

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FONTES DE
MACROMOLÉCULAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS E SEUS REFLEXOS NA CRIOPRESERVAÇÃO**

Marina Ragagnin de Lima

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

fevereiro de 2011

I

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FONTES DE
MACROMOLÉCULAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS E SEUS REFLEXOS NA CRIOPRESERVAÇÃO**

Marina Ragagnin de Lima

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA RAGAGNIN DE LIMA – nascida em Caçapava do Sul – RS, aos 27 dias do mês de março de 1983; concluiu o ensino médio na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Graus Nossa Senhora da Assunção, na cidade de Caçapava do Sul, em dezembro de 2000; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Passo Fundo – UPF, em março de 2003, sendo bolsista de iniciação científica Pibic-UPF durante dois anos; realizou estágio curricular de graduação na Washington State University durante quatro meses em 2007, concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em fevereiro de 2008; ingressou, em março de 2009, no curso de pós-graduação, em nível de Mestrado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Mestrado do CNPQ.

EPIGRAFE

Senti um nó na garganta,
Quando saí da querência,
Tantas memórias recuerdo,
Que a alma velha acalanta,
E passam despercebidos,
Só se fazendo presentes,
Quando a saudade maleva,
No peito sente a distância.
(Guilherme Collares / Zulmar Benitez)

“Quem tem consciência para ter coragem,
quem tem a força de saber que existe,
e no centro da própria engrenagem,
inventa a contra mola que resiste,
quem não vacila mesmo derrotado,
quem já perdido nunca desespera,
e envolto em tempestade, decepado,
entre os dentes segura a primavera...”

(João Ricardo/João Apolinário)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, **Roseline Ragagnin de Lima e Erú Gabriel Dias de Lima.**

Mãe, pela dedicação, amor, paciência e carinho, dando-me firmeza e apoio nas horas mais difíceis, sempre um exemplo pessoal e profissional para mim.

Pai, pelos ensinamentos de organização, decisão e responsabilidade, contigo aprendi a prever as coisas antes que meus próprios olhos possam enxergar.

Pelo amor incondicional que me dedicam sempre presentes em minha vida, educando-me e acreditando na realização dos meus sonhos desde quando guriazinha aos quatro anos de idade que vestida à camisa branca (do pai) e abraçada à maletinha preta (de instrumentais da mãe) dizia que seria “dotora vitrinária”.

Vocês são os maiores incentivadores para que eu fizesse dos meus anseios, conquistas.

AGRADECIMENTOS

E a eterna gratidão a todos os que de alguma forma contribuíram na realização deste projeto e na minha evolução durante esta jornada. Peço desculpas se, ao citar o nome de cada um, a minha memória falhar.

Obrigada **Deus, Jesus e Anjos de Guarda** pelas oportunidades que tive e por sempre estarem me guiando e protegendo.

À minha **família**: pela dedicação, amor, paciência e carinho.

Aos meus **pais**, sou grata, pelo amparo e amor incondicional, aos ensinamentos da importância de ter equilíbrio, força e coragem para buscar meus ideais, sempre serão o porto seguro em minha vida.

Ao professor orientador **Joaquim Mansano Garcia**, pelo exemplo de mestre sábio e dedicado, pela confiança, amparo, oportunidade e ensinamentos transmitidos durante esse período. Ao amigo, pelo incentivo, companheirismo, zelo, força, compreensão e paciência (infinita).

Aos professores do departamento de reprodução animal, em especial **Professor Paulo Henrique Franceschini** pela oportunidade do primeiro contato como o departamento como estagiária extracurricular.

Aos funcionários, **Edson de Aguiar, Ivo Luiz de Almeida Jr, Isabel Aparecida Penariol Natarelli e Roberta Vantini** pela amizade e auxílio. A ti, Rô, serei eternamente grata pela tua dedicação a me ajudar em todos os momentos necessários.

Meus colegas e ex-colegas de pós-graduação: **Aline da Costa Lúcio, Ana Paula Perini, Mabel Cordeiro, Carla Damatto, Danillas Slinet de Melo, Fábio Morato Monteiro, Guilherme Fazan Rossi, Letícia Zoccolaro de Oliveira, Luciana Padilha, Marcela Maria de Souza, Marcelo Bezerra, Marcos Brandão Dias Ferreira, Maria Emília Franco Oliveira, Maria Helena Cruz, Pedro e Paulo Maia Teixeira, Tatiane Almeida Drummond Tezner.**

Verônica Gonzales Cadavid, querida amiga, por todos os momentos de fibra, alegria e companheirismo.

Naiara Zoccal Saraiva, pelo exemplo de pesquisadora dedicada e ética, pelo coleguismo e sabedoria sempre a me auxiliar nos esclarecimentos das dúvidas, e principalmente pela amizade serena, forte e sincera a me amparar nos momentos delicados.

Clara Slade de Oliveira, pela tranqüilidade transmitida, coleguismo e muitas idéias geniais, pelo amparo principalmente na reta final da dissertação.

Maite Del Collado Barrondo, a esta amiga e colega sou grata por nunca hesitar em atender todos os meus pedidos de ajuda com alegria, empenho e extrema responsabilidade.

À **Bianca Facchio**, pela amizade, dedicação e auxílio nas rotinas laboratoriais.

A todos estagiários, especialmente **Bruna e Mariana** pelo interesse e grande auxílio.

Ao **CNPQ** pelo suporte financeiro.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP**, em especial, ao **Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal** e à **Pós-graduação**, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	4
2.2. Fontes protéicas e macromoléculas utilizadas na PIV de embriões bovinos...	6
2.3. Agentes delipidantes na PIV de embriões bovinos.....	12
2.4. Criopreservação de embriões.....	14
2.4.1. Agentes crioprotetores.....	16
2.4.2 Vitrificação de embriões.....	18
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Local dos experimentos.....	23
4.2. Aspiração folicular.....	23
4.3. Busca, seleção e classificação dos oócitos.....	23
4.4. Maturação <i>in vitro</i>	24
4.5. Fecundação <i>in vitro</i>	25
4.6. Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	26
4.7. Criopreservação dos embriões.....	26
4.8. Reaquecimento dos embriões.....	27
4.9. Delineamento experimental.....	29
4.10. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30

5.1. Efeitos da fonte protéica da maturação sobre as taxas de clivagem, produção e sobrevivência embrionária pós vitrificação.....	30
5.2. Efeitos da fonte protéica no cultivo de desenvolvimento sobre a taxa de clivagem, produção e sobrevivência embrionária pós vitrificação.....	35
5.3. Efeitos das fontes protéicas utilizadas na maturação sobre os diferentes grupos de cultivo embrionário.....	40
5.4. Efeitos das fontes protéicas utilizadas no cultivo de desenvolvimento embrionário sobre a maturação oocitária.....	51
6. CONCLUSÕES.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> utilizando SFB, BSA, FE e associações no meio de maturação independentemente do cultivo de desenvolvimento.....	33
Tabela 2: Porcentagem de embriões bovinos eclodidos após 24 e 48 horas de reaquecimento, produzidos <i>in vitro</i> utilizando SFB, BSA, FE e associações no meio de maturação.....	34
Tabela 3: Produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> utilizando BSA e associações com SFB e FE no meio de desenvolvimento.....	37
Tabela 4: Porcentagem de embriões bovinos eclodidos após 24 e 48 horas de reaquecidos, produzidos <i>in vitro</i> utilizando BSA e associações com SFB e FE no meio de desenvolvimento.....	38
Tabela 5: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA.....	41
Tabela 6: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA.....	41
Tabela 7: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+SFB.....	42
Tabela 8: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+SFB.....	43
Tabela 9: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+FE.....	44

Tabela 10: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+FE.....	45
Tabela 11: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+SFB+FE.....	46
Tabela 12: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+SFB+FE.....	47
Tabela 13: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	52
Tabela 14: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	52
Tabela 15: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	53
Tabela 16: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	53
Tabela 17: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	54
Tabela 18: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	55
Tabela 19: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+SFB e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	56

Tabela 20: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+SFB e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	56
Tabela 21: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	57
Tabela 22: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	57
Tabela 23: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	58
Tabela 24: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	58
Tabela 25: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+SFB+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.....	59
Tabela 26: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+SFB+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.....	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Etapas da vitrificação de embriões bovinos.....	27
Figura 2: Etapas do reaquecimento e retirada de crioprotetores dos embriões bovinos vitrificados.....	28
Figura 3: Representação dos tratamentos utilizados na maturação dos oócitos e no cultivo de desenvolvimento embrionário.....	29
Figura 4: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> utilizando BSA, SFB, FE e associações no cultivo de maturação.....	33
Figura 5: Taxas de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas, dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> utilizando BSA, SFB, FE e associações no cultivo de maturação.....	34
Figura 6: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> utilizando BSA e associação com SFB e FE no cultivo de desenvolvimento embrionário.....	38
Figura 7: Taxas de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas, de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> utilizando BSA e associação com SFB e FE no cultivo de desenvolvimento embrionário.....	39
Figura 8: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos <i>in vitro</i> utilizando como fontes protéicas BSA ou SFB ou FE isoladamente ou em associação no cultivo de maturação dos oócitos e no cultivo de desenvolvimento embrionário.....	49
Figura 9: Taxa de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas, de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> utilizando BSA ou SFB ou FE e associações no meio de maturação e no meio de cultivo de desenvolvimento embrionário.....	50

