2 e D4, os quais, em sua maioria, mostraram-se severamente danificados à análise morfológica. Tais resultados demonstraram que, aparentemente, a susceptibilidade aos danos causados pela refrigeração diminui com o aumento da idade e número de células embrionárias.

Neste estudo, avaliaram, também, a viabilidade de blastocistos bovinos à refrigeração por até 5 dias, bem como o efeito da concentração de SFB no meio de refrigeração (10 e 25%). A sobrevivência embrionária não foi afetada quando mantidos, a 4 °C, por 1 dia, com porcentagem de nascimentos semelhante a de embriões transferidos imediatamente após a colheita e aos criopreservados, contudo, de 2 a 5 dias de armazenamento, embora os embriões tenham continuado o desenvolvimento após refrigeração, as taxas de gestação foram muito baixas. O aumento na concentração de soro de 10 para 25% não aumentou a sobrevivência após 3 dias de refrigeração a 4 °C (LINDNER *et al.*, 1983).

Lindner e Ellis (1985) conseguiram manter embriões obtidos de TE, no D8, refrigerados a 4 °C, por 36 horas, em meio contendo apenas DPBS acrescido de 10% de SFB, sem perda significativa na viabilidade, sugerindo que a técnica pode ser utilizada para armazenar embriões em estado de baixa atividade metabólica quando as receptoras exibirem estro após a doadora, ou seja, aguardando o dia adequado para a transferência.

Leibo e Winninger (1986) afirmaram que a diminuição da viabilidade embrionária poderia ser prevenida através da refrigeração a 0 °C. Para tanto, embriões de TE, em diferentes estágios de desenvolvimento, foram mantidos em meio DPBS com 10% de SFB, por 12 a 24 horas. A taxa de gestação para os embriões refrigerados, classificados de qualidade boa a excelente, foi de 61,8% e para os de qualidade inferior 44,9%, não havendo diferença significativa entre os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário. Segundo os autores, a

refrigeração de embriões a 0 °C pode ser utilizada na rotina de transporte dos mesmos a longas distâncias, por até 24 horas. A mesma temperatura foi testada por Trounson *et al.* (1976a), que ao refrigerar por 2 minutos embriões colhidos no D6, e por 30 minutos, por 24 ou 48 horas os embriões colhidos no D7, em meio PBS + 20% de SFB, observaram maior porcentagem de embriões viáveis, em cultivo pós-refrigeração, nos grupos D7 refrigerado por 30 minutos (92%) e 24 horas (67%); os grupos D6 e D7 refrigerado por 48 horas, não diferiram entre si quanto à capacidade de desenvolvimento (50 e 48%, respectivamente).

A sobrevivência e desenvolvimento de embriões bovinos obtidos *in vivo* nos dias 5 e 6, após o estro, foram avaliados por Trounson *et al.* (1976b) sob refrigeração, em PBS e PBS + 20% de SFB, nas temperaturas de 0 °C, 2 °C, 5 °C e 7,5 °C, por 2 minutos, 30 minutos ou 24 horas. Ao término do período de refrigeração, os embriões foram transferidos para ovidutos de coelhas por 48 horas. Quando o armazenamento ocorreu por 24 horas, observaram efeito benéfico do aumento da temperatura sobre a porcentagem de embriões normais (4,8%, 16,7% e 36,7% para 2°C, 5°C e 7,5 °C, respectivamente); o meio de armazenamento, o tempo e a temperatura de refrigeração tiveram pouco efeito sobre a qualidade embrionária, mas observaram, também, que a refrigeração mais lenta melhora as taxas de sobrevivência embrionária, embora não tenham constatado diferença estatística.

Yang *et al.* (1991) avaliaram o efeito da temperatura e tempo de armazenamento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mantendo embriões D7 e D8 em meio PBS + 15% de SBF a 39 °C, 20 °C ou 4 °C, por 4-6, 24 ou 48 horas. Quando refrigerados a 4 °C, por 4-6 horas, a taxa de eclosão embrionária, após 96 horas de cultivo, foi de 71,2%, e diminuiu à medida que os embriões permaneceram refrigerados por 24 (57,1%) e 48 horas (27%).

Schneider *et al.* (1998), testaram diferentes meios para armazenamento de embriões PIV. Embriões de 7,5 dias foram armazenados em meio PBS + 0,4% de BSA, TCM 199 + 0,4% de BSA ou TCM 199 + 10% de soro de vaca em estro, a 20 °C, por 10 horas. A taxa de eclosão, às 72 horas de cultivo, não diferiu entre os grupos PBS e TCM 199 acrescidos de 0,4% BSA e, entre estes e o grupo controle, demonstrando que embriões produzidos *in vitro* podem ser eficazmente armazenados por 10 horas, a 20 °C, nos meios PBS e TCM 199 suplementados com BSA.

A temperatura de 5 °C foi testada por Pinto Neto *et al.* (1999) para refrigerar embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e eclodido) em meio PBS + 20% de SFB, por 24 horas, obtidos através da técnica de TE em vacas da raça Nelore. Taxas de gestação de 37,9% e 55,6% foram obtidas após transferência de embrião para receptoras previamente sincronizadas com progestágeno ou prostaglandina, respectivamente.

Investigações buscando estabelecer qual a meio de refrigeração fornece as condições ideais para o transporte de embriões têm sido realizadas. Mori *et al.* (2006) adicionaram 0, 25, 50 ou 100 µg/mL de β-mercaptoetanol (β-ME), de cicloheximida (CHX) ou 25 µg/mL de CHX + 50 µg/mL de β-ME, ao meio TCM 199 com 25 mM de HEPES, acrescido de 5% de SBF. Blastocistos D7 e D8, produzidos *in vitro*, foram armazenados nos diferentes meios a 4 °C por 72 horas. Observaram efeito benéfico da suplementação do meio de refrigeração com CHX para a sobrevivência embrionária e número de células com DNA intacto, quando comparado com β-ME, sozinho ou em combinação com CHX. Concluíram que, mais estudos são necessários para melhorar a viabilidade e qualidade de embriões armazenados sob hipotermia.

Mais recentemente Ideta *et al.* (2013) realizaram um amplo estudo com diferentes meios a fim de avaliar a eficiência dos mesmos para aumentar a vida útil de embriões sob condições hipotérmicas. Para determinar a melhor concentração de SFB no meio, refrigeraram blastocistos PIV em PBS + 0, 5, 20, 50 ou 100% de SFB, a 4 °C, por 72 horas. Maior viabilidade e taxa de eclosão, após 72 horas de cultivo pós-refrigeração, foram observadas em PBS + 50% de SFB (60% e 35%, respectivamente). Em seguida, avaliaram o meio base, comparando PBS + 50% de SFB, Meio 199 + 50% de SFB e L15 + 50% de SFB, sendo que Meio 199 foi o mais adequado para a refrigeração (90% de embriões viáveis vs. 60% e 50% para PBS e L15, respectivamente). O efeito do componente tampão (HEPES) foi testada para diferentes concentrações (0; 12,5; 25; 50 e 100 mM) em meio Meio 199 + 50% de SFB, a partir de embriões de TE armazenados por 168 horas. Os melhores resultados numéricos para viabilidade foram obtidos com 25 e 50 mM (69% e 73%), porém não houve diferença significativa entre os grupos. Outros agentes tampão, como TES, PIPES, MOPS

e EPPS, na concentração de 25 mM, foram avaliados, com resultados inferiores aos obtidos com HEPES (69% de embriões viáveis).

Segundo os autores, a elevada concentração de soro fetal bovino (50%), adicionado ao meio de refrigeração, aumenta a viabilidade embrionária após o armazenamento, sem, no entanto, provocar as alterações associadas à adição de SFB ao meio de cultivo (IDETA *et al.*, 2013).

A adição de proteínas, como a AFP (“Antifreeze Protein”), com habilidade de proteger o embrião e suas membranas dos danos causados pela exposição hipotérmica, tem sido investigada na tentativa de sobrepujar a limitação dos meios de refrigeração utilizados atualmente, os quais têm propiciado um armazenamento viável a 4°C por apenas 24-48 horas. Desta forma, Ideta *et al.* (2015), utilizando Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES, 20% de SFB e 10 mg/mL de AFP11, obtiveram resultados bastante promissores para a preservação de embriões bovinos, a 4 °C, por até 10 dias, visto que 57,5% dos embriões permaneceram viáveis, com taxa de prenhez de 50%, embora apenas 4 embriões foram transferidos.

As formas de se proceder a refrigeração são bastante variáveis entre os autores, desde armazenar os embriões em tubos estéreis de 2 mL (BONDURANT *et al.*, 1982; LINDNER *et al.*, 1983; LINDNER E ELLIS, 1985), de 15 mL (PINTO NETO *et al.*; 1999) ou palhetas de 0,25 mL (LEIBO E WINNINGER, 1986; SCHNEIDER *et al.*, 1998; OTOI *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 2006; IDETA *et al.*, 2013); colocando os recipientes em água à temperatura ambiente (BONDURANT *et al.*, 1982; LINDNER *et al.*, 1983; LINDNER E ELLIS, 1985), diretamente no gelo (TROUNSON *et al.*, 1976a; LEIBO E WINNINGER, 1986) ou no metanol a 4 °C (OTOI *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 2006); e mantidos em refrigerador (BONDURANT *et al.*, 1982; LINDNER *et al.*, 1983; LINDNER E ELLIS, 1985; OTOI *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 2006; IDETA *et al.*, 2013), garrafa térmica (LEIBO E WINNINGER, 1986) ou container de transporte (PINTO NETO *et al.*, 1999).

Uma alteração morfológica comumente observada (88,89%) (PINTO NETO *et al.* 1999) no embrião refrigerado é o colapso de blastocele, o qual pode ocorrer devido à queda no metabolismo com a parada de transporte ativo (BONDURANT *et al.*, 1982), responsável por manter a blastocele. Segundo Lindner *et al.* (1983), tende a ocorrer quando os embriões são armazenados por 2 ou mais dias e não há diferença no desenvolvimento *in vitro* e após a transferência entre blastocistos

com blastocite colapsada ou não, já que este estado é facilmente revertido (reexpansão) após curto período de cultivo (8-12 horas) (BONDURANT *et al.*, 1982).

Na espécie equina, a técnica tem sido utilizada rotineiramente, embora exista uma maior tolerância para a transferência do embrião para a receptora (+1 a -5 dias), enquanto que na espécie bovina a variabilidade é de apenas ± 1 dia.

Diversos estudos demonstram a viabilidade de se adotar a técnica de refrigeração nesta espécie, utilizando diversos meios comerciais, como Ham's F-10, EmCareTM e VigroTM, à temperatura de 5 °C, por 6, 12 e 24 horas, com taxas de gestação semelhantes à transferência de embrião à fresco (CLARK *et al.*, 1987; MOUSSA *et al.*, 2002; MOUSSA *et al.*, 2003; MOUSSA *et al.*, 2004).

A refrigeração prévia à vitrificação, e somente vitrificação, foram testadas por Hudson *et al.* (2006), na espécie equina, a fim de avaliar as taxas de gestação. Embriões D6,5 e D8 foram coletados de éguas superovuladas com eFHS, refrigerados em meio Vigro[®], à temperatura de 5 a 8 °C, por 12 a 19 horas e, em seguida vitrificados. Não houve diferença significativa para taxa de gestação entre os grupos refrigeração/vitrificação (65%) e vitrificação (75%). Os resultados deste estudo permitiram concluir que a refrigeração fornece a flexibilidade de transferir o embrião refrigerado à receptora ou, caso esta não esteja apta, vitrificá-lo, sem afetar a taxa de prenhez.

Em ovinos, a refrigeração se mostrou viável para embriões armazenados em soro de ovelha à temperatura de 5 a 8 °C, por 6 a 9 horas, com 75% de gestação; quando armazenados por 24 horas a taxa caiu para 46,6%, não resultando em nenhuma gestação quando refrigerados por 48 e 72 horas. Quando o soro de ovelha foi substituído por solução de Ringer, nenhum dos embriões refrigerados resultou em gestação (AVERILL e ROWSON, 1959).

Harper e Rowson (1963) testaram a refrigeração a 7 °C em embriões ovinos de 2 a 8 células, por 72, 96 e 120 horas em soro de ovelha. Nessas condições, a refrigeração não se mostrou uma eficiente técnica para preservação de embriões ovinos, visto que nenhuma das estruturas transferidas resultou em gestação.

A adição de componentes ao meio base foi também testada na refrigeração em ovinos. Baguisi *et al.* (1997) observaram que a viabilidade de mórulas e blastocistos não foi afetada após refrigeração a 0 e 4 °C, por 4 dias, em meio PBS acrescido de 4 mg/mL de BSA, 1 ou 10 mg/mL de proteínas anticongelantes

derivadas de peixe. Segundo os autores, é possível armazenar embriões ovinos a 4 °C por 4 dias e obter razoáveis taxas de prenhez.

2 Avaliação da Viabilidade Celular Embrionária

A verificação de apoptose em células embrionárias tem sido uma ferramenta bastante utilizada para a avaliação da qualidade dos embriões, principalmente por indicar uma resposta celular às condições de desenvolvimento sub-ótimas para o desenvolvimento e de estresse (BETTS e KING, 2001), bem como de eliminação de células com acúmulo de material genético danificado (METCALFE *et al.*, 1999).

Apesar de associada negativamente à viabilidade do embrião, a apoptose ou morte celular programada (MCP) é um processo fisiológico ativo com importante papel no controle do desenvolvimento embrionário, uma vez que através desse mecanismo são eliminadas células anormais, danificadas e não funcionais (BETTS e MADDAN, 2008), prevenindo que uma célula-mãe danificada produza células alteradas no embrião (PAULA-LOPES E HANSEN, 2002).

Quando desencadeado o processo apoptótico, alterações celulares (Figura 1), como a condensação citoplasmática e migração de cromatina, redução do volume celular, perda de aderência com a matriz extracelular e células adjacentes, fragmentação de DNA e formação dos corpos apoptóticos são observadas (FABIAN *et al.*, 2005). Blastômeros com aspecto característico de apoptose, como fragmentação nuclear e citoplasmática, são observados tanto em embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro* (KAMJOO *et al.*, 2002)

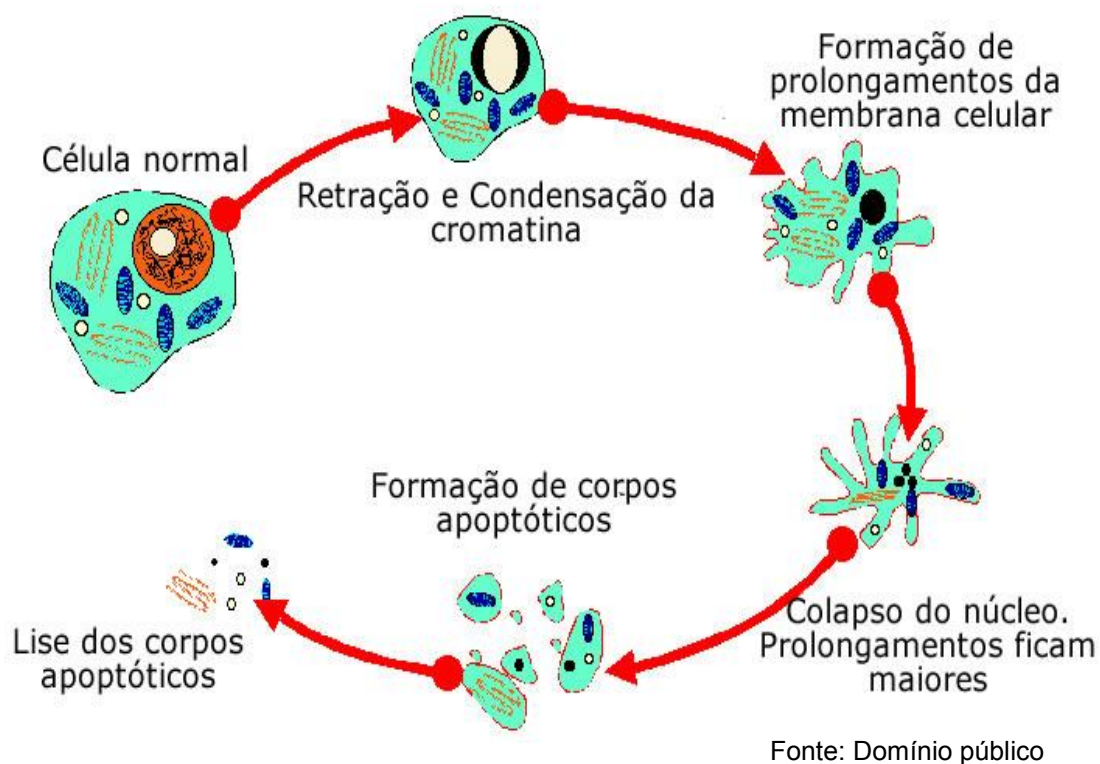
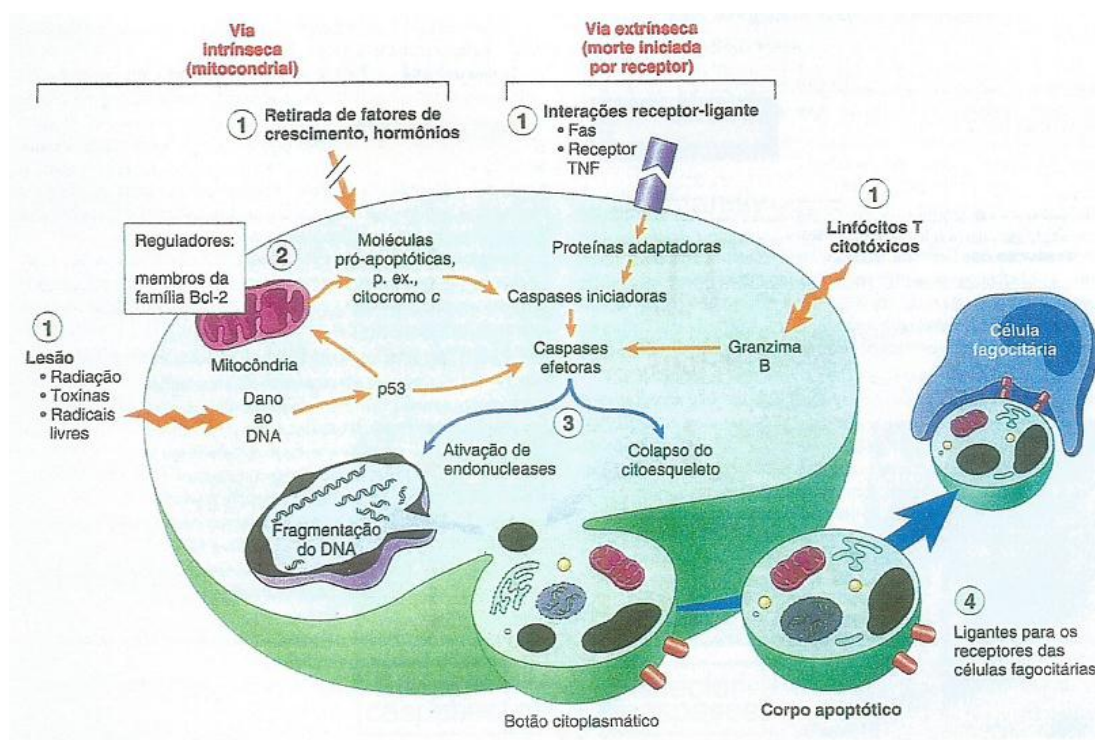


FIGURA 1- Representação esquemática das alterações celulares durante a apoptose.

A indução da apoptose pode ocorrer por via intrínseca ou extrínseca. A indução por via intrínseca ocorre por estímulos internos de estresse intracelular, como lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas, e observa-se a participação mitocondrial e formação do apoptossoma. Os sinais intracelulares pró-apoptóticos induzem a liberação de citocromo *c* (Cyt *c*), pela mitocôndria. A via extrínseca é desencadeada quando ligantes específicos se unem a receptores de membrana TNF (fator de necrose tumoral). As duas vias culminam com a ativação das caspases, que possuem papel fundamental no processo de morte celular (Figura 2).

As caspases, presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas (HENGARTNER, 2000), são caracterizadas como iniciadoras ou efetoras da cascata das caspases (TORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). As iniciadoras (caspase-2, 8, 9 e 10) clivam as caspases efetoras inativas, ativando-as. As caspases efetoras (caspase-3, 6 e 7) desencadeiam o mecanismo de apoptose, clivando substratos essenciais para a função e estrutura da célula, ocasionando mudanças morfológicas e morte celular (KAPLOWITZ, 2000).



Fonte: KUMAR et al., 2008.

FIGURA 2 – Representação esquemática do mecanismo da apoptose, desencadeado por via intrínseca e extrínseca.

A ocorrência de apoptose em oócitos e embriões bovinos, avaliada pelo índice de fragmentação de DNA, é observada em menor número em embriões com 8-16 células (5%), seguida dos oócitos imaturos (7%) e maduros (23%), mórula e blastocisto inicial (79%), e em todos os blastocistos expandidos/eclodidos, enquanto células com características apoptóticas não foram observadas em zigotos, embriões de duas e 3 - 7 células (MATWEE *et al.*, 2000). Segundo Antunes *et al.* (2010), a baixa ocorrência de apoptose em embriões no estágio de até 8 células pode ser explicada pela inativação do genoma embrionário nesta fase, ou ainda devido ao fato de os blastômeros, em estágios iniciais, possuírem maior resistência à apoptose do que a massa celular interna e o trofoblasto (WEIL *et al.*, 1996).

Alguns estudos têm relacionado a presença de alguns sinais de apoptose em complexos cumulus-oócitos bovinos, como granulações no citoplasma, com maior potencial de desenvolvimento (BILODEAU-GOESEELS e PANICH, 2002).

Além disso, a ocorrência de morte celular por apoptose é considerada uma característica normal no desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, visto que 93% dos embriões avaliados apresentam ao menos uma célula com núcleo apoptótico, sendo a maior proporção observada na massa celular interna do que no trofoectoderma (NEUBER *et al.* 2002).

As possíveis causas de indução da morte celular programada em embriões, no período pré-implantação, são anormalidades nucleares e citoplasmáticas (LEVY, 2001), alterações no potencial de desenvolvimento (HANDYSIDE e HUNTER, 1986), desequilíbrio nos fatores de crescimento (IGFI-II, TGF- α , PAF) e hormônios (FABIAN *et al.*, 2005) e exposição a fatores como EROS (YANG *et al.*, 1998), irradiação ultravioleta (HERRLER *et al.*, 1998) e choque térmico (PAULA-LOPES e HANSEN, 2002).

A técnica de TUNEL (“Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling”) é a mais frequentemente utilizada para detectar células apoptóticas, através da identificação da fragmentação internucleossômica de DNA, a qual é provocada pela ação da DNase endógena durante o processo apoptótico (PARK *et al.*, 2006). A fragmentação de DNA nas células apoptóticas é mensurada pela incorporação de nucleotídeos marcados com corante fluorescente (fluoresceína-12-dUTP) na extremidade 3’OH do DNA fragmentado. A enzima recombinante “Terminal Deoxynucleotidyl Transferase” (rTdT) é a responsável por catalisar essa reação e irá polimerizar os nucleotídeos nas regiões de quebra do DNA. A fluoresceína-12-dUTP incorporada é, então, amplificada e mensurada por microscopia de fluorescência.

Apesar de observado efeito negativo de elevados índices de fragmentação de DNA (> 35 %) no desenvolvimento embrionário subsequente, ele por si só não é um determinante absoluto da incompetência de desenvolvimento. Além do índice de fragmentação, o tamanho e distribuição dos fragmentos indicam a extensão das alterações celulares e, portanto têm um significativo impacto no potencial de desenvolvimento do embrião (ALIKANI *et al.*, 2002; ANTUNES *et al.*, 2010).

Márquez-Alvarado *et al.* (2004) ao avaliarem a qualidade de embriões congelados utilizando a técnica de TUNEL, observaram que células TUNEL-positivas foram identificadas tanto nos embriões congelados, como naqueles não congelados ($7,09 \pm 0,54$) e que número de células TUNEL-positivas aumentou

significativamente conforme o período de tempo em que os embriões permaneceram congelados aumentou, com uma média de 26 e 23 células para embriões congelados por 3 e 4 anos e de 13 e 11 células, quando mantidos por 1 ano e 3 meses, respectivamente. O aumento significativo de células apoptóticas em embriões armazenados por 3 meses, quando comparado ao grupo não congelado, indica que a criopreservação por si só causa danos que comprometem a viabilidade embrionária.

Relação tempo-dependente foi também observada para a proporção de células com fragmentação de DNA, identificadas pela técnica de TUNEL, em embriões bovinos refrigerados a 4 °C. Otoi *et al.* (1999) notaram aumento significativo na proporção de fragmentação de DNA após 24 horas de refrigeração, não havendo diferença entre os embriões armazenados por 0 e 24 horas e entre aqueles que permaneceram refrigerados por período de tempo superior a 48 horas (até 120h).

Neste estudo, o aumento na proporção de células apoptóticas não foi associado com redução na capacidade de desenvolvimento dos embriões refrigerados, porém a maior proporção de células coradas com iodeto de propídio (PI) após 72 horas de armazenamento, as quais mostraram evidências de alterações necróticas, foi estreitamente correlacionada com reduzida competência para o desenvolvimento embrionário (OTOI *et al.*, 1999).

3 Expressão Gênica

A ativação do genoma em embriões bovinos ocorre com maior intensidade no estágio de 8-16 células (TELFORD *et al.*, 1990), embora menor ativação já seja observada com apenas uma célula (MEMILI e FIRST, 2000).

Enquanto a ativação genômica não é iniciada, o desenvolvimento inicial do embrião ocorre a partir de mRNAs e proteínas sintetizados durante o crescimento e maturação oocitária (TELFORD *et al.*, 1990). No embrião, a transcrição da maioria dos genes é tempo e estágio-dependente, seguindo o padrão de expressão embrionário e/ou materno (NIEMANN E WRENZYCKI, 2000).

A técnica de RT-PCR permite a identificação de quantidade reduzida de mRNA mesmo em amostras biológicas pequenas, como é o caso dos oócitos e

embriões, nos quais a quantidade de mRNA é limitada, sendo o método de escolha para identificação individual de genes em oócitos e embriões (WRENZYCKI *et al.*, 2007).

O padrão de expressão gênica, em embriões bovinos, tem sido avaliado com frequência nos últimos anos, principalmente em estudos comparativos envolvendo o cultivo de embriões PIV em diferentes meios (WRENZYCKI *et al.*, 2001, SAADELDIN *et al.*, 2011), produzidos em diferentes métodos (KUZMANY *et al.*, 2011), sexados (WALKER *et al.*, 2009), criopreservados através de congelação convencional ou vitrificação (STINSHOFF *et al.*, 2011), bem como em embriões criopreservados oriundos de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (SUDANO *et al.*, 2013). Contudo, relatos sobre a determinação da expressão gênica em embriões refrigerados não foram encontrados na literatura.

A expressão dos genes HSPA1A e SLC2A1 parece ser diretamente afetada tanto pela congelação lenta, quanto pela vitrificação. A menor abundância de transcritos de tais genes em embriões criopreservados, pode levar a um aumento na sensibilidade embrionária às mudanças de temperatura e consequente redução na capacidade crioprotetora, além de reduzir a disponibilidade de glicose para o metabolismo embrionário após descongelação, respectivamente (STINSHOFF *et al.*, 2011). Entretanto, a expressão dos genes codificadores das proteínas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e peroxirredoxina (PRDX) é basicamente descrita como marcadores de qualidade embrionária e da efetividade das condições de cultivo adotadas, sendo que, pouco se sabe sobre a influência das condições de armazenamento hipotérmico sobre a abundância relativa dos mesmos.

A expressão do gene HSP (“Heat Shock Protein”) é induzida, sob condições fisiológicas e de estresse celular, pela proteína HSF-1 (“Heat Shock Factor”). Em condições normais, o gene HSP possui variadas funções na atividade celular, tais como: modulação da atividade e degradação de proteínas, facilitação do transporte de proteínas através das membranas de organelas e dobragem correta das cadeias peptídicas durante a tradução proteica (TAKAIAMA *et al.*, 2003).

Dependendo da intensidade (duração e temperatura mínima) de exposição à baixas temperaturas, o estresse causado pelo frio pode desencadear uma resposta celular que ativa o processo apoptótico, por indução de HSPs, quando ocorre o reaquecimento, ou levar à necrose (LIU *et al.*, 1994). De acordo com

Fujita (1999), nenhum gene encontra-se “upregulated” durante exposição à temperaturas inferiores a 5 °C, somente quando existe o estresse celular causado pelo reaquecimento (GRAND *et al.*, 1995).

A abundância relativa de transcritos de HSP70 parece não sofrer influência do método de produção dos embriões (PIV, GIFT- “Gamete Intrafallopian Transfer”, CVL- “Transfer of Cleaved Stages into the Oviduct”, ou TE), porém é significativamente aumentada quando criopreservados por congelação lenta, sugerindo que é um sensível indicador de estresse por congelamento (KUZMANY *et al.*, 2011). Já Stinshoff *et al.* (2011) observaram “downregulation” para este gene quando embriões PIV foram submetidos à congelação lenta e vitrificação, o que, segundo eles, pode levar a uma redução da capacidade crioprotetora e aumento da sensibilidade celular às mudanças de temperatura. Em blastocistos produzidos *in vivo*, cultivados em meio SOF, a abundância relativa para transcritos desse gene foi significativamente menor do que em embriões cultivados em TCM (WRENZYCKI *et al.*, 2001).

A enzima SOD (superóxido dismutase) é uma das primeiras e mais importantes enzimas antioxidantes a atuar na proteção das células contra os danos causados por radicais livres, além de catalisar a dismutação de superóxido em peróxido de hidrogênio (CHIHUAILAF *et al.*, 2002). A SOD1 (CuZn-SOD) é encontrada principalmente no citosol e em menor quantidade no núcleo, lisossomos, peroxissomos e entre as membranas mitocondriais (CHANG *et al.* 1988).

Em bovinos, transcritos de SOD1 foram identificados em oócitos imaturos e maturados *in vitro*, indicando a transmissão de “pools” de mRNAs maternos para os gametas, mas também, em mórulas e blastocistos obtidos *in vivo* e ao longo do desenvolvimento embrionário *in vitro* (LEQUARRÉ *et al.*, 2001). Em embriões suínos, a presença de transcritos de SOD1 foi correlacionada com melhor qualidade e maior sobrevivência embrionária após vitrificação (CASTILLO-MARTÍN *et al.*, 2014).

A peroxirredoxina (PRDX ou AOP) é a enzima que atua como antioxidante, na proliferação e diferenciação celular, resposta imune e controle de apoptose (RHEE *et al.*, 2001). Juntamente com a superóxido dismutase e glutatona, formam sistemas antioxidantes que atuam na regulação de ROS e protegem oócitos e embriões do estresse oxidativo. Transcritos de PRDX1 foram

identificados em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro*, com um padrão de expressão contínuo durante todo o desenvolvimento embrionário *in vitro*, não sofrendo influência do nível de O₂ durante o cultivo (5 ou 20%) (LEYENS *et al.*, 2004).

A proteína transportadora de glicose (GLUT), codificada pelo gene SLC2A, é essencial para o desenvolvimento embrionário, principalmente no período pós-compactação, pois facilita o transporte de glicose, um importante substrato energético, para o interior da célula. Tem sido sugerido que a GLUT1 é a principal responsável pelo efluxo de glicose para a cavidade da blastocele e para as células da massa celular interna (PANTALEON e KAYE, 1998; AUGUSTIN *et al.*, 2001). A expressão de SLC2A1 (GLUT1) ocorre após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e torna-se mais significativa à medida que o embrião necessita de maior aporte de glicose (WRENYCKI *et al.*, 1999).

Embriões bovinos produzidos *in vitro*, independentemente de serem cultivados em TCM ou SOF, acrescidos de soro da vaca em cio, BSA ou PVA, apresentaram níveis de transcritos significativamente menores de SLC2A1 do que mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* (WRENYCKI *et al.*, 2001). Outras condições de cultivo *in vitro*, como tensão de oxigênio (HARVEY *et al.*, 2004), presença ou não de soro (WRENYCKI *et al.*, 1999) e níveis de glicose (KIMURA *et al.*, 2005) no meio de cultivo parecem alterar sua expressão.

Não foram encontrados relatos na literatura quanto à expressão gênica em embriões refrigerados, independente da espécie e genes avaliados.

REFERÊNCIAS

ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G.; GARRISI, J.; MAGDELA, K.; COHEN, J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. **Human Reproduction**, v.15 (12), 2634-2643, 2000.

ANTUNES, G.; CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; MARQUES, A.; JIN, H.S.; MOREIRA DA SILVA, F. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 26-32, 2010.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A., WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression. Is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 60 (3), p. 370-376, 2001.