- Figura 10:** Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando SFB ou BSA ou FE e suas associações como fonte protéica no cultivo de maturação e do desenvolvimento embrionário..... 61
- Figura 11:** Taxas de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando SFB ou BSA ou FE e suas associações como fonte protéica no cultivo de maturação e do desenvolvimento embrionário..... 62

ABREVIATURAS

aa - Aminoácidos
ATP - Adenosina trifosfato
Bi - Blastocisto inicial
Bl - Blastocisto
BSA - Albumina sérica bovina
Bx - Blastocisto expandido
°C - Grau celsius (centígrado)
CIV - Cultivo *in vitro*
CLA - Ácido linoléico conjugado
CO₂ - Dióxido de carbono
dL - Decilitro
Dr - Doutor
EGF - Fator de crescimento epidermal
FE - Fluido embriônico
FIV - Fertilização *in vitro*
FSH - Hormônio folículo estimulante
G - Gauge
g – Força centrífuga
h - horas
hCG - Gonadotrofina coriônica humana
ITS - Insulina, transferrina, selênio
KSR - Knockout Serum Replacement
LH - Hormônio luteinizante
M - Molar
mg - Miligramas
min - Minutos
MIV - Maturação *in vitro*
mL - Mililitro

mm - Milímetro
mM - Milimolar
N₂ - Nitrogênio
OPU - Punção folicular guiada por ultra-som
O₂ - Oxigênio
PBS - Tampão salina fosfato
pH - Concentração do íon hidrogênio
PHE - Penicilina, hipotaurina, epinefrina
PIV - Produção *in vitro*
PVA - Polivinil Álcool
PVP - Polivinil Pirrolidona
rpm - Rotações por minuto
SFB - Soro fetal bovino
SOF - Fluido sintético de oviduto
SSS - Substituto sintético de soro
TAG - Triacilglicerois
TCM - 199 – “Tissue culture médium 199”
UI - Unidades internacionais
μ - Micro
μg - Micrograma
μl - Microlitro
μM - Micromolar
/ - Por
% - Porcentagem
 χ^2 - Qui-quadrado
= - Igual
< - Menor
> - Maior

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE FONTES DE MACROMOLÉCULAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS E SEUS REFLEXOS NA CRIOPRESERVAÇÃO

RESUMO – Dentre as biotecnologias aplicadas à reprodução animal, atualmente um dos maiores desafios é a criopreservação de embriões PIV. Esses embriões apresentam alta criosensibilidade, devido principalmente a excessiva deposição lipídica no citoplasma, e que por sua vez está relacionada com a utilização de SFB nos meios. Neste trabalho foram avaliados os efeitos da suplementação protéica com BSA, SFB e FE e suas associações na PIV de embriões bovinos durante as etapas de MIV e CIV, visando melhorar sua criotolerância. Na MIV foram utilizadas sete diferentes combinações (SFB, BSA, FE, BSA+SFB, BSA+FE, SFB+FE e BSA+SFB+FE), e no CIV quatro tratamentos (BSA, BSA+SFB, BSA+FE e BSA+SFB+FE). Os embriões em estádios de BI e Bx foram vitrificados e após seu reaquecimento foram avaliadas as taxas de eclosão embrionária em 24 e 48 horas. Dos oócitos colocados em maturação, obteve-se um total de 85,4% de clivagem e 35,52% de produção embrionária. Ao analisar os efeitos da fonte protéica na MIV notou-se que o grupo tratado com BSA apresentou as piores taxas de clivagem (80,96%) ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos, o melhor resultado de produção embrionária foi obtido com BSA+SFB (46,69%) e os melhores índices de eclosão embrionária pós reaquecimento foram nos tratamentos BSA+FE (44,35%), SFB+FE (44,90%) e BSA+SFB+FE (42,48%). Quando se avaliou os efeitos de fonte protéica na CIV, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto a clivagem, o BSA apresentou o pior desempenho na produção de embriões (31,88%) ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos que não diferiram entre si, e os melhores índices de eclosão embrionária 24 e 48h pós reaquecimento foram obtidos com o tratamento BSA+FE (37,64% e 51,34%, respectivamente).

Palavras-Chave:

Macromoléculas, Maturação, Desenvolvimento, Embrião, Criopreservação, Bovino

COMPARATIVE STUDY ON SOURCES OF MACROMOLECULES DURING IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS AND ITS CONSEQUENCES IN CRYOPRESERVATION

ABSTRACT – Among the biotechnology applied to animal reproduction, nowadays one of the biggest challenges is the cryopreservation of embryos produced in vitro. These embryos have a high cryosensitivity, mainly due to excessive fat deposition in the cytoplasm, which in turn is related with the FCS used in the mediums for embryo production in vitro. The aim of this study was to evaluate the effects of protein supplementation with BSA, FBS and FE, and their associations in IVP bovine embryos during the stages of IVM and IVC, to improve their cryotolerance. For IVM were used seven different combinations (FCS, BSA, FE, BSA + FCS, BSA + FE, FE and FBS + BSA + FCS + FS), and four treatments during IVC (BSA, BSA + FCS, BSA + FE, BSA+ FE+ FCS). Embryos in stage of B1 and Bx were vitrified and after their reheating the rates of hatched blastocysts at 24 and 48 hours were evaluated. Of the oocytes placed into maturation, we obtained 85.4% of cleavage and 35.52% of embryo produced. When were evaluated the effects of protein source in IVM was noted that the BSA-treated group showed the worst rates of cleavage (80.96%) ($p < 0.05$) compared to other groups, the best result of embryo production was obtained with FCS + BSA (46.69%) and the highest rates of hatched blastocysts after rewarming were obtained with FE + BSA (44.90%), FE + FCS (44.35%) and FS + FCS + BSA (42.48%). When we assessed the effects of protein source in the IVC, there was no significant difference between treatments for the cleavage, the BSA group had the worst performance in the production of embryos (31.88%) ($p < 0.05$) compared to other groups that not differ, and the highest hatched blastocysts in 24 and 48 hours after rewarming were obtained by treating BSA + FE (37.64% and 51.34%, respectively).

Keywords:

Macromolecules, Maturation, Development, Embryo, Cryopreservation, Bovine

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira possui um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), representado por mais de 200 (duzentos) milhões de cabeças. De acordo com os dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) o Brasil está classificado como o primeiro país em volume de embriões produzidos *in vitro* (THIBIER, 2006).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta importante no aproveitamento do potencial reprodutivo destes rebanhos, diminuindo o intervalo entre as gerações e acelerando o melhoramento genético animal (PEGORARO, 1997), possibilitando a ampliação da vida reprodutiva de animais de alto valor genético devido à utilização dos oócitos de fêmeas imaturas, idosas, prenhes, ou mesmo com infertilidade adquirida devido a patologias no trato reprodutivo (GONÇALVES, et al., 2007).

Nos atuais sistemas comerciais de produção *in vitro* de embriões, um dos maiores entraves é a obtenção e sincronização das receptoras, as quais devem ser proporcionais ao número de embriões produzidos. Uma solução para este problema seria a utilização das técnicas de criopreservação destes embriões excedentes. A evolução da criopreservação de embriões bovinos propicia também uma série de outros benefícios, tais como: utilização de receptoras em cio natural, planejamento do período de nascimento dos bezerros de acordo com os interesses de manejo da propriedade, a formação de bancos de germoplasma (com preservação de espécies ou raças em extinção), e principalmente facilitar a comercialização de embriões (importação e exportação).

Assim, a criopreservação de embriões tem se tornado parte integrante da reprodução assistida em animais, especialmente de espécies domésticas (LEIBO et al., 1996; PALASZ e MAPLETOFT, 1996; KULESHOVA e LOPATA, 2002).

No entanto, sabe-se que embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis à criopreservação que os produzidos *in vivo* (POLLARD e LEIBO, 1994), sendo assim um desafio a produção *in vitro* de embriões bovinos aptos a criopreservação, bem como, a obtenção de um método eficiente, prático e de baixo custo para criopreservá-los.

Na maioria das vezes embriões PIV apresentam marcantes características morfológicas e moleculares diferentes dos embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT e ELLINGTON, 1995). Um dos principais problemas é o excessivo acúmulo lipídico no citoplasma destes embriões, levando principalmente a alterações na fluidez e função da membrana plasmática (TARIN e TROUSON, 1993), o que está intimamente relacionado à alta criosensibilidade dos mesmos.

O Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina Sérica Bovina (BSA) são historicamente as fontes de proteínas mais usadas no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos (HOLM et al, 1999; GORDON, 2003).