AVERILL, R.L.W.; ROWSON, L.E.A. Attempts at storage of sheep ova at low temperatures. **The Journal of Agricultural Science**, v. 52, p. 392-395, 1959.

BAGUISI, A.; ARAV, A.; CROSBY, T.F.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins development *in vitro* and *in vivo*. **Theriogenology**, v. 48, p. 1017-1024, 1997.

BANK, H.; MAURER, R.R. Survival of frozen rabbit embryos. **Experimental Cell Research**, v. 89, p.188-196, 1974.

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

BETTS, D.H.; MADAN, P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, p. 445-453, 2008.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effect of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 143-155, 2002.

BONDURANT, R.H.; ANDERSON, G.B.; BOLAND, M.P.; CUPPS, P.T.; HUGHES, M.A. Pregnancy rates and embryo survival following transfer of bovine embryos storage at 4 °C. **Theriogenology**, v. 15, p.112, 1981.

BONDURANT, R.H.; ANDERSON, G.B.; BOLAND, M.P.; CUPPS, P.T.; HUGHES, M.A. Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4 °C. **Theriogenology**, v. 17, p.223, 1982.

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. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

CASTILLO-MARTÍN, M.; BONET, S.; MORATÓ, R.; YESTE, M. Supplementing culture and vitrification-warming media with L-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of PIV porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. **Cryobiology**, v.68, p. 451-458, 2014.

CHANG, M. C. Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. **Nature**, v. 159, p. 602, 1947.

CHANG, L.Y.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J.; CRAPO, J.D. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 107, p. 2169–2179, 1988.

CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTEWER, F.G. Patogenesis del estres oxidativo: consecuencias y evaluacion en salud animal. **Veterinaria México**, v. 33, p. 265–283, 2002.

CLARK, K.E.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; SEIDEL JR, G.E. Viability of stored equine embryos. **Journal of Animal Science**, v.65, p.534-542, 1987.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; SANTOS, M.P.; SÁ FILHO, M.F. Use of cooled bull semen as a Strategy to increase the pregnancy rate in fixed-time artificial insemination programs Case Report. **American Journal of Animal and Veterinary Science**, v. 7, p.175-179, 2012.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic process during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, p. 221-231, 2005.

FOOTE, R.H.; BRATTON, R.W. The fertility of bovine semen cooled with and without the addition of citrate-sulfanilamide-yolk extender. **Journal of Dairy Science**, v. 32, p. 856-861, 1949.

FUJITA J. Cold shock response in mammalian cells. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, p.243–255, 1999.

GRAND, R.J.; MILNER, A.E.; MUSTOE, T.; JOHNSON, G.D.; OWEN, D.; GRANT, M.L.; GREGORY, C.D. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 218, p. 439– 451, 1995.

GROBFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL W.M.C.; RATH, D. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v. 70, p. 1225-1233, 2008.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division and death in the mouse blastocyst before implantation. **Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 195, p. 519–26, 1986.

HARPER, M.J.K.; ROWSON, L.E.A. Attempted storage of sheep ova at 7° centigrade. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 6, p. 183-191, 1963.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.1108–1119, 2004.

HAYES, M.J.; MOSS, S.E. Annexins and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.322, p.1166-1170, 2004.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.1302–10, 1998.

HUDSON, J.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; WELCH, S.; SQUIRES, E.L. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 25, p. 51-54, 2006.

IDETA, A.; AOYAGI, Y.; TSUCHIYA, K.; KAMIJIMA, T.; NISHIMIYA, Y.; TSUDA, S. A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 °C. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1-5, 2013.

IDETA, A.; AOYAGI, Y.; TSUCHIYA, K.; NAKAMURA, Y.; HAYAMA, K.; SHIRASAWA, A.; SAKAGUCHI, K.; TOMINAGA, N.; NISHIMIYA, Y.; TSUDA, S. Prolonging hypothermic storage (4 °C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, p. 1-6, 2015.

International Embryo Transfer Society (IETS). In: PERRY, G. 2012 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. Disponível em: http://www.iets.org/pdf/comm_data/december2013.pdf. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.

KAMJOO, M.; BRISON, D.R.; KIMBER, S.J. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 67-77, 2002.

KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. **Clinical Liver Disease**, v.4, p. 1-23, 2000.

KIMURA, K.; SPATE, L.D.; GREEN, M.P.; ROBERTS, R.M. Effects of D-glucose concentration, D-fructose, and inhibitors of enzymes of the pentose phosphate pathway on the development and sex ratio of bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 201-207, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO N. Robbins & Cotran: **Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUZMANY, A.; HAVLICEK, V.; WRENZYCKI, C.; WILKENING, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, p. 482-494, 2011.

LEIBO, S.P.; WINNINGER, D. Production of bovine pregnancies from embryos transported at 0° C by air. **Theriogenology**, v. 25, p. 164, 1986.

LEQUARRÉ, A.S.; FEUGAND, J.M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; DESSY, F.; LANGENDONCKT, A.V. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 45-53, 2001.

LEVY, R. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. **International Review Cytology**, v. 210, p.1–37, 2001.

LEYENS, G.; KOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxidases in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 69, p. 243-251, 2004.

LINDNER, G.M.; ELLIS, D.E. Refrigeration of bovine embryo. **Theriogenology**, v.23, p.202, 1985.

LINDNER, G.M.; ANDERSON, G.B.; BONDURANT, R.H.; CUPPS, P.T. Survival of bovine embryos stored at 4 °C. **Theriogenology**, v. 20, p. 311, 1983.

LIU, A.Y.; BIAN, H.; HUANG, L.E.; LEE, Y.K. Transient cold shock induces the heat shock response upon recovery at 37°C in human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.14768–14775, 1994.

MÁRQUEZ-ALVARADO, Y.C.; GALINA, C.S.; CASTILLA, B.; LEÓN, H.; MORENO-MENDONZA, N. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 141-145, 2004.

MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v.27, p. 69-79, 1987.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-58, 2000.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Zygotic and embryonic expression in cow: a review of timing and mechanisms of early expression as compared with other species. **Zygote**, v.8, p. 87-96, 2000.

METCALFE, A.D.; HUNTER, H.R.; BLOOR, D.J.; LIEBERMAN, B.A.; PICTON, H.M.; LEESE, H.J.; KIMBER, S.J.; BRISON, D.R.; ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptor. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 255-260, 1999.

MORI, M.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; AGUNG, B.; NAGAI, T. Effects of β -mercaptoethanol and cycloheximide on survival and DNA damage of bovine embryos stored at 4 °C for 72 h. **Theriogenology**, v. 65, p. 1322-1332, 2006.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J.F.; DAELS, P.F. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and EmCare holding solutions. **Theriogenology**, v.58, p.755-757, 2002.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J.F.; DAELS, P.F. *In vitro* and *in vivo* comparison of Ham's F-10, EmCare holding solution and Vigro holding plus for the cooled storage of equine embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1615-1625, 2003.

MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J.L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J.F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; DAELS, P.F. Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5 °C. **Theriogenology**, v.61, p.921-932, 2004.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S.; SCHATTEN, G.P. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21-34, 2000.

NUNES, D.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 20, p. 42-56, 2006.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; HORIKITA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Relationship between dead cells and DNA fragmentation in bovine embryos produced *in vitro* and stored at 4 °C. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 54, p. 342-347, 1999.

PANTALEON, M.; KAYE, P.L. Glucose transportes in preimplantation development. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 77-81, 1998.

PAPA, P.M.; MAZIERO, R.D.; GUASTI, P.N.; JUNQUEIRA, C.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.F.; PAPA, F.O.; VIANNA, F.P.; ALVARENGA, M.A.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, p. 107-113, 2015.

PARK, S.Y.; KIM, E.Y.; CUI, X.S.; TAE, J.C.; LEE, W.D.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v. 14, p. 125-131, 2006.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Apoptosis is na adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. **Bichemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, p. 37-42, 2002.

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; PALHARES, M. S.; COSTA, E. P. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5° C em contêiner modelo Celle modificado. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 1-5, 1999.

POOL, S.H.; BLAKEWOOD, E.G.; RORIE, R.W.; MCFARLAND, C.W.; GODKE, R.A. Use of a household refrigerator for short-term storage of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 25, p. 184, 1986.

RHEE, S.G.; KANG, S.W.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. **IUBMB Life**, v. 52, p. 35–41, 2001.

SAADELDIN, I.M.; KIM, B.H.; LEE, B.C.; JANG,G. Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos. **Theriogenology**, v. 75, p. 995-1004, 2011.

SCHNEIDER, M.R.; SCHWARTS, J.; REICHENBACH, H.D.; RODRIGUES, J.L. Short-term storage of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 49, p. 249, 1998.

SREENAN, J.; SCANLON, P.; GORDON, I. Storage of fertilized cattle ova *in vitro*. **Journal of Agriculture Science**, v.74, p. 593-594, 1970.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRÜNING, K.; WRENZYCKI. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v.76, p.1433-1441, 2011.

SUDANO, M.J.; CAIXETA, E.S.; PASCHOAL, D.M.; MATRTINS JR, A.; MACHADO, RUI.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Cryotolerance

and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos Taurus Taurus in vitro*- and *in vivo*- produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129-1141, 2013.

TAKAIAMA, S.; REED, J.C.; HOMMA, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. **Oncogene**, v.22, p. 9041-9047, 2003.

TELFORD, N.A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p.90-100, 1990.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies with. **Science**, v. 281, p. 1212-1216, 1998.

TROUSON, A.O.; WILLADSEN, S.M.; ROWSON, L.E.A. The influence of *in vitro* culture and cooling on the survival and development of cows embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 367-370, 1976a.

TROUSON, A.O.; WILLADSEN, S.M.; ROWSON, L.E.A.; NEWCOMB, R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 46, p. 173-178, 1976b.

WALKER, A.M.; KIMURA, K.; ROBERTS, R.M. Expression of bovine interferon-tau variants according to sex and age of conceptus. **Theriogenology**, v. 72, p. 44-53, 2009.

WEIL, M.; JACOBSON, M.D.; COLES, H.S.; DAVIES, T.J.; GARDNER, R.L.; RAFF, K.D.; RAFF, M.C.; Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. **The Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 1053-1059, 1996.

WHITTINGHAM, D.G.; ADAMS, C.E. Low temperature preservation of rabbit embryos. **Cryobiology**, v.11, p.560-561, 1974.

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

WILLETT, E.L.; BLACK, W.G.; CASIDA, L.E.; STONE, W.H.; BUCKNER, P.J. Success of transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v.113, p.247, 1951.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, v.11, p.1071-1079, 1972.

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

WILMUT, I.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. The effect on cow embryos of cooling to 20, 0 and -196 °C. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 45, p. 409-122, 1975.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p.8-18, 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS JR, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 893-901, 2001.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. 77-83, 2007.

YANG, N.S.; DUFF, R.; LU, K.H.; GORDON, I.; POLGE, C. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.36, p. 297, 1991.

YANG, H.W.; HWANG, K.J.; KWON, H.C.; KIM, H.S.; CHOI, K.W.; OH, K.S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13 (4), p. 998-1002, 1998.

Capítulo 2

Trabalho a ser enviado para a revista “Reproduction, Fertility and Development”.
(Anexo I)

Efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre a viabilidade e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Fernanda N. Marqui^{A,E}, Alicio Martins Jr.^{B,E}, Tereza C. C. Silva^C, Diego G. Souza^A, André M. Crespilho^D, José A. Dell’Aqua Jr.^A, Eunice Oba^A

^A Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Rubião Jr. s/nº, 18618-970, Botucatu – SP, Brasil.

^B Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, 16050-680, Araçatuba – SP, Brasil.

^C Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, 16050-680, Araçatuba – SP, Brasil.

^D Universidade de Santo Amaro, Escola de Medicina Veterinária, UNISA, São Paulo – SP, Brasil.

^E Autores para correspondência. Email: fernanda_nunes_37@hotmail.com;
amartins@fmva.unesp.br

Resumo. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito de diferentes meios e tempos de refrigeração sobre o desenvolvimento e expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, blastocistos D7 foram divididos em três grupos: controle, embriões mantidos em meio SOFaa, em incubadora de CO₂, por 6 e 48h; refrigerados, embriões mantidos a 5 °C, em Meio 199, por 24 (M199-24h) e 48h (M199-48h) ou em meio BotuEmbryo[®], por 24 (BE-24h) e 48h (BE-48h). Após a refrigeração, os embriões foram cultivados sob as mesmas condições do grupo controle para avaliação da viabilidade embrionária às 6 e 48h, e das taxas de reexpansão e eclosão, às 24 e 48h, respectivamente. Às 6h de cultivo parte dos embriões foi retirada e armazenada para posterior análise de qPCR e TUNEL. Menor porcentagem de blastocistos viáveis, às 6 e 48h, foi observada no grupo M199-48 em relação ao grupo controle. A taxa de reexpansão não diferiu entre os embriões refrigerados e o grupo controle, porém, menor (P<0,05) taxa de eclosão foi observada nos grupos M199-48h e BE-48h do que no grupo controle. Maior (P<0,05) porcentagem de células apoptóticas foi observada no grupo BE-48h do que nos grupos controle e BE-24h. Os meios e tempos utilizados não alteraram a expressão dos genes HSPA1A, PRDX1, SOD1 e SLC2A1. Portanto, de modo geral, o meio e o tempo de refrigeração não promoveram efeito potencial adverso sobre a viabilidade embrionária, taxa de reexpansão e eclosão, número de células apoptóticas e expressão gênica, sugerindo o emprego do meio BotuEmbryo[®], o qual é disponível comercialmente.

Introdução

A criopreservação é rotineiramente utilizada em programas de melhoramento genético em bovinos, principalmente por otimizar o uso de embriões excedentes e permitir a expansão da comercialização e preservação de material genético. Apesar de significativos avanços, desde o primeiro relato na congelação de embriões bovinos (Wilmot e Rowson 1973), a criopreservação ainda é um desafio na reprodução animal assistida, devido à maior sensibilidade de embriões produzidos *in vitro* (Sudano *et al.* 2011) e aos resultados inconsistentes. Assim, aliado ao fato de, inevitavelmente, causar danos físicos e químicos às células embrionárias, reduzindo as taxas de gestação, após a transferência, não é o método mais apropriado de armazenamento de embriões por curtos períodos de tempo (Ideta *et al.* 2013).

O desenvolvimento da técnica de refrigeração em embriões bovinos foi impulsionado a partir do advento da transferência de embriões e sua aplicação em nível comercial, já que concomitantemente ao aumento no número de estruturas coletadas havia a necessidade de uma técnica que permitisse a manutenção do embrião fora do ambiente uterino até a transferência (Trounson *et al.* 1976a). Apesar de o primeiro sucesso na refrigeração de embriões bovinos ter ocorrido na década de 70 (Sreenan *et al.* 1970), desde então poucos relatos têm sido encontrados na literatura, principalmente, após o surgimento da congelação e vitrificação. Inicialmente, o tempo de armazenamento foi o principal fator limitante para o uso da refrigeração como técnica alternativa de preservação, uma vez que a viabilidade embrionária reduzia significativamente após 2 a 3 dias de armazenamento, a 4 °C (Lindner *et al.* 1983; Otoi *et al.* 1999). Entretanto, como os resultados de criopreservação de embriões bovinos, principalmente produzidos

in vitro, têm limitado sua aplicação em nível de campo, voltou-se a indagar a viabilidade da refrigeração como método de preservação hipotérmica. Assim, Ideta *et al.* (2013) e Ideta *et al.* (2015), com o objetivo de desenvolver e avaliar um meio de refrigeração capaz de estender o tempo de armazenamento, conseguiram manter embriões bovinos refrigerados a 4 °C, por 7 e 10 dias, com elevada viabilidade embrionária e taxa de prenhez semelhante à observada para embriões transferidos à fresco.

A principal vantagem da utilização da refrigeração reside no fato de permitir o aproveitamento de receptoras não sincronizadas no momento da transferência, além de manter o embrião em baixa atividade metabólica (Ideta *et al.* 2013), permitindo seu transporte por longas distâncias, sem, no entanto, expor à toxicidade dos crioprotetores e aos danos causados pelos cristais de gelo, sendo uma técnica simples, de baixo custo, que não requer equipamentos especiais e, portanto, de fácil aplicação em condições de campo (Ideta *et al.* 2015).

Contudo, da mesma forma observada na criopreservação, o metabolismo embrionário não cessa totalmente durante a refrigeração, podendo induzir alterações e morte celular, ainda que, segundo Otoi *et al.* (1999), a maior proporção (tempo-dependente) de células apoptóticas em embriões submetidos à refrigeração não foi associada à redução na competência de desenvolvimento embrionário.