Embora, o papel do SFB não seja ainda completamente conhecido, autores têm demonstrado seus efeitos benéficos na produção de embriões (CAROLAN et al., 1995) como fonte de substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados (PINYOPUMMINTR et al., 1994). Porém, inúmeras pesquisas relatam que a utilização de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo na PIV de embriões, na maturação oocitária e principalmente no desenvolvimento embrionário está diretamente relacionada com o aumento na deposição lipídica e conseqüentemente menor criotolerância destes embriões (FERGUSON et al., 1999; GOMÉZ et al., 2008).

Existem tentativas de algumas formulações para os meios substituindo o SFB por outras fontes de macromoléculas como BSA, Polivinil Pirrolidona (PVP), Alcool Polivinílico (PVA), Ovalbumina (ABE et al., 2002; GEORGE et al., 2008; TETZNER, 2007) o que permitiria uma composição mais definida para estes meios. Entretanto ainda é um desafio a total substituição do SFB quando se leva em consideração a taxa de embriões produzidos e a qualidade dos mesmos (DUQUE et al., 2003).

Além destas fontes de macromoléculas, também está sendo investigado como alternativa de fonte protéica na PIV de embriões os substitutos do soro. Estes

compostos, tais como o Substituto Sintético de Soro (SSS), o Knockout Serum Replacement (KSR) e o Flúido Embriônico (FE) são comercialmente produzidos (GOLDSBOROUGH et al., 1998).

Uma alternativa que está demonstrando ser eficaz na diminuição do conteúdo lipídico dos embriões PIV sem lesionar a zona pelúcida é a utilização dos agentes delipidantes como a forskolina e os ácidos linoléicos conjugados (CLA) (IMAIL et al., 1997; MEN et al., 2006). Em estudos onde se usou a adição de CLA no meio de cultivo para embriões bovinos, este, demonstrou ter um efeito positivo na redução da deposição lipídica no citoplasma destes embriões e aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós congelação (HOCHI et al., 1999; PEREIRA et al., 2008).

Além do melhoramento na qualidade dos embriões PIV destinados à criopreservação, também têm se trabalhado no aperfeiçoamento dessas técnicas na busca de melhores resultados. As pesquisas na área de criopreservação estão relacionadas principalmente ao tempo de pré-equilíbrio, tipo e concentração de crioprotetores, velocidade de resfriamento, temperatura de imersão em nitrogênio líquido, velocidade de reaquecimento e métodos de remoção dos crioprotetores (LIEBERMANN et al., 2003).

Atualmente os métodos mais utilizados para criopreservar embriões bovinos PIV são a congelação tradicional e a vitrificação. Porém, quando se compara os dois métodos a vitrificação tem demonstrado melhores resultados que a congelação lenta que apresenta as taxas de sobrevivência embrionária pós-descongelação inferiores em comparação aos produzidos *in vivo* (DINNYÉS et al., 1996; VAJTA et al., 1998; GÓMES et al., 2008). Utilizando o método de vitrificação para criopreservação dos embriões bovinos produzidos *in vitro* propõe-se no presente trabalho avaliar o uso de três diferentes fontes protéicas SFB, BSA e FE isolados ou associados na maturação oocitária e no cultivo de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* e seus efeitos na viabilidade dos mesmos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

A produção *in vitro* de embriões bovinos envolve três etapas: a maturação oocitária (MIV), a fertilização (FIV) e o cultivo embrionário (CIV).

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos tem duração de aproximadamente 24 horas, durante esse período os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: a quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003).

Considera-se que esta etapa de maturação dos oócitos seja de fundamental importância para que haja uma adequada aquisição da competência oocitária. É neste período em que estes gametas adquirem capacidade para serem fecundados, expressando o seu potencial máximo durante o desenvolvimento embrionário inicial até que ocorra a transição materno-zigótica quando o genoma embrionário é ativado (FERREIRA et al., 2009). O processo de maturação oocitária está diretamente relacionado com a taxa de blastocistos produzidos (RUSSELI et al., 2006).

Na fertilização, em geral os oócitos bovinos após a MIV são incubados com os espermatozoides por um período de 18 a 24 horas. A fecundação propriamente dita se dá quando ocorre a penetração do espermatozoide no oócito, este por sua vez retoma a meiose e completa a maturação, em seguida há a formação dos pronúcleos masculino e feminino, e a singamia restabelecendo-se o número de cromossomos (GORDON, 2003).

A terceira etapa da PIV consta no desenvolvimento ou cultivo embrionário, que ocorre após a singamia. Formam-se os novos indivíduos chamados zigotos que multiplicam suas células (blastômeros) por sucessivas divisões mitóticas. A partir desse momento ocorre a transição materno-zigótica quando há a ativação do genoma embrionário (com 8 a 16 células), compactação (mórula com 32 células), diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, e a blastulação com a formação do blastocisto (GONÇALVES, et al., 2008).

Apesar dos muitos esforços para se melhorar a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos para fins científicos e/ou comerciais, a sua eficiência ainda é relativamente baixa.

Nos sistemas habituais de PIV, 80% dos oócitos imaturos completam a metáfase II da meiose II (DOMINKO e FIRST, 1997), no entanto, só aproximadamente 40% dos oócitos fertilizados alcançam o estágio de blastocisto (WARD et al., 2002; SIRARD et al., 2006).

Embora a taxa de produção de blastocistos seja influenciada pela origem e qualidade dos oócitos utilizados na PIV, sabe-se que a qualidade dos embriões produzidos está diretamente relacionada ao cultivo embrionário (RIZOS et al., 2002a; LONERGAN 2006).

O sistema de produção *in vitro* dos embriões não apresenta a mesma eficiência que *in vivo*. Na maioria das vezes os embriões PIV apresentam marcantes características morfológicas e moleculares diferentes dos embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT e ELLINGTON, 1995).

Os embriões PIV apresentam desenvolvimento mais acelerado, diâmetro a partir da fase de blastocisto menor e geralmente anormalidades mitocondriais (CROSIER et al., 2001) como cristas periféricas e formato circular (FAIR et al., 1997), amplo espaço perivitelino, redução considerável na quantidade de microvilosidades que recobrem a membrana plasmática e redução das junções GAP, diminuindo o contato entre as células do trofoblasto (BONI et al., 1999; FAIR et al., 2001) além das diferenças metabólicas (KHURANA et al., 2000; THOMPSON, 2000). As anormalidades cromossômicas em embriões PIV também foram descritas por VIUFF et al. (1999) que

identificaram a existência de mixoploidia em 25% de embriões produzidos *in vivo* e 72% em blastocistos PIV.

Além destas, ainda relata-se o excessivo acúmulo lipídico no citoplasma destes embriões que está relacionado à reduzida criotolerância dos mesmos e conseqüentemente à baixa sobrevivência após a descongelação, principalmente quando é usado o SFB durante o cultivo destes embriões (ABD EL et al., 2000; ABE et al., 2002; POLLARD e LEIBO, 1994).

2.2. Fontes Protéicas e Macromoléculas Utilizadas na PIV de Embriões Bovinos

A suplementação do meio de cultura com fontes protéicas de origem animal tem apresentado os melhores resultados na maturação oocitária e no desenvolvimento *in vitro* de embriões (VANROOSE et al., 2001).

O Soro Fetal Bovino (SFB) e Albumina Sérica Bovina (BSA) são historicamente as fontes de proteínas mais usadas na PIV de embriões bovinos (HOLM et al., 1999; GORDON, 2003).

Mesmo que não se conheça totalmente a composição do SFB, sabe-se que este é rico em substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados (PINYOPUMMINTR et al., 1994).

Muitos autores relatam que a utilização do SFB promove o aumento nas taxas de produção embrionária (HOLM et al., 1999; GORDON, 2003; THOMPSON, 1998), porém também leva a uma redução na qualidade dos embriões pelo fato de exercer um efeito bifásico no desenvolvimento embrionário, inibindo as primeiras clivagens e acelerando o desenvolvimento da blastocela nos estágios finais do desenvolvimento embrionário, resultando na formação de embriões com menor número de células e conseqüentemente menos viáveis que os produzidos na ausência de SFB (PINYOPUMMINTR et al., 1991; LANGENDONCKT et al., 1997; GOMEZ et al., 2008).

Análises realizadas por RIZOS et al. (2002b) compararam a influência de diferentes métodos de produção embrionária e os padrões de expressão de vários genes envolvidos em importantes processos de desenvolvimento embrionário, como os relacionados à apoptose, formação das junções intercelulares e diferenciação. Blastocistos provenientes de oócitos MIV/ FIV e cultivados *in vitro* em fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com soro fetal bovino (SFB) apresentaram, dentre outras diferenças, elevado índice de transcrições para apoptose e reduzida expressão para formação de junções intercelulares; já quando se utilizou cultivo *in vivo*, em oviduto ovino o padrão de expressão gênica assemelhou-se a embriões produzidos totalmente *in vivo*.

Um dos principais problemas da sua utilização na PIV é a deposição excessiva de lipídios no citoplasma dos embriões (ABE et al., 1999; CROSIER et al., 2001), levando principalmente a alterações na fluidez e função da membrana plasmática (TARIN e TROUSON, 1993), o que está intimamente relacionado à alta criosensibilidade, baixa densidade e ao aspecto escurecido dos mesmos (LEIBO et al., 1993).

Normalmente os lipídios serviriam como fonte de energia sendo substrato para a formação de ATP pelas mitocôndrias durante o desenvolvimento embrionário. O problema é que nesse caso há um desequilíbrio entre a quantidade de lipídio acumulado e mitocôndrias funcionais (CROSIER et al., 2001), que em muitos casos apresentam características de imaturidade como cristas periféricas e formato circular (FAIR et al., 1997).

Os mecanismos desse acúmulo lipídico no citoplasma de embriões PIV em meios contendo SFB ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que estes embriões podem facilmente incorporar ácidos graxos, fosfolipídios e triacilgliceróis (TAG) presentes no SFB do meio de cultivo, e que a maior parte dos lipídios encontrados nos oócitos e embriões são realmente os triacilgliceróis derivados de triglicerídeos contidos nas lipoproteínas séricas (ABE et al., 2004, DIEZ et al., 2001). Enquanto os TAG são os mais sintetizados e estocados, representando 40-50% do total de lipídeos em embriões bovinos produzidos *in vivo*, nos embriões PIV pode-se chegar até 88% (FERGUSSON e

LEESE, 1999). Os mesmos autores relataram que a concentração de TAG nos embriões produzidos *in vivo* permanece estável desde o estágio de duas células até blastocisto, enquanto que em embriões PIV as reservas de TAG podem dobrar desde o estágio de quatro células até blastocisto quando expostos ao meio contendo 10% de SFB.

ABE et al. (2002) demonstraram através de análises ultra-estruturais e técnicas de histoquímica que embriões cultivados em meio livre de SFB apresentaram gotas lipídicas menores que 2 μm , enquanto que no meio contendo SFB foram de aproximadamente 2 à 6 μm de diâmetro.

Além disso, ainda existem relatos de que o SFB está correlacionado com outros fatores indesejáveis como as alterações na expressão gênica de oócitos maturados e embriões pré-implantação (RZUCIDLO et al., 2001; WRENZYCKI et al., 1999) anormalidades morfológicas nos embriões (ABE et al., 1999), alterações fenotípicas observadas durante a gestação e no recém-nascido, como o desenvolvimento da “síndrome do bezerro grande” (large offspring syndrome) em animais domésticos (YOUNG et al., 1998; MCEVOY, 2003), e ainda pode ser uma fonte de componentes patogênicos nos sistemas de cultivo (HAN e NIWA, 2003).

Contudo, apesar de o SFB demonstrar ser uma boa fonte protéica, apresentando bons resultados na maturação oocitária e taxa de blastocistos produzidos, existem evidências de que o seu uso cause efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento embrionário e fetal e por essa razão investiga-se a possibilidade de reduzir ou substituir totalmente o SFB em algumas fases da PIV.

Alguns estudos têm demonstrado eficiência na substituição do SFB pelo BSA durante as etapas de MIV e/ou CIV, na produção de embriões mais viáveis à criopreservação (ABE et al., 2002; KRISHER et al., 1999; RIZOS et al., 2003).

O BSA por sua vez, além de possuir quelantes de metais pesados também atua no equilíbrio de pH (MEHTA & KIESSLING, 1990) e possui propriedade surfactante que previne adesão de células em superfícies plásticas e de vidro (PINYOPUMINTR e BAVISTER, 1991).

Sabe-se que uma das principais funções do BSA *in vivo* é atuar como transportador de nutrientes (JOHANSON, 1981), porém na PIV este papel ainda não está bem claro, possivelmente seja como fonte de aminoácidos e substratos para o metabolismo embrionário (ORSI e LEESE, 2004).

Na FIV a presença do BSA demonstrou ser de fundamental importância, auxiliando nos processos de capacitação espermática e fecundação (VISCONTI et al., 1995), mas esses mecanismos ainda não estão bem compreendidos.

No entanto, quando se utilizou separadamente SFB ou BSA durante a MIV, o grupo do SFB apresentou melhores resultados na taxa de maturação nuclear e expansão das células do *cumulus* nos oócitos, taxa de expansão e eclosão dos blastocistos, maior massa celular interna e número total de células nos embriões. No entanto, tanto os oócitos após a MIV quanto os embriões produzidos com SFB apresentaram aspecto escurecido (indicando acúmulo lipídico) em relação aos grupos onde foi utilizado o BSA (RUSSELI et al., 2006).

LEIVAS e seus colaboradores (2010) também demonstram a associação de SFB e BSA, no SOF durante o CIV como sendo benéfica tanto na taxa de embriões produzidos quanto na qualidade embrionária, ao contrário de quando foi usado somente o BSA como fonte protéica.

Uma alternativa para produzir embriões aptos à criopreservação em meios livres de SFB que tem demonstrado eficiência é a associação entre BSA e ITS (GEORGE et al., 2008). O ITS é um composto comercialmente fabricado que reúne insulina, transferrina e selênio.

A insulina exerce atividades mitogênica e anti-apoptose em embriões bovinos (AUGUSTIN et al., 2003). Além disso, já foi demonstrado que pode diminuir o acúmulo de lipídio no citoplasma de embriões de ratos, o que poderia melhorar a sua tolerância à criopreservação (TSUJII et al., 2002). A transferrina atua como uma proteína de ligação do ferro para o transporte até as células e também como uma proteína de desintoxicação através da remoção de metais a partir do meio. Selênio previne o dano oxidativo ao atuar na regulação da atividade da glutathiona peroxidase, estimulando sua síntese (BARNES et al., 1980).

Todavia, pelo fato de tanto o SFB quanto o BSA não terem a sua composição totalmente definida e de existir uma variação significativa entre remessas e fornecedores (MCKIERNAN et al., 1992), há uma variabilidade muito grande nos meios do sistema de cultivo e seus resultados, o que torna impossível saber realmente quais são as necessidades nutricionais dos embriões PIV.

Devido à necessidade de se conhecer cada vez mais as exigências nutricionais dos oócitos e embriões durante a PIV e às possíveis contaminações por patógenos carregados pelo SFB e BSA, torna-se indispensável buscar suas substituições por macromoléculas e/ou fontes protéicas quimicamente definidas (HASLER, 2003; STRINGFELLOW et al., 2004). GANDI et al. (2000) descreveram que oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* em meio definido podem atingir o estágio de blastocisto.

As macromoléculas definidas mais utilizadas em reprodução assistida atualmente são a Polivinil Pirrolidona (PVP) e a Polivinil Álcool (PVA).

O PVA e PVP têm sido aplicados na reprodução assistida principalmente durante a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), pois promovem um aumento na viscosidade da solução de espermatozoides, facilitando a manipulação e a imobilização dos mesmos (KATO e NAGAO, 2009).

Foi verificado que espermatozoides ao serem expostos a PVP têm apresentado alterações submicroscópicas na sua estrutura, o núcleo destes parece estar danificado tanto na forma como na textura da cromatina, que freqüentemente encontra-se descondensada (STREHLER, et al., 1998). Estes mesmos autores sugeriram que o PVP leve a um atraso no início das oscilações do cálcio e na descondensação do espermatozóide no oócito.

KATO e NAGAO (2009) demonstraram resultados satisfatórios quanto à reação de acrossoma e taxa de fertilização ao usarem 10% de PVP no preparo de espermatozoides para ICSI, porém relataram a supressão no desenvolvimento embrionário desde o estágio de duas células até blastocisto.

Alguns autores relatam que com a utilização do PVA na maturação oocitária pode-se obter taxas de maturação equivalente a meios suplementados com SFB (UTO

e YAMAHAMA, 1996), no entanto durante a FIV ao ser usado como substituto do BSA retarda a formação dos pronúcleos (ECKERT e NIEMANN, 1995).

LIM et al. (2007) testaram a eficiência do PVA ao BSA, e SFB durante o desenvolvimento embrionário. Ao usar PVA as taxas de formação de blastocisto apresentaram-se nitidamente inferiores em relação aos grupos BSA e SFB, no entanto quando foi acrescido Myo-inositol ao PVA esse índice se elevou. Também foi demonstrado ser benéfica a associação de PVA, Myo-inositol, fosfato (1,2mM) e EGF (10ng/ml) aumentando a taxa de produção de blastocisto, e apresentando índices satisfatórios de prenhes e terneiros nascidos.

Além destas fontes de macromoléculas, também estão sendo estudados como alternativa de fonte protéica na PIV de embriões os substitutos do soro, sendo os mais comumente investigados atualmente o Substituto Sintético de Soro (SSS), o Knockout Serum Replacement (KSR) e o Flúido Embrionário (FE).

Estes compostos são comercialmente produzidos (GOLDSBOROUGH et al., 1998). Seu uso foi primeiramente testado no cultivo de células-tronco embrionárias provenientes da massa celular interna de blastocistos, permitindo a proliferação destas células e assim demonstrando capacidade de suprir as necessidades e proporcionar um adequado desenvolvimento embrionário (MOORE et al., 2007).