Apesar de a morfologia ser utilizada frequentemente como critério de avaliação da qualidade embrionária, com o advento de novas biotecnologias, tornou-se evidente que a competência dos embriões poderia estar severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis (Alikani *et al.* 2000). Sendo assim, a avaliação da expressão de diversos genes como marcadores de

qualidade embrionária e efetividade do método de criopreservação (Stinshoff *et al.* 2011), bem como do sistema de cultivo (Kuzmany *et al.* 2011; Wrenzycky *et al.* 2001) tem sido realizada, porém, relatos sobre a determinação da expressão gênica em embriões refrigerados não foram encontrados na literatura.

Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos de diferentes meios de armazenamento (Meio 199 e BotuEmbryo[®]) e tempos de refrigeração (24 e 48h) sobre o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mediante avaliação da qualidade embrionária, taxas de reexpansão e eclosão de blastocistos, número de células e fragmentação de DNA, bem como na expressão de genes relacionados ao metabolismo embrionário (SLC2A1) e estresse celular (HSPA1A, PRDX1 e SOD1)

Material e Métodos

Reagentes

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), exceto quando especificado.

Delineamento experimental

Blastocistos obtidos no dia 7 após a fertilização foram divididos nos seguintes grupos experimentais: grupo controle, embriões mantidos em meio SOFaa, em incubadora a 5% de CO₂, em ar, a 38,8 °C, por 6 e 48 horas; grupo refrigerado, embriões mantidos a 5 °C, em Meio 199 (M5017), acrescido de 2,62 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de piruvato de sódio, 100 UI mL⁻¹ de penicilina, 25 mM de HEPES e 50% de SFB, por 24 (M199-24h) e 48h (M199-48h) ou em meio

comercial BotuEmbryo[®] (Botupharma, Botucatu, Brasil), por 24 (BE-24h) e 48h (BE-48h). Após a refrigeração, os embriões foram cultivados em meio SOFaa, em incubadora a 5% de CO₂, da mesma forma e tempos adotados para o grupo controle. Às 6 e 48h de cultivo pós-refrigeração foi avaliada a viabilidade embrionária, sendo que às 6h, parte dos blastocistos foi submetida às técnicas de TUNEL e qPCR. Os demais embriões permaneceram em cultivo para avaliação das taxas de reexpansão e eclosão, às 24 e 48 horas, respectivamente.

Coleta dos ovários e maturação in vitro (MIV) dos oócitos

Para a obtenção dos oócitos, ovários de vacas foram colhidos em frigorífico e transportados para o Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal, UNESP, Araçatuba – SP, Brasil. Folículos de 2-7 mm de diâmetro foram puncionados e os oócitos lavados três vezes em meio de maturação base (MM-b), composto por Meio199 (M5017), suplementado com 2,62 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de piruvato de sódio, 100 UI mL⁻¹ de penicilina e 10% de SFB (v/v) (Nutricell[®]; Campinas, Brasil). Somente oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, e citoplasma homogêneo, foram selecionados para a maturação *in vitro* (MIV). Os oócitos foram maturados em grupos de 20 a 25, em gotas de 95 µL de MM-b, suplementado com 5 µg mL⁻¹ de LH (Lutropin-V[®]; Bioniche Co., Belleville, ON, Canadá) e 1 µg mL⁻¹ de FSH (Folltropin[®]; Bioniche), em atmosfera úmida a 5% de CO₂, em ar, a 38,8 °C, por 24 horas.

Fertilização in vitro (FIV)

Decorridas 24 horas de maturação, os oócitos foram transferidos para gotas de 95 µL de meio TALP, acrescido de 30 µg mL de heparina, 2 mM de penicilamina, 1

mM de hipotaurina e 250 mM de epinefrina (TALP-FIV). O sêmen foi descongelado em água a 37 °C/30s e os espermatozoides selecionados em gradiente descontínuo de Percoll (300 µL a 45% e 300 µL a 90%). A seguir, 400 µL da amostra foram depositados sobre a coluna de Percoll 45% e centrifugado à 700 x g/5 min; posteriormente, o “pellet” foi ressuscendido em 600 µL de TALP-FIV e centrifugado a 700 x g/3 min. Após a seleção, os espermatozoides foram coincubados com os oócitos, na concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL, por 20 horas, sob as mesmas condições de cultivo adotadas para a MIV.

Cultivo in vitro (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos foram desnudados através de sucessivas pipetagens, transferidos (20 a 25 por gota) para gotas de 95 µL de meio de cultura SOFaa (“Syntetic Oviduct Fluid Amino Acids”) (Holm *et al.* 1999), suplementado com 0,34 mM de Tri-sódio-citrato, 2,77 mM de myo-inositol, 2,5% de SFB, 5 mg mL de BSA e 100 UI de penicilina (em substituição à gentamicina), e cultivados sob as mesmas condições das etapas de MIV e FIV. Às 72h, foi realizado o primeiro “feeding”, sendo repetido às 120h de cultivo; às 168h, a produção de blastocistos foi verificada e os embriões aleatoriamente distribuídos entre os grupos, conforme delineamento experimental.

Refrigeração dos blastocistos

No dia 7 após a fertilização, os blastocistos (BI e Bx) de grau I (Robertson e Nelson 1998) foram equitativamente selecionados em número e qualidade, e aleatoriamente divididos em cada grupo experimental. Os embriões (15 a 20 por grupo) foram lavados três vezes em meio de refrigeração (Meio 199 + 25 mM de

HEPES + 50% de SFB ou BotuEmbryo[®]) e transferidos para tubos (tipo “ependorf”) de 600 µL contendo 500 µL do respectivo meio. Os tubos foram, então colocados em frascos com 90 mL de água a 5 °C e a refrigeração conduzida, por 24 e 48 horas, em caixa de transporte BotuFlex[®] (Botupharma), previamente equilibrada a 5 °C.

Cultivo dos embriões

Após o período de refrigeração estabelecido para cada grupo, os embriões foram mantidos em placa aquecedora a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram lavados por três vezes em meio SOFaa e cultivados em gotas do mesmo meio de cultivo, a 38,8 °C, em incubadora a 5% de CO₂, em ar, e alta umidade, por 6 e 48h. Decorridas 6 e 48h de cultivo, a viabilidade dos embriões, isto é, ausência de desagregação de blastômeros e de coloração atípica, foi observada. Às 6h, parte dos blastocistos/blastocistos expandidos, classificados como de grau I, foi equitativamente distribuída e armazenada para posterior análise através de qPCR e TUNEL. Os demais embriões permaneceram em cultivo para avaliação das taxas de reexpansão, devido ao colapso de blastocele, e eclosão, às 24 e 48h, respectivamente. Os embriões do grupo controle foram cultivados em meio SOFaa sob as mesmas condições estabelecidas para os embriões refrigerados.

Avaliação do número total de células e células em apoptose (TUNEL)

Para a técnica de TUNEL (“Terminal deoxynucleotide transferase uridine nick-end labelling”), que identifica *in situ* a fragmentação internucleossomal de DNA resultante de apoptose, 30 blastocistos de cada grupo experimental foram utilizados. A coloração para a técnica de TUNEL foi conduzida utilizando o kit

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (G3250, Promega Co., Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, os embriões foram lavados em PBS e fixados com solução de paraformaldeído 4% (v/v de PBS), por 25 min, a 4 °C, em lâmina previamente preparada com poli-L-lisina. Em seguida, foram lavados em PBS e permeabilizados em solução de 0,2% de Triton® X-100 (v/v de PBS), por 5 min. Um controle positivo foi realizado incubando a amostra com 100 µL de Tampão DNase I, à temperatura ambiente, por 5 min. Ao controle positivo e às amostras foram adicionados 100 µL de Tampão de Equilíbrio e incubadas por 5-10 min, à temperatura ambiente. O excesso do Tampão de Equilíbrio foi retirado e as amostras incubadas com 50 µL de Tampão de Incubação rTdT (composto por 45 µL de Tampão de Equilíbrio, 5 µL de Mix Nucleotídeos e 1 µL de Enzima rTdT) por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida, ao abrigo da luz. O controle negativo foi incubado com o Tampão de Incubação, porém sem a enzima rTdT. Posteriormente, todas as amostras foram lavadas, coradas com DAPI (1 mg/mL) e avaliadas em microscópio de fluorescência. Usando a excitação de 450-490 nm e a emissão de 515 nm, os núcleos fluorescentes de verde (“fluorescein isothiocyanate”, FITC) foram considerados TUNEL positivas, com DNA fragmentado. Usando a excitação de 365 nm e a emissão de 420 nm, a fluorescência azul (DAPI) indicou a presença e localização do núcleo das células saudáveis e apoptóticas. Para a contagem do número total de células e células apoptóticas, o software Image J 1.41 (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi utilizado.

Determinação da abundância relativa de transcritos de genes por PCR em tempo real (qPCR)

O RNA total dos embriões refrigerados/não refrigerados foi extraído utilizando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen[®], Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante, sendo quantificado no equipamento NanoDrop 3.1.2 (ND1000, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O protocolo utilizado foi previamente descrito por Silva-Frade et al. (2014). Um total de 2 ng de cada amostra de RNA foi tratado com 1 µL de DNase (DNase 1 mg) e convertidas em cDNA usando o kit “high-capacity” RNA-to-cDNA[™] (Applied Biosystems). A expressão dos genes codificadores das proteínas de choque térmico (HSPA1A) e transportadora de glicose (SLC2A1), bem como das enzimas peroxirredoxina (PRDX1) e superóxido dismutase (SOD1) foi quantificada utilizando o equipamento StepOnePlus[®] (Applied Biosystems). A reação final (50 µL) continha 1,2 µg de cDNA, 400 nM de primer e 200 nM de sonda FAM – MGB (região 5”) customizada para SOD1 (Bt03215423_g1), PRDX1 (Bt03223684_m1), HSP70.1 (Bt03292232_gH) e SLC2A1 (Bt03215311_g1) (Applied Biosystems). O PCR foi iniciado por 40 ciclos de amplificação a 95 °C (15 s) e 60 °C (60 s). A expressão do gene bovino constitutivo Histona 2a foi quantificada como referência. Todas as reações foram realizadas em triplicata para assegurar a acurácia dos resultados. Os resultados foram analisados através do método ΔC_t , utilizando o “software” do próprio equipamento StepOnePlus[®] para a quantificação relativa da expressão dos genes alvo, após normalização para o gene constitutivo.

Análise estatística

Os resultados de taxas de reexpansão e eclosão, viabilidade embrionária, taxa de apoptose e expressão gênica foram obtidos de oito replicatas. Para a análise estatística, os dados, quando necessário, foram transformados por arco seno e analisados por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. Os dados, não transformados, foram apresentados como média e desvio padrão (DP). Para todas as análises, $P < 0,05$ foi considerado como significativo. As taxas de reexpansão e eclosão foram calculadas com base na quantidade de blastocistos que chegaram ao estágio de expandido e eclodido, durante o cultivo pós-refrigeração, em relação aos blastocistos submetidos à refrigeração. A taxa de apoptose foi calculada através do número de células apoptóticas observadas no embrião e a expressão gênica, a partir dos resultados obtidos na análise de qPCR.

Resultados

Desenvolvimento embrionário pós-refrigeração

Menor média ($P < 0,05$) de blastocistos que apresentavam colapso de blastocele, após a refrigeração, foi observada no grupo M199-24h (52,8%), diferindo significativamente dos grupos refrigerados por 48 horas, tanto no Meio 199 (79,56%) quando no BotuEmbryo[®] (76,06%). No entanto, quando submetidos ao cultivo pós-refrigeração, os grupos não diferiram entre si quanto a porcentagem de blastocistos com blastocele colapsada, independente do meio e tempo de refrigeração utilizados (Tabela 1).

Às 6 horas de cultivo (Fig. 3, 4 e 5), maiores porcentagens ($P<0,05$) de embriões, classificados como morfológicamente viáveis, foram observadas nos grupos controle (100%) e BE-24h (91,81%), não havendo diferença significativa entre ambos. A menor média de viabilidade embrionária foi observada no grupo M199-48h (54,81%), diferindo significativamente ($P<0,05$) do grupo controle e BE-24h, porém, foi similar aos grupos M199-24h (73,91%) e BE-48h (72,66%). Ao comparar a porcentagem de blastocistos viáveis, no início do período de cultivo (0h) (Fig. 1 e 2) e às 6h de cultivo, diferença significativa foi observada ($P<0,05$) nos grupos M199-24h (100% e 73,91%), M199-48h (98,43% e 54,81%) e BE-48h (94,17% e 72,66%, respectivamente). A viabilidade embrionária, ao final do cultivo pós-refrigeração (48h) (Fig. 3, 4 e 5), não diferiu entre os blastocistos submetidos à refrigeração, entretanto menor porcentagem de embriões viáveis foi observada no grupo M199-48h (35,53%), diferindo significativamente ($P<0,05$) do grupo controle (100%; Tabela 2).

Não foi observado efeito dos meios e tempos de refrigeração sobre a taxa de reexpansão embrionária, contudo, às 48 horas de cultivo pós-refrigeração, os blastocistos refrigerados por 48 horas (7,54% e 22,98% para o M199 e BE, respectivamente) apresentaram taxa de eclosão significativamente menor ($P<0,05$) do que os embriões do grupo controle (77,52%). Não houve diferença significativa entre as taxas de eclosão dos blastocistos refrigerados por 24 horas (50,79% para o M199 e 33,98% para BE) e o grupo controle (Tabela 3).

Avaliação do número total de células e células em apoptose

O número total de células por embrião foi semelhante entre os grupos de tratamento e o grupo controle (Tabela 4). Células TUNEL-positivas foram

identificadas tanto em embriões refrigerados quanto em embriões do grupo controle (Fig. 6). Maior porcentagem ($P < 0,05$) de células apoptóticas foi observada no grupo BE-48h (12%) em comparação com controle (5,33%) e BE-24h (5%). Nos embriões refrigerados em Meio 199, não houve efeito do tempo (8 e 11% para 24 e 48h, respectivamente) sobre os valores médios de células apoptóticas por embrião. Não houve diferença significativa na proporção de células apoptóticas entre os embriões refrigerados por 24 horas e o grupo controle (Tabela 4).

Efeito da refrigeração sobre a expressão gênica

A abundância relativa de transcritos dos genes analisados, em blastocistos bovinos dos grupos controle e refrigerado por 24 e 48 horas, está descrita na Figura 7. Não foram encontradas diferenças significativas para os transcritos dos cinco genes avaliados nos embriões submetidos à refrigeração, independente do meio e tempo utilizados, bem como em comparação com o grupo controle (Fig. 7).

Discussão

No presente estudo, não foi constatado efeito adverso da refrigeração, com base nos meios e tempos utilizados, às 0h de cultivo, no entanto, a porcentagem de embriões viáveis reduziu significativamente entre 0 e 6h de cultivo, quando os blastocistos foram refrigerados em Meio 199, por 24 e 48 horas, e em meio BotuEmbryo[®], por 48 horas, demonstrando que a refrigeração em meio BotuEmbryo[®], por 24 horas, não provocou efeito imediato sobre a viabilidade embrionária. Às 6h de cultivo, menor índice de blastocistos viáveis foi observado no grupo M199-48h (54,81%) em relação aos grupos controle (100%) e BE-24h

(91,81%), no entanto, às 48h, a viabilidade embrionária não diferiu entre os grupos refrigerados, independente do meio e tempo de refrigeração. Embora o Meio 199 (M5017), provavelmente, seja um meio mais complexo que o BotuEmbryo[®], afinal é constituído por 60 componentes, ambos foram igualmente eficazes na refrigeração de embriões bovinos PIV por até 48 horas. Segundo Ideta *et al.* (2013), a capacidade de desenvolvimento embrionário, pós-refrigeração, bem como a possibilidade de prolongar o armazenamento sob condições hipotérmicas, parecem estar diretamente ligadas ao meio de refrigeração.