Na PIV de embriões, os substitutos já têm sido extensivamente testados no cultivo de embriões humanos, alguns demonstraram benefícios sobre soro para produção de blastocistos e as taxas de gravidez (WEATHERSBEE, et al., 1995; BEN-YOSEF, et al., 2001). Entretanto, de uma forma geral a utilização desses suplementos na PIV de embriões bovinos têm sido menos comum e seus resultados ainda se mostram variáveis (SAGIRKAYA et al., 2007), havendo assim a necessidade de ampliar as investigações sobre o uso dessas fontes protéicas alternativas ao SFB nas etapas de maturação oocitária e cultivo embrionário.

MOORE e seus colaboradores (2007) demonstram os efeitos da utilização de KSR versus SFB durante o cultivo de maturação e desenvolvimento de embriões bovinos. Foi verificado que os oocitos maturados no KSR apresentaram reduzida expansão das células do *cumulus oophorus*, apesar disso na taxa de fertilização não

houve diferença significativa entre os grupos, no entanto o grupo do SFB apresentou maior taxa na produção de blastocistos. Ao usar KSR ou SFB a partir do terceiro dia de cultivo embrionário não houve diferença significativa entre a produção embrionária, no entanto após serem criopreservados e reaquecidos os blastocistos produzidos com KSR demonstraram maiores índices de reexpansão e eclosão embrionária.

O SSS ao ser associado com EGF demonstrou ser eficiente como suplemento protéico na maturação de oócitos bovinos. Contudo, o seu uso durante o desenvolvimento embrionário provocou maiores índices de apoptose (SAGIRKAYA et al., 2007).

TETZNER et al. (2010) ao testarem os efeitos do KSR ou FE como alternativa ao SFB durante a maturação oocitária observaram que o grupo suplementado com FE se assemelhou ao controle (SFB) na maturação nuclear e produção embrionária, no entanto os três grupos foram equivalentes na maturação citoplasmática, clivagem e taxa de eclosão embrionária.

De qualquer forma, a total substituição do SFB na PIV de embriões bovinos ainda é um grande desafio, visto que de uma maneira geral os meios suplementados com esta fonte protéica ainda são os que apresentam as melhores taxas de produção embrionária (DUQUE et al., 2003).

2.3. Agentes Delipidantes na PIV de Embriões Bovinos

Além da substituição do SFB por fontes de macromoléculas e/ou protéicas de composição definida há outros métodos que já foram testados na tentativa de diminuir o conteúdo lipídico, visando uma melhora na criotolerância dos embriões PIV.

Os métodos mecânicos como a centrifugação, micromanipulação e aplicação de laser na zona pelúcida dos embriões tiveram êxito na retirada das gotas de lipídios localizados no citoplasma dos embriões (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001; PRYOR et al., 2010), porém quando se trata da produção e criopreservação de embriões em larga escala essas técnicas se tornam inviáveis e que comercialmente não

seria permitido por serem técnicas invasivas, onde ocorre lesões de zona pelúcida destes embriões.

Uma alternativa que está demonstrando ser eficaz na diminuição do conteúdo lipídico dos embriões PIV sem lesionar a zona pelúcida é a utilização dos agentes delipidantes ou lipolíticos como a forskolina e os ácidos linoléicos conjugados (CLA) (IMAIL et al., 1997; MEN et al., 2006). O mecanismo pelo qual esses agentes lipolíticos podem influenciar na criotolerância dos embriões PIV é através da redução parcial das gotas de lipídios intracelulares, pela estimulação da lipólise (MORIMOTO et al., 2001).

Os CLA também podem ser conhecidos como ácidos ruminóicos, pois são um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (octadecadienoico) produzido a partir da biohidrogenação bacteriana no rúmen (KEPPLER et al., 1966, HUR et al., 2007). Diversos trabalhos têm salientado os efeitos biológicos e fisiológicos do uso de CLA, suas propriedades antioxidantes (HUR et al., 2004), anticarcinogênicas (IP et al., 1994), antiteratogênicas (NICOLOSI et al., 1997), imunomoduladora (COOK et al., 1993) e também sua capacidade de atuar na redução de gordura em modelos animais (DUGAN et al., 1997; PARK et al., 1997).

Foi relatado que o uso dos isômeros *cis-9*; *trans-11*(*c-9*; *t-11*) e *trans-10*; *cis-12* (*t-10*; *c-12*) em murinos promoveu uma redução do acúmulo lipídico, diminuindo a “massa” corporal gordurosa desses animais (PARK et al., 1999; BROWN et al., 2001). Em vacas leiteiras que ingeriram CLA houve uma redução na síntese de gorduras no leite (BAUNGARD et al., 2002), e em galinhas foi o responsável pela diminuição do colesterol contido na gema dos ovos (HUR et al., 2003). Mais especificamente, foi demonstrado que os CLA tem a capacidade de inibir a expressão de mRNA de genes envolvidos na lipogênese durante a diferenciação dos adipócitos (GRANLUND et al., 2003).

Na PIV de embriões bovinos ao adicionar CLA no meio de cultivo, houve um efeito positivo na redução da deposição lipídica no citoplasma destes embriões e aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós criopreservação (IMAIL et al., 1997; HOCHI et al., 1999; PEREIRA et al., 2004).

PEREIRA et al. (2008) relatam que mesmo quando o SFB foi utilizado nos meios de cultivo embrionário, com a adição de CLA se obteve uma redução na deposição de lipídios intracitoplasmáticos e houve melhora na criotolerância dos embriões.

2.4. Criopreservação de Embriões

A criopreservação embrionária tem como principal objetivo possibilitar o armazenamento de material genético, garantindo a manutenção da sua viabilidade por período de tempo indeterminado (WHITTINGHAM, 1980; MAZUR, 1984), este armazenamento se dá em baixas temperaturas (em nitrogênio líquido à -196°C) as quais permitem manter o metabolismo celular em estado de quiescência até que seja reaquecido.

A criopreservação de embriões começou a se tornar uma realidade a partir da década de 70, mais precisamente em 1971 quando Whittingham e seus colaboradores conseguiram os primeiros produtos com a transferência de embriões de camundongos criopreservados. No entanto em bovinos há relatos de criopreservação embrionária a partir de 1973 (GORDON, 2003).

Atualmente com o desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões bovinos a criopreservação se tornou uma ferramenta indispensável, proporcionando uma série de vantagens, tais como a armazenagem dos embriões produzidos *in vitro* excedentes ao número de receptoras sincronizadas para a transferência, utilização de receptoras em cio natural, planejamento da transferência dos embriões de acordo com o período de nascimento dos bezerros conforme o manejo da propriedade, a formação de bancos de germoplasma (com preservação de espécies ou raças em extinção), e principalmente facilitar a comercialização (importação e exportação) dos embriões.

Apesar da criopreservação de embriões ser uma técnica estudada há aproximadamente quatro décadas e de ter avançado muito, ainda segue sendo um desafio estabelecer um método eficaz, prático e de baixo custo para criopreservar os embriões produzidos *in vitro* (POLLARD e LEIBO, 1994). Inúmeros estudos relatam alta

sensibilidade e a baixa sobrevivência dos embriões PIV em relação aos produzidos *in vivo* (MARTÍNEZ et al, 2002). Segundo VIANA e CAMARGO (2007), a baixa taxa de prenhes pós descongelação é a principal justificativa para somente 3,7% do total de embriões PIV no Brasil serem criopreservados.

As duas metodologias mais utilizadas para criopreservar embriões bovinos são a congelação tradicional e a vitrificação. No entanto, ultimamente na criopreservação de embriões PIV a vitrificação vem sendo mais estudada na busca de aprimorar os resultados obtidos com a congelação, pois quando se compara os dois métodos a vitrificação tem demonstrado melhores resultados nas taxas de sobrevivência embrionária pós-descongelação (DINNYÉS et al., 1996; GÓMES et al., 2008). Provavelmente a principal causa seja em função do excessivo tempo de exposição à faixa térmica (entre 20 e 10⁰C) correspondente à fase de solidificação dos lipídios (ZENON et al., 1999, GORDON, 2003) durante a congelação, e na vitrificação a alta velocidade de resfriamento e aquecimento proporcionam uma passagem muito rápida por essa faixa crítica de temperatura.

Um dos mais importantes princípios da criobiologia é a remoção da água intracelular antes de iniciar o processo de congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formam lesando severamente a estrutura celular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria aos embriões (GONÇALVES et al., 2008). Essa remoção da água intracelular é realizada através dos crioprotetores que desidratam as células pela diferença de osmolaridade (GORDON, 2003).

Assim como os cristais de gelo intra e extracelulares podem lesionar membranas e organelas celulares durante o resfriamento dos embriões, outras crioinjúrias como a toxicidade química pelos crioprotetores e lesão osmótica pela desidratação inadequada também podem ocorrer ao longo do procedimento de criopreservação (KASAI et al., 2002). Havendo assim, a necessidade de buscar o equilíbrio entre a velocidade na curva de congelação e o tempo de exposição aos crioprotetores, dessa maneira ocorre uma adequada desidratação prevenindo a formação de cristais de gelo e ao mesmo

tempo minimizando o efeito tóxico pela demasiada exposição aos crioprotetores (CAMPOS-CHILLON et al., 2006).

Segundo VAJTA e KUWAYAMA, (2006) as crioinjrias, bem como as diferenças na sobrevivência e as taxas de desenvolvimento embrionário pós reaquecimento podem ser altamente variáveis, dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e da origem dos embriões criopreservados (*in vivo* ou derivados produzidos *in vitro*).

As diferenças morfológicas entre embriões taurinos e zebuinos são demonstradas por VISINTIN e seus colaboradores (2002) que relataram a existência de uma maior quantidade de lipídios intracelular nos embriões *Bos taurus taurus* obtidos *in vivo*. No entanto, embriões *Bos taurus taurus* oriundos de produção *in vitro*, apresentaram maiores taxas de reexpansão e eclosão quando comparados aos embriões *Bos taurus indicus*, criopreservados pelos métodos convencional de congelação e vitrificação (VARAGO, 2006; VIEIRA et al., 2006).

Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, a fase de blastocisto é preferencial para a criopreservação de embriões bovinos. Dois são os principais fatores: a maior proporção nucleo-citoplasma e o maior numero de células, neste caso se houver lesão em alguma célula ainda assim há recuperação embrionária (MENEZO, 2004). Ao vitrificar blastocistos em diferentes fases de desenvolvimento VAJTA et al. (1996) verificaram que blastocistos e blastocistos expandidos apresentam melhores taxas de eclosão do que blastocistos iniciais.

LIEBERMANN e seus colaboradores (2003) relataram que as pesquisas mais recentes na área de criopreservação estão relacionadas principalmente ao tempo de exposição e concentração dos crioprotetores, velocidade de resfriamento e reaquecimento, temperatura de imersão em nitrogênio líquido.

2.4.1 Agentes crioprotetores

Os crioprotetores são de fundamental importância no processo de criopreservação, independente da metodologia adotada (congelação ou vitrificação),

pois são eles os responsáveis pela desidratação das células. Estes solutos são classificados conforme a sua capacidade de penetrar ou não nas células, por isso a denominação de intracelulares e extracelulares.

Os crioprotetores intracelulares, são moléculas pequenas que penetram facilmente na membrana das células. Devido as suas propriedades coligativas e ligantes agem formando pontes de hidrogenio com as moléculas de água intracelular, diminuindo o ponto crioscópico, prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular (PEREIRA e MARQUES, 2008). Desta classe, os crioprotetores mais utilizados são glicerol (GLI), etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), propilenoglicol (PRO), metanol e etanol.

Historicamente, no princípio o glicerol era o crioprotetor de eleição na congelação de embriões (CAMPOS-CHILLON et al., 2006), no entanto com o aumento significativo da produção *in vitro* de embriões bovinos e a expansão da técnica de vitrificação onde são necessárias concentrações muito elevadas de crioprotetores, o etilenoglicol que apresenta características vantajosas como baixa toxicidade e alto potencial de permeabilidade, passou a ser mais utilizado nos procedimentos de criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (MASSIP, 2001; MOORE e BONILLA, 2006).

Sabe-se que ao utilizar concentrações muito altas de crioprotetores os riscos de ocorrer injurias tóxicas são muito maiores, porém esses riscos podem ser minimizados quando os embriões são expostos aos crioprotetores durante curtos períodos e em baixas temperaturas, como é o caso da vitrificação. Outra estratégia que também é adotada são as associações entre crioprotetores com diferentes características de permeabilidade, como foi demonstrado que o etilenoglicol quando usado em associação com dimetilsulfoxido ou propilenoglicol, apresenta melhores taxas de eclosão embrionária pós reaquecimento (MANJUNATHA et al., 2009).

VIEIRA et al. (2007) ao vitrificarem embriões bovinos relataram que houve uma maior taxa de eclosão embrionaria quando utilizou-se 20% EG + 20% DMSO em comparação com 40% EG + 0,1% PVA + 17,1% sacarose. Ao compararem a eficiência da associação de EG com DMSO, PRO ou GLI, na vitrificação de embriões bovinos

produzidos *in vitro*, WERLICH e seus colaboradores (2006) também obtiveram melhores resultados de eclosão com o grupo EG+DMSO.

Os crioprotetores não permeáveis, também chamados de açúcares são divididos em três categorias: os monossacarídeos (glicose, frutose, sorbitol, manitol), dissacarídeos (sacarose, trealose) e os polissacarídeos (rafinose) (DATTENA et al., 2004; CAMPOS-CHILLON et al., 2006).

Os crioprotetores extracelulares são de fundamental importância, e seu mecanismo de ação é basicamente através do controle da osmolaridade extracelular. Durante a criopreservação promovem o aumento na osmolaridade do meio extracelular, dessa maneira há uma potencialização dos crioprotetores intracelulares e conseqüentemente os embriões sofrem desidratação (KASAI e MUKAIDA, 2004). Após o reaquecimento, é necessário realizar a retirada dos crioprotetores que estão dentro dos embriões e promover a reidratação dos mesmos, neste caso o meio extracelular é hipotônico em relação ao meio intracelular, os açúcares adicionados ao meio extracelular funcionam como tampão osmótico regulando a velocidade na entrada da água e saída dos crioprotetores dos embriões. Dos crioprotetores extracelulares a sacarose tem apresentado excelentes resultados, principalmente no reaquecimento onde os embriões passam por soluções em gradiente de osmolaridade decrescentes, permitindo um controle ainda maior na reidratação (GONÇALVES et al., 2008).

2.4.2 Vitrificação de embriões

Embora que os primeiros relatos de utilização da metodologia de vitrificação na criopreservação de embriões murinos datem de 1985 pelos pesquisadores Rall e Fahy, há relatos de que a teoria de vitrificação seja estudada desde 1898, pelo físico Tammann (GONÇALVES et al., 2008; GORDON, 2003). A partir do momento em que foi divulgado o nascimento dos embriões de camundongos a vitrificação passou a ser amplamente estudada, sendo considerada atualmente a técnica mais apropriada na criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (VAJTA et al., 1998) demonstrando

melhores resultados (em relação ao método tradicional de congelação) nas taxas de sobrevivência embrionária pós-descongelação (DINNYÉS et al., 1996; GÓMES et al., 2008).

O princípio da criopreservação através da vitrificação tem como principal característica a solidificação de líquidos em estado amorfo (vítreo), mantendo suas propriedades químicas e mecânicas, sem que haja a formação de cristais de gelo (MASSIP, 2001). Esse fenômeno se dá através de uma breve exposição dos embriões às altas concentrações de crioprotetores que por sua vez, desidratam os embriões e causam um aumento na viscosidade intra e extracelular, combinado a uma taxa de resfriamento muito rápida (aproximadamente de 15.000 à 30.000⁰C/min.) pela imersão em nitrogênio (LIEBERMANN ET AL., 2003; VAJTA, 2000).

Sabe-se que as altas concentrações dos crioprotetores utilizados podem causar injúrias tóxicas e osmóticas aos embriões. Duas são as alternativas sugeridas para minimizar esses efeitos indesejáveis: aumentar ainda mais a velocidade de resfriamento e reaquecimento (VAJTA et al., 1998), e usar associações de crioprotetores menos tóxicos e mais permeável com diferentes características de permeabilidade (VAJTA, 2000; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

A constatação de que o aumento na velocidade de resfriamento melhora os resultados da vitrificação, levou ao desenvolvimento de algumas alternativas tais como: a vitrificação em superfície sólida que consiste numa superfície metálica superresfriada em contato com nitrogênio líquido onde são depositadas as gotas de solução de vitrificação contendo os embriões (DINNYÉS et al., 2000), e o outro método é através da eliminação do efeito de isolamento térmico produzido pelo vapor do nitrogênio através do super-resfriamento do nitrogênio através de vácuo (ARAV et al., 2000). Entretanto, essas técnicas são de aplicação mais trabalhosa, ou honerosa.

Dessa forma surgiram novas tecnologias de vitrificação, chamadas de metodologias abertas que visam reduzir o volume de solução crioprotetora usada tradicionalmente na palheta de 0,25 mL, aumentando assim a velocidade de vitrificação dos embriões. Essas metodologias diferem principalmente pelo uso de diferentes suportes para acondicionamento dos embriões, tais como: a *Open Pulled Straw* (OPS)

(VAJTA et al., 1997), as grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996), as micropipetas de vidro (KONG et al., 2000), os *cryoloops* (LANE et al. 1999), *crytops* (KUWAYAMA e KATO, 2000) e *cryotips* (KUWAYAMA et al, 2005).

Ao comparar algumas dessas metodologias KUWAYAMA (2007) relatou que a velocidade de vitrificação em palheta de 0,25mL com 25µL de solução de vitrificação mergulhada em nitrogênio líquido foi de 4.460^oC/min., em OPS com 1,5µL de solução foi de 16.340^oC/min. e em *cryotop* com 0,1µL de solução foi de 22.800^oC/min.