A utilização do meio TCM 199, como meio de armazenamento embrionário, foi descrita por Trounson *et al.* (1976b), porém com resultados inferiores ao PBS, quando embriões bovinos produzidos *in vivo* foram mantidos à temperatura ambiente. Quando empregado em condições hipotérmicas (4 °C), o TCM 199, acrescido de 25 mM de HEPES, 5 % de SFB e antibióticos, proporcionou elevada taxa de eclosão (51,5%) em embriões bovinos produzidos *in vitro* por até 48 horas de refrigeração (Otoi *et al.* 1999). Segundo Ideta *et al.* (2013), o Meio 199, quando suplementado com 50% de SFB, proporcionou resultados satisfatórios na preservação de embriões, com viabilidade embrionária significativamente maior (69%) quando 25 mM de HEPES foi adicionado ao Meio 199 + 50 % de SFB. No presente trabalho, o Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 50% de SFB, quando mantido por 24 (50,79%) e 48h (7,54%) sob refrigeração, não diferiu quanto a taxa de eclosão do meio BotuEmbryo[®] (33,98 e 22,98%, respectivamente), mas o não conhecimento da composição do meio comercial impede uma análise mais criteriosa.

Este é o primeiro relato da utilização do meio BotuEmbryo[®] para a refrigeração de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Além de ter se mostrado igualmente eficaz ao Meio 199 para o armazenamento hipotérmico, a sua adoção em programas de transferência de embriões é encorajadora, pois trata-se de um produto disponível comercialmente, dispensando equipamentos, manipulação laboratorial e compra de reagentes para o preparo do meio de refrigeração M199, o qual deve ser acrescido de 2,62 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de piruvato de sódio, 100 UI mL⁻¹ de penicilina, 25 mM de HEPES e 50% de SFB.

Recentemente, Ideta *et al.* (2015) demonstraram que a adição de proteínas anticongelantes (AFP), derivadas de peixe, ao meio de refrigeração Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 20% de SFB, prolongou o tempo de armazenamento de embriões bovinos produzidos *in vivo*, por 10 dias, com elevada viabilidade embrionária (57,5%) e satisfatória taxa de gestação (75%), aumentando, assim, o intervalo para a utilização de receptoras não sincronizadas no momento da transferência. A taxa de sobrevivência embrionária significativamente reduzida, após a refrigeração, por período igual ou superior a 48 horas (Lindner *et al.* 1983; Otoi *et al.* 1999), foi, inicialmente, o principal fator limitante para a utilização da técnica como alternativa de preservação de embriões. No presente estudo, a proporção de embriões viáveis, às 48h de cultivo, e as taxas de reexpansão e eclosão, após 24 e 48 horas de refrigeração, não diferiram entre o Meio 199 e o meio BotuEmbryo[®]. Quando a refrigeração ocorreu por 48 horas, em ambos os meios, a viabilidade embrionária (35,53% para o Meio 199 e 56,67% para o BotuEmbryo[®]) foi inferior à encontrada por Ideta *et al.* (2013), após refrigeração de embriões bovinos PIV Meio 199 acrescido de 50% de SFB por 3 dias (90%) e a de embriões de TE armazenados por 168 horas

(69%). Porém, maior taxa de eclosão foi observada quando os embriões permaneceram em Meio 199, por 24 horas (50,79%), em relação à obtida por Ideta *et al.* (2013), após 168 horas de refrigeração (36%), a qual foi similar a dos embriões mantidos em meio BotuEmbryo[®] por 24 horas (33,98%); no entanto, o maior tempo de armazenamento adotado por esses autores deve ser considerado, uma vez que a sobrevivência e capacidade de desenvolvimento embrionário decrescem à medida que o tempo de refrigeração aumenta (Otoi *et al.* 1999).

A menor taxa de eclosão observada nos grupos M199-48h (7,54%) e BE-48h (22,98%), em relação ao grupo controle (77,52%), possivelmente ocorreu em virtude do maior tempo de refrigeração e/ou de exposição à elevada concentração de SFB no grupo M199, uma vez que, quando a refrigeração foi mantida por 24 horas a taxa de eclosão em ambos os meios (50,79% para o Meio 199 e 33,98% para o BotuEmbryo[®]) não diferiu do controle. De acordo com Ideta *et al.* (2015), a elevada concentração de soro no meio, altera a viscosidade do mesmo, podendo causar o enrijecimento da zona pelúcida e inibir a eclosão do blastocisto, prejudicando o desenvolvimento embrionário após a refrigeração.

Além disso, maior porcentagem de blastocistos com colapso de blastocele após a refrigeração foi observada nos grupos refrigerados por 48 horas (79,56 e 76,06% para o Meio 199 e BotuEmbryo[®], respectivamente), diferindo significativamente do grupo M199-24h (52,80%). O colapso de blastocele é uma alteração morfológica comumente observada em embriões refrigerados (BonDurant *et al.* 1982; Pinto Neto *et al.* 1999) e criopreservados (Vajta *et al.* 1997) e que pode ocorrer devido à desintegração das junções especializadas entre as células trofoblásticas adjacentes (Vajta *et al.* 1997) e à queda do

metabolismo com parada do transporte ativo realizado pela blastocele (Bondurant *et al.* 1982). Segundo Lindner *et al.* (1983), este estado é facilmente revertido após curto período de cultivo e não altera o desenvolvimento embrionário subsequente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o mesmo observado no presente estudo, uma vez que a partir de 6 horas de cultivo pós-refrigeração observamos redução acentuada na porcentagem de blastocistos colapsados à medida que o período de cultivo se estendeu, resultando em elevada viabilidade embrionária ao final do cultivo *in vitro*.

A morfologia embrionária é um critério frequentemente utilizado para a avaliação da competência do embrião, entretanto, a relação entre morfologia e viabilidade é claramente mais complexa, uma vez que com o advento de novas biotecnologias foi possível observar que a competência embrionária pode estar severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis (Alikani *et al.* 2000). A utilização de técnicas para identificação de células apoptóticas tem sido uma ferramenta importante na avaliação da qualidade embrionária, principalmente por sua ocorrência estar relacionada com condições sub-ótimas para o desenvolvimento e de estresse (Betts e King 2001). Segundo Otoi *et al.* (1999), células com fragmentação de DNA são observadas tanto em embriões não refrigerados quanto em refrigerados, sendo a proporção de células apoptóticas, por embrião, tempo-dependente, aumentando significativamente após 24 horas de refrigeração a 4 °C. Similarmente, em nosso estudo, células TUNEL-positivas foram identificadas em embriões refrigerados e não refrigerados (5,33%), com aumento no número de células apoptóticas, tempo-dependente, quando foi utilizado o meio BotuEmbryo® (5% vs. 12% às 24 e 48 horas, respectivamente). A porcentagem média de células apoptóticas foi relativamente

baixa neste estudo, tanto no grupo controle quanto nos grupos refrigerados, sendo que, quando os embriões foram armazenados por 24 horas, independente do meio utilizado (8% para o Meio 199 e 5% para o BotuEmbryo[®]), a proporção de células com DNA fragmentado foi inferior àquela encontrada por Otoi *et al.* (1999), durante o mesmo período de armazenamento (18%), e similar à taxa de embriões congelados (8,37%) e vitrificados (9,17%) (Stinshoff *et al.* 2011). Embora no grupo BE-48h o índice de apoptose tenha sido significativamente superior aos grupos controle e BE-24h, a capacidade de desenvolvimento embrionário não foi comprometida, corroborando com Alikani *et al.* (1999), que observaram efeito negativo da apoptose no desenvolvimento embrionário subsequente apenas quando o índice de fragmentação de DNA foi superior a 35%.

Apesar de ser diretamente influenciado pelo sistema de cultivo empregado e pelo estágio de desenvolvimento embrionário, o número de células embrionárias parece ser afetado pelos métodos de criopreservação utilizados, variando de $96,6 \pm 2,4$ a $131,9 \pm 15,1$ células em embriões criopreservados através de congelação lenta (Sommerfeld e Nieman 1999; Mucci *et al.* 2006) e de $76,7 \pm 3,4$ a $131,0 \pm 15,1$ em embriões vitrificados (Rios *et al.* 2010; Gomez *et al.* 2009). Em embriões refrigerados, o número total de células variou entre $120,0 \pm 9,2$ e $135,6 \pm 7,7$ células, não havendo diferença entre blastocistos armazenados por até 120 horas e o grupo controle (Otoi *et al.* 1999). Média semelhante de células, por embrião, foi observada no presente estudo ($127,0 \pm 3,61$ a $133,66 \pm 2,52$), não sendo observada influência negativa da refrigeração sobre o número de células, concordando com os dados de Otoi *et al.* (1999). Aliás, o número mínimo de células verificado neste estudo foi superior ao número mínimo verificado para

embriões congelados ou vitrificados, como os estudos mencionados, indicando, talvez, que a refrigeração possa ser mais viável.

Vários estudos têm proposto a avaliação da expressão de importantes genes como indicadores sensíveis da qualidade embrionária e competência para o desenvolvimento (Wrenzycki *et al* 2001; Stinshoff *et al.* 2011; Kuzmany *et al.* 2011). Os padrões de expressão gênica podem variar, de forma significativa, entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Wrenzycki *et al.* 2001), bem como entre embriões submetidos à congelação lenta e vitrificação e entre estes e embriões não criopreservados (Stinshoff *et al.* 2011). Relatos de expressão gênica não foram encontrados em embriões refrigerados, portanto, de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo conduzido a fim de comparar a expressão de importantes genes relacionados com situações de estresse celular (HSPA1A, PRDX1 e SOD1) e de metabolismo embrionário (SLC2A1). No presente estudo, a refrigeração de embriões bovinos produzidos *in vitro* não teve efeito sobre a abundância relativa de transcritos dos genes estudados, indicando que os meios de refrigeração utilizados, a temperatura e o tempo de exposição às condições hipotérmicas não afetaram negativamente a qualidade embrionária em nível molecular no momento em que foi avaliada.

A expressão de genes codificadores de proteínas do choque térmico (HSPA) é um importante indicador de resposta celular ao estresse em embriões submetidos à condições desfavoráveis, como o retorno à normotermia, após choque térmico (Paula-Lopes e Hansen 2002) e choque frio (Sonna *et al.* 2002). A expressão de transcritos para esse gene se inicia poucos minutos após o início do estresse térmico, com o pico de expressão ocorrendo até horas depois (Sonna *et al.* 2002). Além disso, estão envolvidos em importantes atividades da função

celular, como regulação do estado redox (Otterbein e Choi 2000) e de morte celular (Ravangnan *et al.* 2001). Em embriões criopreservados, o aumento nos níveis de transcritos de HSPA1 é, segundo Kuzmany *et al.* (2011), um indicador sensível de ocorrência de estresse por congelação. Em nosso estudo com embriões refrigerados a 5 °C, o nível de expressão de HSPA1A (Hsp 70.1), apesar de numericamente maior nos embriões armazenados por 24 horas, não diferiu entre os grupos de embriões refrigerados, independente do meio e tempo de armazenamento, bem como do grupo controle. Uma possível explicação seria que a temperatura mais elevada empregada na refrigeração (5 °C), pareceu não provocar acentuada resposta celular ao estresse térmico durante o retorno à normotermia, como a utilizada na criopreservação (-196 °C). Além disso, a duração da refrigeração, bem como a temperatura empregada, provavelmente não foram suficientes para desencadear estresse celular, ativando o processo apoptótico e elevando a expressão de HSP1A1.

SLC2A1 (“Solute Carrier Family”), gene responsável por codificar a GLUT1, é expressado após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (Wrenzycki *et al.* 2001) e em níveis mais elevados à medida que ocorre maior utilização de glicose pelo embrião (Wrenzycki *et al.* 1999). Elevados níveis de expressão de SLC2A1 têm sido associados a blastocistos de melhor qualidade, no estágio de eclosão e com maior atividade metabólica (Lopes *et al.* 2007). A menor expressão de SLC2A1, encontrada em embriões criopreservados por congelação lenta e vitrificação, pode resultar em diminuição da disponibilidade de glicose para o metabolismo embrionário após o aquecimento e, assim, refletir em baixa qualidade embrionária (Stinshoff *et al.* 2011). Lopes *et al.* (2007) ressaltam que, a maior taxa de respiração observada em embriões com elevados níveis de transcritos de

SLC2A1, pode representar uma manifestação de estresse metabólico, porém, seria esperada alteração na expressão de genes relacionados à resposta celular ao estresse, o que não foi observado em nosso estudo. Independentemente do meio utilizado no presente experimento, a refrigeração de embriões bovinos não alterou os níveis de transcritos do gene SLC2A1, apesar de observada maior média no grupo BotuEmbryo[®] 48 horas. A normalidade de expressão deste gene, associada à elevada capacidade de desenvolvimento embrionário pós-refrigeração, sugerem que o armazenamento a 5 °C, por até 48 horas, não altera de forma significativa o metabolismo e a disponibilidade de glicose para o embrião, hipótese que seria confirmada através da identificação da proteína GLUT1.

A expressão de SOD1 e PRDX1, apesar de ser observada em menor abundância em embriões não refrigerados, neste estudo, não foi afetada pela refrigeração a 5 °C em embriões bovinos produzidos *in vitro*. A superóxido dismutase (SOD), está entre as principais enzimas antioxidantes que atuam na proteção celular contra espécies reativas ao oxigênio, neutralizando o ânion superóxido (O_2^-) (Chihuilaf *et al.* 2002). As peroxirredoxinas (PRDX) formam uma família de enzimas antioxidantes, envolvidas na diferenciação e proliferação celular, resposta imune e no controle da apoptose (Rhee *et al.* 2001). Transcritos dos genes PRDX1 e SOD1 são encontrados em oócitos antes e após a maturação *in vitro* e expressados continuamente durante o desenvolvimento embrionário (Lequarré *et al.* 2001; Leyens *et al.* 2004). A diferença numérica, mas não significativa, nos níveis de expressão de ambos os genes, no presente estudo, pode ou não ser indicativa de estresse oxidativo, já que uma maior produção de EROS é esperada em embriões expostos à luz e O_2 atmosférico

durante a manipulação. Rizos *et al.* (2003), apesar de não encontrarem diferença significativa, notaram um aumento na expressão de CuZnSOD (SOD1) em embriões cultivados em meio contendo SFB, o que em parte pode explicar os maiores níveis de transcritos observados nos embriões refrigerados, visto a elevada concentração de SFB no Meio 199, ainda, que a composição do meio BotuEmbryo[®] não seja conhecida. Relatos da expressão do gene PRDX1 em embriões submetidos à refrigeração ou criopreservação não foram encontrados na literatura.

Concluindo, sob as condições experimentais adotadas e de modo geral, nenhum efeito potencial adverso do meio e do de refrigeração foi observado, entre os grupos refrigerados, sobre a viabilidade, taxa de reexpansão e de eclosão, número de células apoptóticas e expressão gênica de blastocistos bovinos após 48 horas de armazenamento hipotérmico, ainda que, os grupos M199-48h e BE-48h apresentaram menor índice de eclosão quando comparado ao grupo controle. Assim, sugere-se o uso da refrigeração como método de preservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, bem como a utilização do meio BotuEmbryo[®], por ser um meio disponível comercialmente, não requerendo equipamentos e manipulação laboratorial. A transferência de embriões, produzidos através da metodologia proposta, poderá confirmar sua eficiência no estabelecimento de taxas de concepção similares àquelas obtidas com embriões transferidos à fresco.

Agradecimentos

Esta pesquisa foi subsidiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2013/15905-9). Os autores agradecem a

Botupharma Ind. e Comércio de Produtos Veterinários LTDA e ao frigorífico BrasFrigo.

Referências

- Alikani, M., Cohen, J., Tomkin, G., Garrisi, J., Mack, C., e Scott, R.T. (1999) Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility*. **70** (5), 836-842.
- Alikani, M., Calderon, G., Tomkin, G., Garrisi, J., Magdela, K., e Cohen, J. (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum. Reprod.* **15** (12), 2634-2643.
- Betts, D.H., e King, W.A. (2001). Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. **55**, 171-191.
- Bondurant, R.H., Anderson, G.B., Boland, M.P., Cupps, P.T., e Hughes, M.A. (1982). Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4 °C. *Theriogenology*. **17**, 223.
- Chihuailaf, R.R., Contreras, P.A., e Wittwer, F.G. (2002). Patogenesis del estres oxidativo: consecuencias y evaluacion em salud animal. *Vet. Mexico*. **33**, 265-283.
- Gomez, E., Munoz, M., Rodriguez, A., Caamano, J.N., Facal, N., e Diez, C. (2009). Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. *Reprod. Domest. Animal*. **40**, 194-199.
- Holm, P., Booth, P.J., Shimidt, M.H., Greve, T., e Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro*-production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology*. **52**(4), 683-700.

- Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Kamijima, T., Nishimiya, Y., e Tsuda, S. (2013). A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 °C. *Scientific Reports*. **3**, 1-5.
- Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Hayama, K., Shirasawa, A., Sakaguchi, K., Tominaga, N., Nishimiya, Y., e Tsuda, S. Prolonging hypothermic storage (4 °C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. (2015) *J. Reprod. Dev.* **61**, 1-6.
- Isobe, T., Ikebata, Y., Onitsuka, T., Do, L.T.K., Sato, Y., Taniguchi, M., e Otoi, T. (2013). Cryopreservation for bovine embryos in serum-free freezing medium containing silk protein sericin. *Cryobiology*. **67**, 184-187.
- Jhonson, M.H., e Nasr-Esfahani, M.H. (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays*, **16**, 31-38.
- Kuzmany, A., Havlicek, V., Wrenzycki, C., Wilkening, S., Brem, G., e Besenfelder, U. (2011). Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology*. **75**, 482-494.
- Lequarré, A.S., Feugang, J.M., Malhomme, O., Donnay, I., Massip, A., Dessy, F., e Langendonckt, A.V. (2001). Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutase during bovine embryo development: Influence of in vitro culture. *Mol. Reprod. Dev.* **58**, 45-53.
- Leyens, G., Knoop, B., e Donnay, I. (2004). Expression of Peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **69**. 234-251.

- Lindner, G.M., Anderson, G.B., Bondurant, R.H., e Cupps, P.T. (1983). Survival of bovine embryos stored at 4 °C. *Theriogenology*. **20**, 311.
- Lopes, A.S., Wrenzycki, C., Ramsing, N.B., Herrmann, D., Niemann, H., Lovendahl, P., Greve, T., e Callesen, H. (2007). Respiration rates correlate with mRNA expression of *G6PD* and *GLUT1* genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*. **68**, 223-236.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., e Alberio, R.H. (2006). Effect of estrus cow sérum during bovine embryos culture on blastocysts development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. **65**, 1551-1562.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Horikita, N., Tachikawa, S., e Suzuki, T. (1999). Relationship between dead cells and DNA fragmentation in bovine embryos produced *in vitro* and stored at 4 °C. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 342-347.
- Otterbein, L.E., e Choi, A.M.K. (2000). Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **279**, 1037-2000.
- Paula-Lopes, F.F., e Hansen, P.J. (2002). Apoptosis is a adaptative response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**, 37- 42.
- Pinto Neto, A., Silva Filho, J. M., Fonseca, J. F., Palhares, M. S., e Costa, E. P. (1999). Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5° C em contêiner modelo Celle modificado. *Rev. Bras. Med. Vet. Zootec.* **51**, 1-5.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S.A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jäätelä, M., Penninger, J.M., Garrido, C., e Kroemer, G. (2001).

- Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* **3**, 839-843.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., e Chang, T.S., Jeong.W., Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, **52**. 35–41.
- Rios, G.L., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., e Alberio, R.H. (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* **118**, 19-24.
- Rizos, D., Guitiérrez-Adán, S., Pérez-Garnelo, J., La Fuente, J., Boland, M.P., e Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* **68**, 236-243.
- Robertson, I., e Nelson, R.E. (1998). Certification and identification of the embryo. In „Manual of the International Embryo Transfer Society“. 3^a edi. (Eds D.A Stringfellow e S.M.Seidel.) pp. 103-116. (IETS: Champaign, IL, EUA).
- Silva-Frade, C., Gameiro, R., Okamura, L.H., Flores, E.F., e Cardoso, T.C. (2014). Programmed cell death-associated gene transcripts in bovine embryos exposed to bovine *Herpesvirus* type 5. *Mol. Cell. Probes.* **28**, 113-117.
- Sommerfeld, V., e Nieman, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology.* **38**, 95-105.
- Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L., e Lilly, C.M. (2002). Invited review: effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* **92** (4), 1725-1742.
- Sreenan, J., Scanlon, P., e Gordon, I. (1970). Storage of fertilized cattle ova *in vitro*. *J. Agr. Sci.* **74**, 593-594.

- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., e Wrenzycki, C. (2011). Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*. **76**, 1433-1441.
- Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado, T.D., Magalhaes, L.C.O., Crocomo, L.F., Lima-Neto, J.F., e Landin-Alvarenga, F.D. (2011). Lipid content and apoptosis of *in vitro* produced bovine as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*. **75**, 1211-1220.
- Trouson, A.O., Willadsen, S.M., e Rowson, L.E.A. (1976a). The influence of *in vitro* culture and cooling on the survival and development of cows embryos. *J. Reprod. Fert.* **47**, 367-370.
- Trouson, A.O., Willadsen, S.M., Rowson, L.E.A., ENewcomb, R. (1976b). The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *J. Reprod. Fert.* **46**, 173-178.
- Vajta, G., Hyttel, P., E Callesen, H. (1997). Morphological changes of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol. Reprod. Dev.* v. **48**, p. 9–17.
- Wilmut, I., e Rowson, L.E. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* **92**, 686-690.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W., e Niemann H.(1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, p.8-18.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Keskinetepe, L., Martins Jr, A., Sirisathien, S., Brackett, B., e Niemann, H. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reprod.* **16**, 893-901.

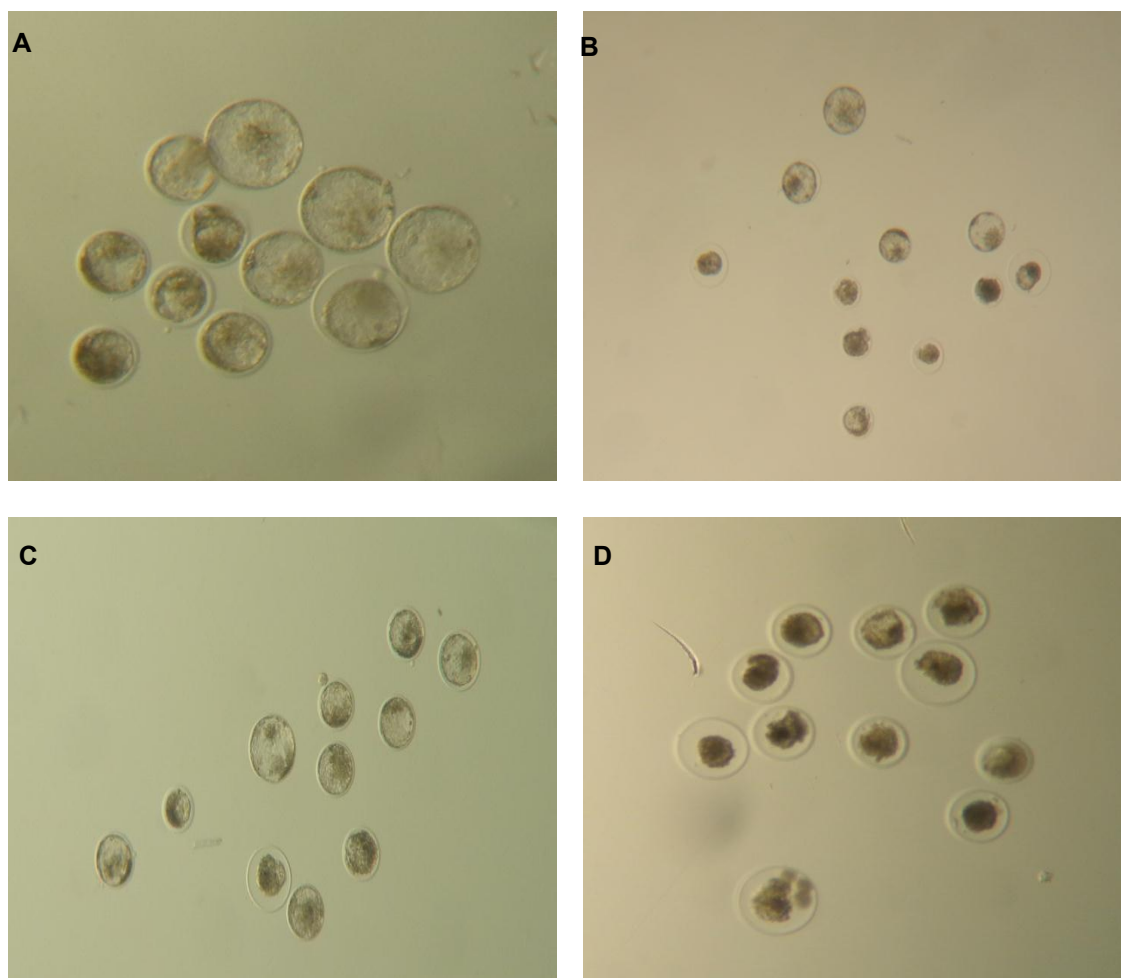


Figura 1. Embrões bovinos produzidos *in vitro*, antes (A, C) e após refrigeração por 24 (B) e 48 horas (D), em Meio 199 + 25 mM de HEPES + 50% de SFB. (40x).

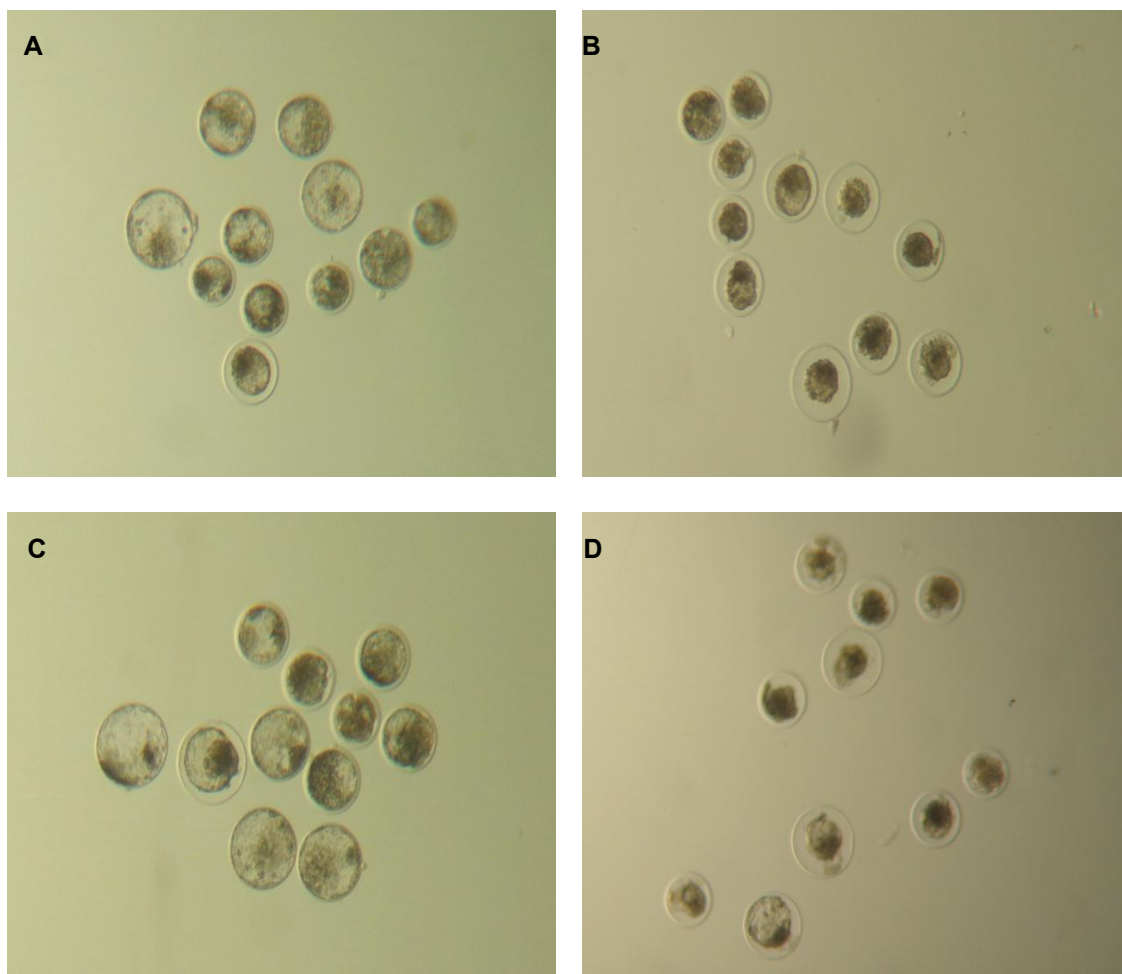


Figura 2. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, antes (A, C) e após refrigeração por 24 (B) e 48 horas (D), em meio BotuEmbryo[®]. (40x)

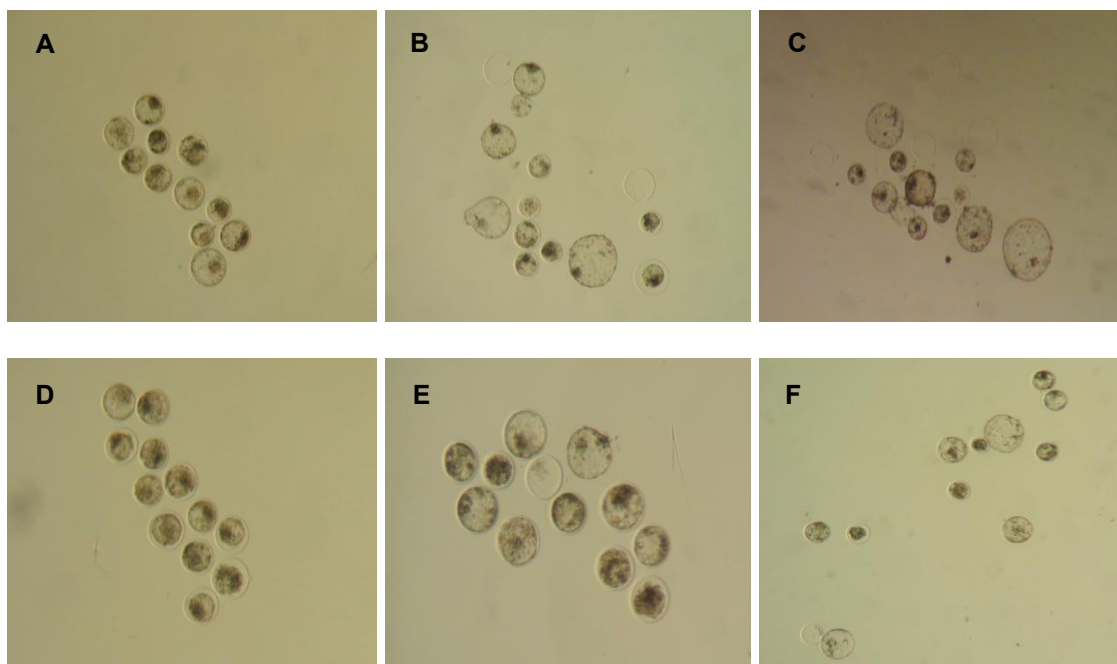


Figura 3. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, após cultivo por 6, 24 e 48 horas, refrigerados por 24 horas em Meio 199 (A, B e C) e em meio comercial BotuEmbryo® (D, E e F), respectivamente. (40x).

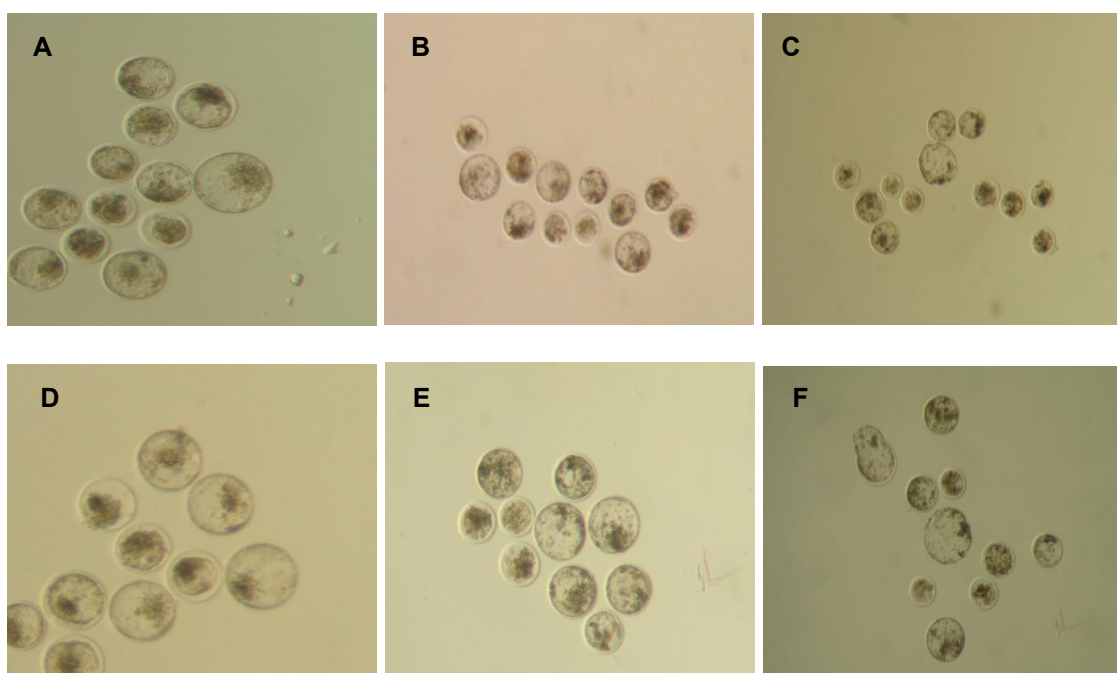


Figura 4. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, após cultivo por 6, 24 e 48 horas, refrigerados por 48 horas em Meio 199 (A, B e C) e em meio comercial BotuEmbryo® (D, E e F), respectivamente. (40x).