Das metodologias mencionadas, atualmente a técnica de vitrificação utilizando o *cryotop* está em plena expansão, principalmente na criopreservação de oócitos e embriões humanos onde já foram demonstrados ótimos resultados. KUWAYAMA e seus colaboradores (2005) obtiveram taxas de 100% na sobrevivência embrionária pós reaquecimento de zigotos humanos vitrificados (em estágio de pronúcleo), com clivagem de 93% e 52% de produção de blastocistos, no entanto quando foram utilizados blastocistos para vitrificação a taxa de sobrevivência embrionária foi de 90%, com o diagnóstico clínico de 53% de gravidez e 45% de crianças nascidas.

Além dos humanos também foi demonstrado o êxito na vitrificação com *cryotop* em animais domésticos e exóticos, como por exemplo: oócitos de equínos ovinos, bovinos, bubalinos e cetáceos, e embriões de leporinos, bovinos, bubalinos e suínos (KUWAYAMA, 2007).

Descrita pela primeira vez por KUWAYAMA e KATO em 2000 na vitrificação de oócitos e embriões humanos, esta técnica tem como principal vantagem a utilização de volumes muito pequenos de solução crioprotetora (0,1µL).

O *cryotop* é constituído de polipropileno e consiste em uma haste estreita e fina (com 0,4 mm de largura, 20 mm de comprimento 0,1 mm de espessura) onde se deposita os embriões, acoplada a outra porção mais robusta que funciona como cabo desta haste. Para a proteção de possíveis danos mecânicos durante a armazenagem, usa-se recobrir a extremidade onde estão localizados os embriões com meia palheta de 0,5mL que funciona como uma bainha para o *cryotop*.

Na vitrificação, após a passagem pelas soluções de equilíbrio e de vitrificação contendo os crioprotetores, os embriões (ou oócitos) são colocados extremidade do

cryotop com o auxílio de um microcapilar, totalizando o volume de no máximo 0,1 µl. Logo após os embriões serem colocados na haste de vitrificação o excesso da solução crioprotetora deve ser retirado, ficando assim apenas uma fina camada que os recobre, para em seguida a amostra ser rapidamente imersa em nitrogênio líquido (com velocidade de resfriamento de até 40,000 °C/min). Posteriormente coloca-se a bainha de proteção na extremidade da haste, seguido da estocagem dos embriões em nitrogênio líquido.

No reaquecimento, a bainha de proteção é removida do *cryotop* enquanto ainda está submerso no nitrogênio líquido, a extremidade da haste contendo os embriões é imersa diretamente em solução com sacarose (a 37°C), passando por concentrações decrescentes para que haja a diluição dos crioprotetores. Após estas etapas serem concluídas os embriões ainda passam por um banho em meio de cultivo embrionário e posteriormente, são levados envasados para transferência ou recultivados em incubadora de cultivo celular.

Os crioprotetores utilizados nessa metodologia de *cryotop* podem variar de acordo com o estágio embrionário e espécie a ser trabalhada, no entanto o etilenoglicol combinado ao dimetilsulfoxido são os mais comumente usados na solução de equilíbrio em concentrações mais baixas e na solução de vitrificação em altas concentrações e associados à sacarose. Esta combinação de crioprotetores tem apresentado os melhores resultados na vitrificação de embriões e oócitos (KASAI e MUKAIDA, 2004), pois o etileno glicol possui baixo grau de toxicidade e é altamente permeável, e o DMSO por sua vez age potencializando essa permeabilidade do etilenoglicol (VICENTE e GARCIA-XIMENEZ, 1994).

A partir do surgimento do *cryotop* outros modelos semelhantes de hastes de criopreservação surgiram, como o caso das estátulas de vitrificação (vitringá) que também demonstram bons resultados de sobrevivência embrionária pós reaquecimento de blastocistos (TSANG e CHOW, 2009).

3. OBJETIVOS

Avaliar a influência de três fontes protéicas (SFB, BSA e FE) e as suas associações, na maturação dos oócitos, sobre a produção *in vitro* e viabilidade de embriões bovinos.

Avaliar a influência do BSA e sua associação com o SFB e o FE, no cultivo de desenvolvimento, sobre a produção de embriões bovinos *in vitro*.

Avaliar a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* nos diferentes sistemas de cultivo após serem submetidos ao processo de vitrificação, reaquecimento e cultivo de recuperação por 48 horas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local dos experimentos

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” durante os anos de 2009 e 2010. Os ovários destinados a aspiração folicular para obtenção dos oócitos foram adquiridos junto ao Frigorífico Barra Mansa, do Município de Sertãozinho, SP.

4.2. Aspiração folicular

Os ovários bovinos obtidos no abatedouro, logo após a coleta, eram mantidos em solução salina a aproximadamente 34⁰C por no máximo quatro horas. Após chegarem no laboratório, esses ovários eram submetidos a uma lavagem e permaneciam em solução salina aquecida (35⁰C) até o momento da aspiração.

As aspirações dos folículos antrais (com diâmetro entre 2-8mm) foram realizadas mediante pressão negativa através de seringa de 20 mL e agulha hipodérmica de calibre G20 (30mmX0,9mm) da marca BD. O fluído folicular juntamente com os oócitos aspirados eram transferidos para tubos em polipropileno de 50mL, modelo Falcon mantidos na temperatura de 35⁰C. Completado o volume de 40 mL os tubos eram deixados em repouso por 15 minutos para sedimentação do material aspirado.

4.3. Busca, seleção e classificação dos oócitos

O sedimento recuperado em cada tubo era transferido para placa de Petri de 90mm de diâmetro feita em poliestireno. A procura dos oócitos era realizada com o auxílio de um microscopioestereoscópio com luz transmitida e aumento de 40 a 80

vezes. Os oócitos revestidos ou não de células do *cumulus* eram transferidos para uma placa de poliestireno de 35mm contendo meio TCM199, suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 20 mM de hepes, 10% de SFB, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg de amicacina/mL de meio. Após a procura os oócitos eram classificados quanto ao revestimento com células do *cumulus* compacto em oócitos totalmente revestidos e parcialmente revestidos, revestimento com células do *cumulus* expandido e desprovidos de células do *cumulus*. Quanto ao aspecto do ooplasma foi avaliado a granulação e a presença de manchas claras ou escuras. Os oócitos selecionados foram classificados segundo LEIBFRIED-RUTLEDGE et al. (1987), onde:

- a) Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;
- b) Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oócito escuro e irregular;
- e) Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Foram selecionados para transporte e maturação, oócitos de *cumulus* compacto, com pelo menos, três a quatro camadas de células do *cumulus*, e ooplasma de granulação uniforme, classificados com oócitos de grau I, II e III.

4.4. Maturação *in vitro*

O meio base utilizado para a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV) foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado com 25mM de bicarbonato de sódio, 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094), 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), 2µg/mL de ITS (Sigma I-

1884), 1µg/ml de antioxidante (Sigma A-1345) e 2,5µg/ml de ácido linoleico-BSA (Sigma L-8384). Como fonte protéica na Maturação foi utilizado SFB (Cryphon®) e/ou BSA (Sigma A-8806) e/ou Flúido Embriônico FE (Sigma E-1761) de acordo com o delineamento experimental. A maturação foi completada para 24 horas em microgotas de 100uL de meio de maturação sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

4.5. Fecundação *in vitro*

Para a fecundação os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL- Sêmen e uma vez em FIV gotas para remoção da fonte protéica utilizada na maturação e parte das células do *cumulus*. Realizado o procedimento de lavagem dos oócitos de cada grupo experimental foram transferidos para gotas de 100uL de FIV gotas sob óleo mineral. Foi utilizado o sêmen de um mesmo touro para a fecundação de todos os oócitos do experimento. O sêmen era descongelado em água a 35-37⁰C por aproximadamente 20 segundos. As palhetas foram secas em gase estéril, uma das extremidades vedadas foi cortada e com o auxílio de uma haste de aço inox o lado de vedação com algodão e álcool polivinílico foi utilizado como êmbolo para liberação do sêmen em um tubo ependorff de 1,5mL contendo gradiente descontínuo de 45% 90% de Percoll. O sêmen foi submetido a uma força centrífuga de 3620g (4500rpm) por 7 minutos. O sobrenadante era removido e o sedimento resuspenso com 1mL de meio FIV gotas. Procedia-se nova sedimentação por centrifugação com uma força 1.110g (2.500rpm) durante 5 minutos. Eram coletados 30µL do sedimento e colocados em outro tubo ependorff contendo 30 µL de meio FIV gotas pré equilibrado. Amostras de 5µL de sêmen foram tomadas e diluídas em 95µL de meio FIV gotas ou água para avaliação da motilidade e concentração, respectivamente. O volume do sedimento foi então ajustado para uma concentração final de 25x10⁶ espermatozóides vivos/µL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos eram adicionados 8uL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, sêmen e oócitos foram co-incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5⁰C.