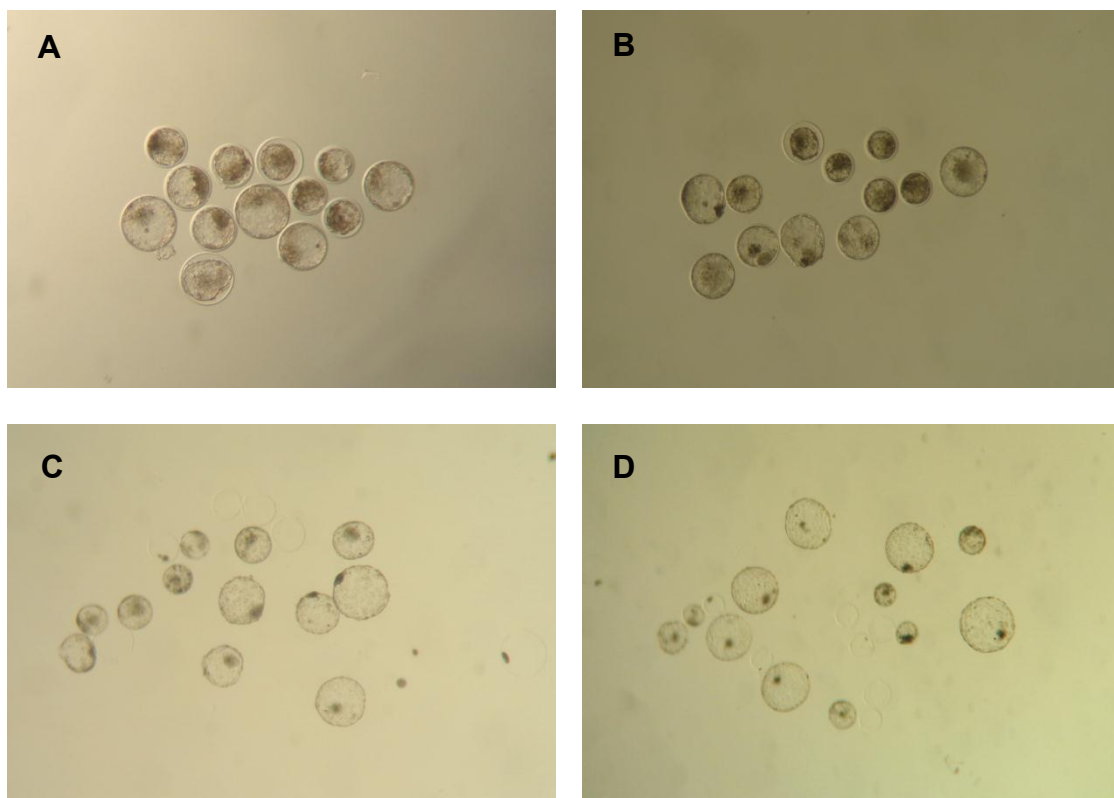


Figura 5. Embriões bovinos produzidos *in vitro*, antes (A) e após cultivo em meio SOFaa por 6 (B), 24 (C) e 48 horas (D), a 38,8 °C, em incubadora a 5% de CO₂, em ar (grupo controle). (40x).

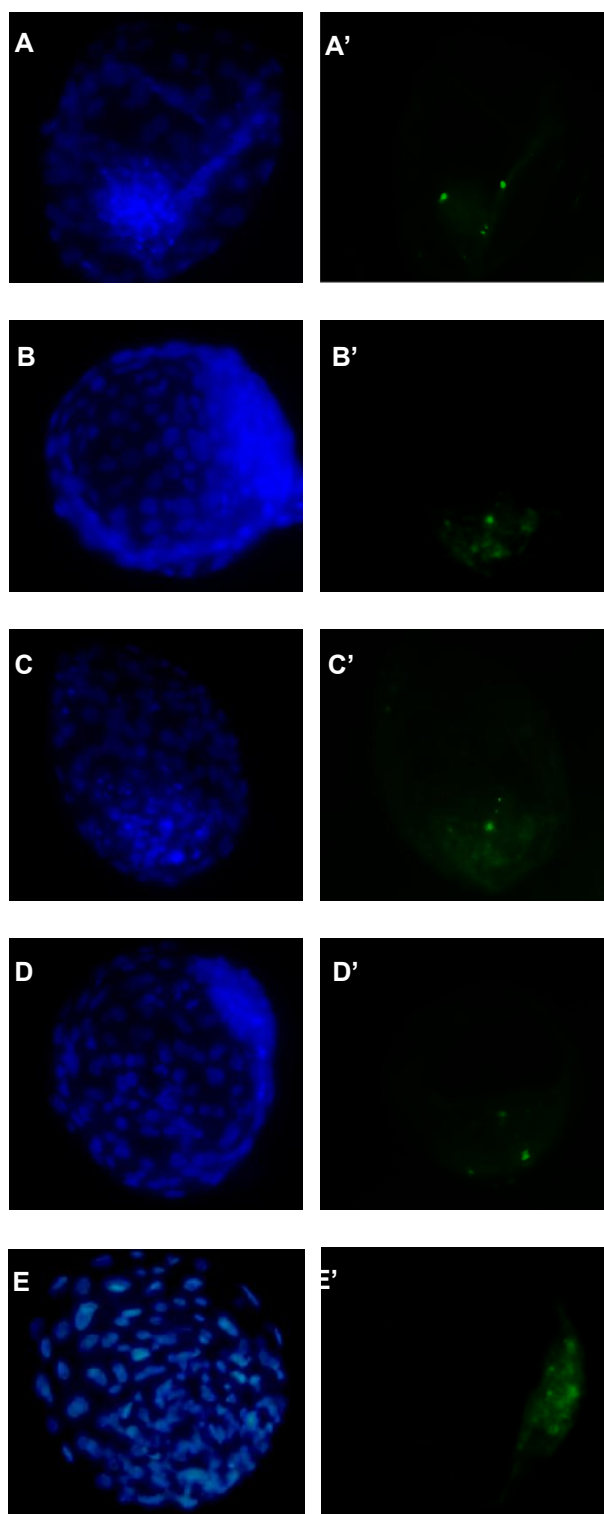


Figura 6. Blastocistos bovinos avaliados pela técnica de TUNEL. Os núcleos corados em verde (FITC) indicam fragmentação de DNA em células apoptóticas. Os núcleos corados em azul (Hoechst) representam o número total de células. **A** e **A'**: Grupo controle; **B** e **B'**: grupo refrigerado em Meio 199 por 24 horas; **C** e **C'**: grupo refrigerado em Meio 199 por 48 horas; **D** e **D'**: grupo refrigerado em meio BotuEmbryo[®] por 24 horas; **E** e **E'**: grupo refrigerado em meio BotuEmbryo[®] por 48 horas.

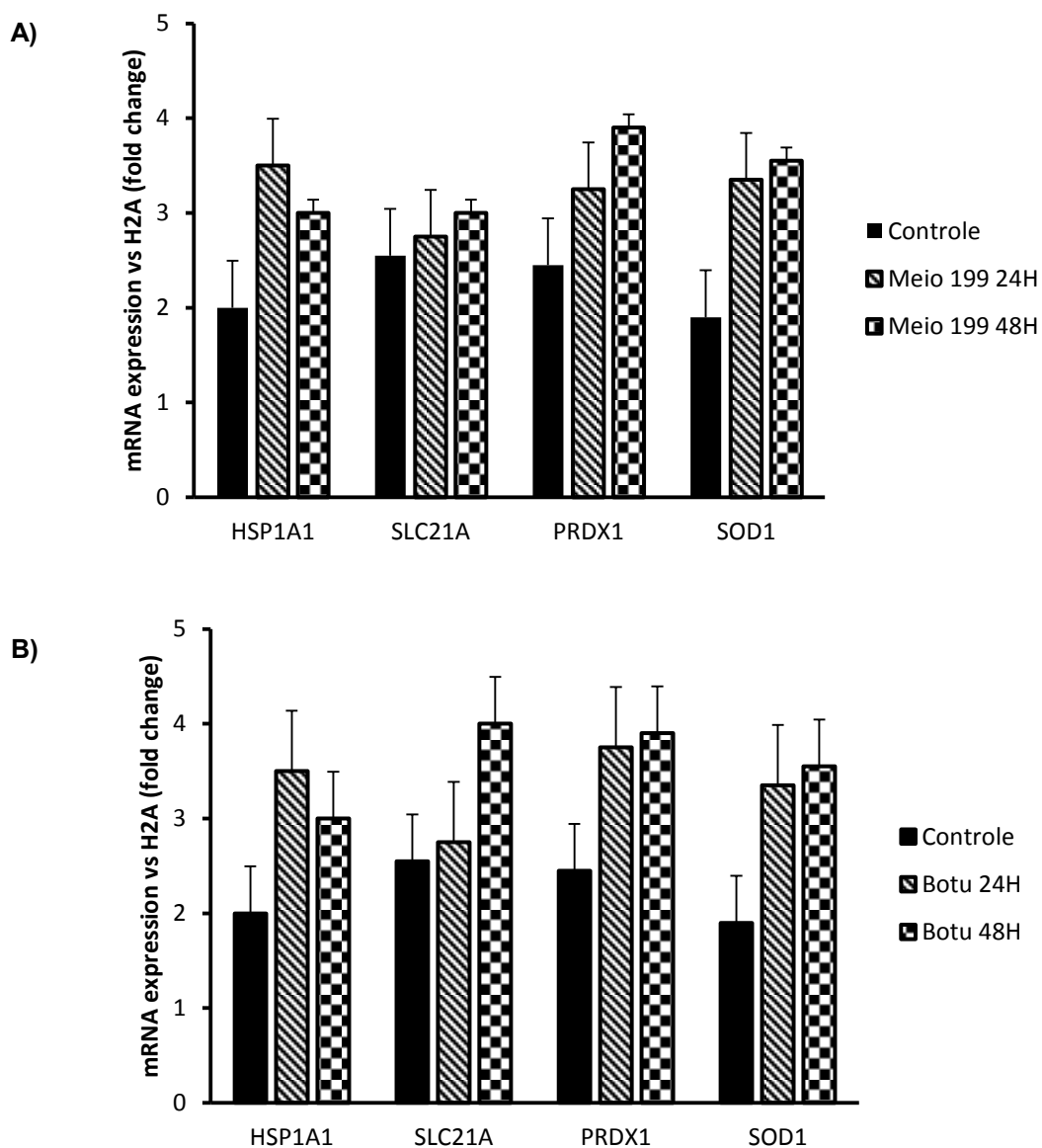


Figura 7. Abundância relativa de transcritos em blastocistos bovinos não submetidos à refrigeração (controle) e refrigerados em Meio 199 (A) e em meio BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas.

Tabela 1. Valores da média de blastocistos bovinos que apresentavam colapso de blastocele no momento em que foram submetidos à refrigeração (Pré), imediatamente após a refrigeração (Pós), às 6, 24 e 48h de cultivo em incubadora de CO₂, dos grupos refrigerados em Meio 199* e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas.

Os valores entre parênteses representam o número de blastocistos com colapso de blastocele/número total de blastocistos em cada grupo experimental.

GRUPO	Colapso de blastocele (%)				
	Pré	Pós	6H	24H	48H
Meio 199 - 24h	5,60 (7/125)	52,80 ^b (66/125)	10,40 (13/125)	1,60 (2/125)	0,80 (1/125)
Meio 199 - 48h	6,56 (9/137)	79,56 ^a (109/137)	7,30 (10/137)	3,65 (5/137)	1,46 (2/137)
BotuEmbryo[®] - 24h	3,80 (4/105)	54,28 ^{ab} (57/105)	13,33 (14/105)	1,90 (2/105)	1,90 (2/105)
BotuEmbryo[®] - 48h	5,90 (7/117)	76,06 ^a (89/117)	12,38 (13/117)	8,57 (9/117)	0,95 (1/119)

^{A,B} Valores indicados por diferentes letras na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

^{a,b} Valores indicados por diferentes letras na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

* Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 50% de SFB.

Tabela 2. Valores da média (\pm DP) de blastocistos bovinos viáveis às 0h, 6h e 48h de cultivo, em incubadora de CO₂, dos grupos controle* e refrigerados em Meio 199 e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas.**

Os valores entre parênteses representam o número de blastocistos viáveis / número total de blastocistos em cada grupo experimental.

Grupo	Blastocistos viáveis (%)		
	Cultivo		
	0h	6h	48h
Controle	100 \pm 0 ^{Aa} (73/73)	100 \pm 0 ^{Aa} (73/73)	100 \pm 0 ^a (73/73)
Meio 199 – 24h	100 \pm 0 ^{Aa} (95/95)	73,91 \pm 14,67 ^{Bab} (73/95)	73,02 \pm 27,31 ^{ab} (69/95)
Meio 199 – 48h	98,43 \pm 1,82 ^{Aa} (105/106)	54,81 \pm 22,96 ^{Bb} (64/106)	35,53 \pm 6,59 ^b (37/106)
BotuEmbryo[®] – 24h	95,65 \pm 7,53 ^{Aa} (70/73)	91,81 \pm 7,14 ^{Aa} (67/73)	80,09 \pm 6,66 ^{ab} (58/73)
BotuEmbryo[®] – 48h	94,17 \pm 7,26 ^{Aa} (83/88)	72,66 \pm 4,52 ^{Bab} (64/88)	56,67 \pm 20,28 ^{ab} (50/88)

^{A,B} Valores indicados por diferentes letras na mesma linha diferem entre si (P<0,05).

^{a,b} Valores indicados por diferentes letras na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

* Blastocistos cultivados em meio SOFaa, sem período de refrigeração.

** Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 50% de SFB.

Tabela 3. Porcentagem de reexpansão e eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* dos grupos controle* e refrigerados em Meio 199 e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas.**

Os valores entre parênteses representam o número de blastocistos que reexpandiram e eclodiram, às 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente, em relação ao total de blastocistos em cada grupo experimental.

Grupo	Reexpansão (%)	Eclosão (%)
Controle	39,65 ± 11,50 (12/29)	77,52 ± 17,05 ^a (22/29)
Meio 199 – 24h	34,52 ± 6,63 (11/31)	50,79 ± 31,37 ^{ab} (14/31)
Meio 199 – 48h	26,19 ± 2,06 (8/31)	7,54 ± 7,18 ^b (2/31)
BotuEmbryo[®] – 24h	61,18 ± 13,83 (18/30)	33,98 ± 21,85 ^{ab} (10/30)
BotuEmbryo[®] – 48h	29,30 ± 21,87 (9/29)	22,98 ± 5,58 ^b (7/29)

^{a,b} Valores indicados por diferentes letras na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

* Blastocistos cultivados em meio SOFaa, sem período de refrigeração.

** Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 50% de SFB.

Tabela 4. Número total de células e porcentagem de células apoptóticas em embriões bovinos dos grupos controle* e refrigerados em Meio 199 e BotuEmbryo[®], por 24 e 48 horas.**

Grupo	N	Número total de células	Apoptose (%)
Controle	31	133,66 ± 2,52	5,33 ± 1,53 ^b
Meio 199 – 24h	30	128,95 ± 2,08	8,00 ± 2,00 ^{ab}
Meio 199 – 48h	28	127,00 ± 3,61	11,00 ± 1,73 ^{ab}
BotuEmbryo[®] – 24h	30	130,00 ± 8,00	5,00 ± 2,00 ^b
BotuEmbryo[®] – 48h	28	132,00 ± 3,00	12,00 ± 2,65 ^a

^{a,b} Valores indicados por diferentes letras na mesma coluna diferem entre si (P<0,05).

* Blastocistos cultivados em meio SOFaa, sem período de refrigeração.

** Meio 199 acrescido de 25 mM de HEPES e 50% de SFB.

Capítulo 3

CONCLUSÕES GERAIS

1. O meio e o tempo de refrigeração não tiveram efeito negativo sobre a qualidade embrionária (viabilidade) às 0 h de cultivo.

2. Às 6 h de cultivo, a porcentagem de blastocistos viáveis foi inferior no Meio 199 - 48h do que nos grupos controle e BotuEmbryo[®] - 24h.

3. Às 48 h de cultivo, não houve diferença significativa entre os meios, independentemente, do tempo de refrigeração, sendo que o grupo controle foi melhor que o grupo Meio 199-48h.

4. Não houve diferença na taxa de reexpansão entre os grupos controle e refrigerados.

5. Os grupos Meio 199-48h e BotuEmbryo[®]-48h apresentaram significativamente menores taxas de eclosão em comparação com o grupo controle.

6. Não houve diferença entre o número total de células entre os grupos controle e refrigerados, porém embriões refrigerados no meio BotuEmbryo[®]-48h apresentaram maior taxa de células apoptóticas do que os grupos controle e BotuEmbryo[®]-24h.

7. Não foi observada influencia negativa nem do meio, nem do tempo de refrigeração sobre a expressão dos genes HSPA1A, SLC2A1, PRDX1 e SOD1.

CONCLUSÃO FINAL

De modo geral, nenhum efeito potencial adverso do meio e do tempo de refrigeração foi observado sobre a viabilidade, taxa de reexpansão, número de células apoptóticas e expressão gênica de blastocistos bovinos, contudo, o M199-48h apresentou menor índice de embriões viáveis às 48 horas. Assim, sugere-se

o uso da refrigeração como método de preservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, bem como a utilização do meio BotuEmbryo[®], por ser um meio disponível comercialmente, não requerendo equipamentos e manipulação laboratorial.

Anexos

Anexo 1: Normas para publicação na *Reproduction, Fertility and Development*

ISSN: 1031-3613

(<http://www.publish.csiro.au/media/client/RDnta.pdf>)

Reproduction, Fertility and Development is an international journal for the publication of original work, review and comment in the fields of reproductive biology, reproductive technologies and developmental biology. Subject areas include, but are not limited to: physiology, biochemistry, cell and molecular biology, endocrinology, genetics and epigenetics, behaviour, immunology and the development of reproductive technologies in humans, livestock and wildlife, and in pest management. *Reproduction, Fertility and Development* is the official journal of the International Embryo Transfer Society and the Society for Reproductive Biology.

Submission of a paper implies that the results reported have not been published and are not being considered for publication elsewhere. Abstracts from conferences would not normally be regarded as publications, but where material has been widely disseminated in report form the Editor should be consulted. The journal assumes that all authors of a multi-authored paper agree to its submission. The journal will use its best endeavours to ensure that work published is that of the named authors except where acknowledged and, through its reviewing procedures, that any published results and conclusions are consistent with the primary data. It takes no responsibility for fraud or inaccuracy on the part of the authors. All papers are refereed to international standards. Authors may suggest the names of suitable referees.

Scope

Reproduction, Fertility and Development publishes original and significant contributions to the fields of reproduction and developmental biology in humans, domestic animals and wildlife. Papers are encouraged on the scientific aspects of:

- reproductive technologies and cloning
- genetics in reproduction
- gametogenesis
- fertilisation
- early embryonic development
- fetal physiology and maternal–fetal interactions
- maternal reproductive physiology including lactation
- andrology
- reproductive endocrinology, immunology and cell biology
- reproductive behavior

Critical feature articles that adequately summarise work in a particular area of these fields and indicate fruitful lines of research are also welcomed, as are viewpoint articles, reviews, short communications and comments on published papers. Comments should be confined to the substance of the paper; the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond.

Submission of manuscripts

Please submit your manuscript using our Online Submission and Peer Review system OSPREY (<http://publish.csiro.au/osprey>), which can be reached directly through this link or from the icon on the Journal's homepage. Choose *Reproduction, Fertility and Development* from the drop-down list and, if a first time user, log in via the New User box, or use your existing username and password to log in. Choose „Submit manuscript“ from the menu on the left side of the screen and then follow the steps, providing the information requested under each step.

A covering letter must accompany the submission and should include the name, address, fax and telephone numbers, and email address of the corresponding author. The letter should also contain a statement justifying why the work should be considered for publication in the Journal, and that the manuscript has not been published or simultaneously submitted for publication elsewhere. Suggestions of possible referees are welcome. A completed

Licence to Publish form (which you will be asked to download from the website as part of the submission process) should be faxed or mailed to the Journal as soon as possible after submission.

Format of manuscripts

Papers must be typed with double- or 1.5-line spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Line numbers should be included. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those carrying references, tables and figure captions, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence, *and each must be referred to in the text*. Figures that are of the same quality as those to be reproduced in the published paper must be included at the end of the electronic file or submitted as separate electronic files in correct order and must be clearly named and numbered (e.g. Smith et al_Fig1).

Authors are advised to note the style of headings, tables and illustrations exemplified in the latest issues of the Journal. Strict observance of these and the requirements listed under „Preparation of manuscripts“ will shorten the interval between submission and publication. Poorly prepared or unnecessarily lengthy manuscripts have less prospect of being accepted. Poor quality figures will be returned for correction and will delay acceptance.

Rapid and short communications

The Journal publishes preliminary communications of results that are of special significance or of current and extreme interest. Such papers should yield no more than four pages when printed, including illustrations, tables and references, and should conform with every aspect of the Notice to Authors. An article submitted as a Rapid Communication will be subject to accelerated, but very strict, refereeing and additional assessment by a member of the Editorial Board. The article should be accompanied by a statement explaining why it merits urgent publication.

Review articles

The Journal welcomes review articles and they should be submitted in the same way as research papers. They should be formatted as simply as possible, using no more than three levels of heading and normal or body text style for the main text. Summary diagrams should be used where possible to reduce the amount of description required to introduce a topic. Authors should remember the wide readership of the Journal when preparing their article, and are advised to discuss the review with the Editor or a member of the Editorial Board before submission.

Submission of cover images

Reproduction, Fertility and Development welcomes the submission of suitably eye-catching and high quality images for consideration for the cover of the Journal. Image files must be at least 300 dpi at 150–180mm wide for maximum quality reproduction. If your paper is accepted, please submit (as Accessory Material) any figures/photographic images that you consider suitable for a cover image, with your production files.

Preparation of manuscripts

General presentation. The work should be presented clearly and concisely in English. The title should reflect the key points of interest in the paper. The names and addresses of all authors should be presented on the first page, together with the full postal address and email address (or fax number) of the corresponding author. Authors of multi-authored papers may wish to assign relative values to their contributions to the work or to indicate that two or more authors contributed equally to the paper. This can be done in a note at the end of the address field on the paper. The introduction should indicate the reason for the work and include essential background references.

Human and animal experimentation. Papers reporting work with humans or animals must include a reference to the code of practice adopted for the

experimentation. It is expected that reported experiments have been performed according to appropriate ethical and legal standards, and that relevant licences have been obtained. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

Title. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern searching techniques. Additional keywords not already contained in the title or abstract may be listed beneath the abstract. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letter spaces should also be supplied.

Abstract. The abstract should be fewer than 200 words and should state concisely the scope of the work and give the principal findings. It should be complete enough for direct use by abstracting services. Acronyms and references should be avoided.

References. In the text, references are cited chronologically by author and date and are not numbered. Names of two coauthors are linked by „and“; for three or more coauthors; the first author's name is followed by „*et al.*“. All references cited must be listed alphabetically at the end of the paper; all entries in this list must correspond to references in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references and authors are requested to check these with special care. Titles must be included for all references as well as first and last page numbers. Papers that have not been accepted for publication may not be included in the list of references and must be cited either as „unpubl. data“ or as a „pers. comm.“; the use of such citations is discouraged. It is the authors' responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication. Titles of periodicals must be abbreviated. Abbreviations should conform to those given in the latest edition of „Serial Sources for the BIOSIS Data Base“ (Bio-Sciences Information Service, Philadelphia, PA). References should be in the following formats:

Chapter in a book

Calderon, I., and Healy, D. (1993). Endocrinology of IVF. In „Handbook of *in vitro* Fertilization“. (Eds A. O. Trounson and D. K. Gardner.) pp. 1–16. (CRC Press: Boca Raton, FL.)

Journal article

Cohen, J., Malter, H., Elsner, C., Kort, H., Massey, J., and Mayer, M. P. (1990). Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil. Steril.* **54**, 662–665.

Whole book

Cohen, J., Malter, H. E., Talansky, B. E., and Grifo, J. (1992a). „Micromanipulation of Human Gametes and Embryos.“ (Raven Press: NewYork.)

Conference proceedings

Hayman, P.T., and Collett, I. J. (1996). Estimating soilwater: to kick, to stick, to core or computer? In „Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference, Toowoomba“. (Ed. M. Asghar.) pp. 664–672. (Australian Society of Agronomy: Toowoomba.)

Units. Authors are requested to use the International System of Units (Système International d'Unités) for exact measurements of physical quantities and, where appropriate, elsewhere. Concentrations should be expressed in molar terms where appropriate. The double solidus must not be used in complex groupings of units; the negative index form is preferred.

Mathematical formulae. These should be carefully typed with symbols in correct alignment and adequately spaced. Equations should not be embedded images; use equation editors that result in an editable format. Each formula should be displayed on a single line if possible.

Enzyme nomenclature. The names of enzymes should conform to the recommendations in „Enzyme Nomenclature 1992“ (Academic Press: San Diego,

CA, 1992). Where enzymes are referred to only in the course of discussion, or are obtained from commercial sources and are used solely as a reagent, it will be adequate to use the recommended name without the identifying EC number. For enzymes that are more central to the paper, the recommended names should be used throughout and they should be identified by their EC numbers, at the first mention in body of the paper. If there is good reason to use a name, other than the recommended name, at the first mention of the alternative name in the text, it should be identified by the recommended name and EC number. The Editor should be advised of the reasons for using the alternative name.

Chemical nomenclature. The nomenclature of compounds such as amino acids, carbohydrates, lipids, steroids, vitamins, etc. should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Other biologically active compounds, such as metabolic inhibitors, buffers, etc. should be referred to once by their correct chemical name (which is in accordance with IUPAC rules of Chemical Nomenclature) and then by their most widely accepted common name. Where there is no common name, trade names or letter abbreviations of the chemical may be used.

Hormone assays. The validation of biological and binding assays and the statistical treatment of results should conform to the recommendations as set out in the *Journal of Endocrinology*, 1977, 72, 1–4. In particular, the minimum detectable amount of standard in the assay and the procedure for obtaining this calculated value should be given as also should an assessment of intra- and inter-assay precision. If only a few observations are available the dispersion is better indicated by the range. If the distribution is particularly skewed it may be justifiable to give both the standard deviation and the range. No test establishes absolute specificity; this lack of specificity is a particular problem with peptide hormones where reference to more rigorous physicochemical procedures such as GLC–mass spectrometry is not possible. Activity of fractions obtained by column separation should therefore be included whenever possible as this

provides a useful index of possible heterogeneity. Whenever practicable the tests used should be repeated for each novel physiological or pathological situation.

Statistical evaluation of results. The tests used should be described briefly and, if necessary, supported by references. Numbers of individuals, mean values and measures of variability should be stated. It should be made clear whether the standard deviation or the standard error of the mean has been given.

Tables

Tables must be numbered with arabic numerals and each must be accompanied by a title. A headnote containing material relevant to the whole table should start on a new line, as it will be set in a different font. Tables should be arranged with regard to the dimensions of the printed page (17.5 by 22.5 cm in two 8.5-cm columns) and the number of table columns kept to a minimum. Excessive subdivision of column headings is undesirable and long headings should be avoided by the use of explanatory notes, which should be incorporated into the headnote. The first letter only of headings to rows and vertical columns should be capitalised. The symbol for the unit of measurement should be placed in parentheses beneath the column heading. Prefixes for units should be chosen to avoid an excessive number of digits in the body of the table or scaling factors in the headings. When scaling factors cannot be avoided, the quantity expressed should be the power of 10 by which the value has been multiplied. Footnotes should be kept to a minimum and be reserved for specific items in columns. Horizontal rules should be inserted only above and below column headings and at the foot of the table. Vertical rules must not be used. Each table must be referred to in the text. Only in exceptional circumstances will the presentation of essentially the same data in both tabular and graphical form be permitted; where adequate, the graphical form should be used. Short tables can frequently be incorporated into the text as a sentence or as a brief untitled tabulation.

Line drawings and graphs Line illustrations prepared using either a draw or chart/graph program should be saved in the following formats: Adobe Illustrator (.ai) (preferred format); encapsulated postscript (.eps); or Excel (.xls). Illustrations created using Powerpoint should be saved in PowerPoint or as Windows metafiles (.wmf); CorelDraw files should be saved as .eps or .ai files; charts created on a Macintosh computer should be saved as .eps, .ps or PICT files; SigmaPlot files should be saved in .eps format (postscript printer driver required). In all cases they

should be editable vector graphic files. Avoid using 3D surface area charts because print quality is often poor. Remove colours from all charts and graphs.

Lettering should be in „sans-serif“ type (Helvetica is preferred) with only the first letter of the first word and of any proper names capitalised. The x-height after reduction should be 1.3–1.7mm (or 8–10 point in Helvetica). Thus for the reduction of graphs to 30, 40 or 50% of original linear dimensions, the initial x-height of lettering would be 5, 4 or 3mm (c. 30, 22 and 18 pt) respectively. Proportionately smaller sizes of type, symbols, grid marks and curve thickness should be used for lesser reductions. Symbols and grid marks should be the same respective sizes and, after reduction, curves and axes should not exceed 1.5 point in thickness unless required for clarity. Lines should not be thinner than 0.5 pt, or they may drop out during printing. The following symbols are readily available and should be used: ■□●○▲▼▶◀△◇. The symbols + or × should be avoided in figures.

Explanations of symbols should be given in the caption to the figure. Lettering of graphs should be kept to a minimum as excessive lettering within the frame of a graph makes the lines difficult to decipher. Grid marks should point inwards; legends to axes should state the quantity being measured and be followed by the appropriate units in parentheses. Unsatisfactory artwork will be returned for correction. The Editor may be consulted for further guidance.

Photographs

Digital images should be prepared and photographs scanned at a resolution of at least 300 dpi at final size and saved in greyscale format as .tif or Photoshop (.psd) files. It is preferable for labels to be applied electronically to the scanned

images in Photoshop, rather than scanning manually labeled figures. Electronic files of colour figures or photographs should be saved in CMYK colour not in RGB colour, because the CMYK format is required for printing. Authors should note that colours change when converted to CMYK from RGB and when printed from different types of printer; hence, when colour accuracy is important, authors should provide a hard copy that is correct so that colour reproduction during printing can be matched to an accurate original. Note that the journal does not cover the cost of printing colour pages, so please contact the Editor if you wish to publish photographs in colour.

In multi-part figures, images should be arranged in multiple panels on the page so that their dimensions do not exceed 17.5 by 22.5 cm (double column) when printed. Part labels should be lowercase in italic font and enclosed by parentheses. Each image should exclude features not relevant to the paper and be separated from adjacent images by uniform spaces that will be 1–2mm wide after reduction. A scale bar must be included on all micrographs except scanning electron micrographs where the magnification can be given in the caption. Lettering should be in „sans-serif“ type (Helvetica is preferred) that contrasts with its background and should be 1.5 to 2mm (10–12 pt) high when printed. Important features to which attention has been drawn in the text should be indicated.

Electronic files for accepted manuscripts

Electronic files of the final versions of both the text and illustrations should be sent when the paper has been accepted for publication. You will be asked to submit production files via OSPREY. Files should be named using the paper number and appropriate identifying information (e.g. RD08001_finaltext; RD07001_Fig1). The text, tables and figure captions should be sent as a single Word file. If you are unable to supply files in Word, please contact the Editorial Office (publishing.rfd@csiro.au) for acceptable alternatives. The figures should be provided in the formats described above.

Page proofs and corrections

Page proofs are sent to the corresponding author for checking prior to publication. At this stage only essential alterations and correction of printer errors may be undertaken. Excessive author alterations may be charged back to the author at \$5 per item.

Reprints

A free PDF reprint will be supplied to the author on publication of the article. Hard copy reprints may also be ordered before publication using the publication charges form, which is sent to the corresponding author with the page proofs.

Address for submission enquiries:

Editor

Reproduction, Fertility and Development

CSIRO Publishing

PO Box 1139

Collingwood, VIC 3066

Australia

Email: publishing.rfd@csiro.au