4.6. Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

Os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen, onde tiveram parte das células do cumulus removidas por sucessivas pipetagens. Logo após, eram lavados em meio de cultivo e transferidos para microgotas de 100uL de meio SOFaa suplementado de acordo com o delineamento experimental. A taxa de clivagem foi avaliada 24 horas depois dos prováveis zigotos serem colocados em cultivo. As trocas de meio (feed) eram realizadas no terceiro e quinto dia de cultivo, onde eram retirados 50ul de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50uL de meio SOFaa fresco (pré equilibrado). No sétimo dia de cultivo eram realizadas as contagens de embriões formados e as classificações quanto o estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) para posteriormente vitrificá-los.

4.7. Criopreservação dos embriões

Os embriões foram criopreservados pela técnica de vitrificação, seguindo a metodologia descrita por VAJTA et al., 1997, com algumas modificações.

Primeiramente todos os embriões do mesmo grupo de tratamento eram separados das demais estruturas, e somente foram vitrificados os blastocistos e blastocistos expandidos. Utilizou-se, no máximo, cinco embriões por vez (por haste de criopreservação). Após retirar os embriões das gotas de cultivo, esses eram lavados três vezes em meio de manutenção (SOFaa suplementado com 20% de SFB a 37⁰C). Posteriormente, os embriões eram levados para a gota (de aproximadamente 200μL) contendo meio de equilíbrio (meio de lavagem suplementado com 7,5% de EG e 7,5% de DMSO a 37⁰C) por 3 minutos. Transcorrido o tempo, os embriões eram transferidos para a solução de vitrificação (meio de lavagem suplementado com 16,5% de EG e 16,5% de DMSO a 37⁰C), após 30 segundos eram pipetados, totalizando o volume máximo de 2μL (embriões e meio de vitrificação) para a extremidade da haste de vitrificação da marca Vitringa[®] e ao se completar 40 segundos de exposição esta haste

era imediatamente imersa em nitrogênio líquido. Logo em seguida uma meia palheta de 0,5mL adaptada era resfriada também em nitrogênio e colocada como bainha protetora na haste. Os embriões foram mantidos em nitrogênio líquido até o momento do reaquecimento.

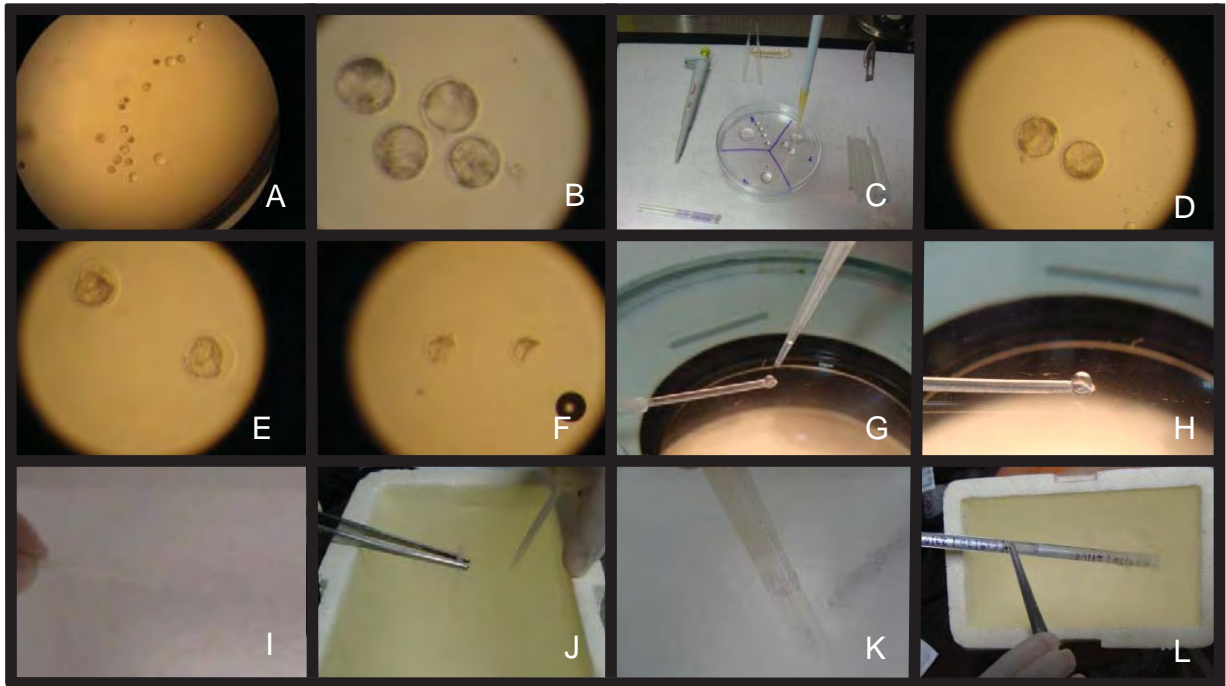


Figura 1: Etapas da vitrificação de embriões bovinos.

(A) Seleção dos embriões a serem criopreservados; (B) Blastocistos e Blastocistos expandidos selecionados para vitrificação; (C) Placa contendo as gotas com os meios de lavagem, equilíbrio e vitrificação; (D) Embriões em meio de lavagem; (E) Embriões em meio de equilíbrio; (F) Embriões em meio de vitrificação; (G) Transferência dos embriões para haste de vitrificação (vitringá); (H) Gotas de meio de criopreservação (2µL) contendo os embriões; (I) Imersão da haste de criopreservação contendo os embriões em nitrogênio líquido; (J, K) Colocação das bainhas de proteção nas hastes de criopreservação; (L) Armazenamento das hastes em raques identificadas.

4.8. Reaquecimento dos embriões

As hastes de vitrificação eram retiradas do botijão de estocagem e colocadas em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. As bainhas eram removidas e a

extremidade da vitringá contendo os embriões imersa na primeira solução de reaquecimento (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB e 1,0 M de sacarose, a 37°C) durante 1 minuto para iniciar o processo de remoção dos crioprotetores. Logo após, estes embriões eram transferidos para a segunda solução de reaquecimento (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB e 0,5 M de sacarose, a 37°C) onde permaneciam por 5 minutos. Depois eram transferidos para solução final de reaquecimento (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB) por 10 minutos. Após a diluição dos crioprotetores os embriões reaquecidos eram recultivados (nas mesmas condições do cultivo de desenvolvimento), quando então se realizavam as avaliações de reexpansão e eclosão com 24 e 48 horas de cultivo.

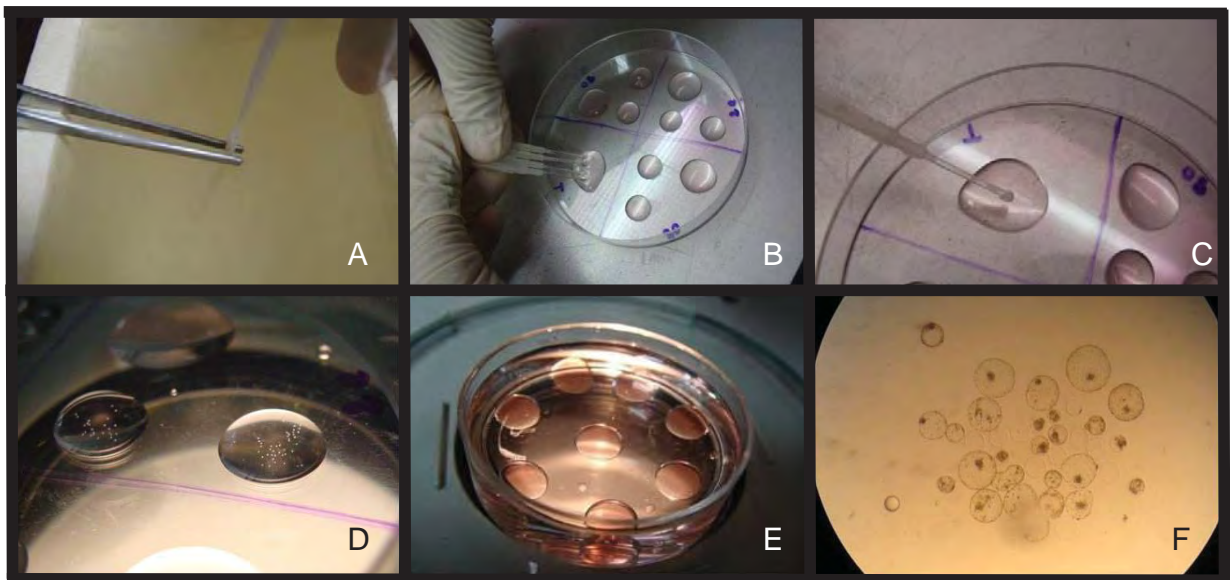


Figura 2: Etapas do reaquecimento e retirada de crioprotetores dos embriões bovinos vitrificados.

(A) Retirada das bainhas de proteção das hastes de criopreservação; (B, C e D) Passagem dos embriões pelos meios de reaquecimento em gradiente decrescente de sacarose, seguidos de solução de lavagem com 20% de SFB; (E) Re-cultivo embrionário por até 48 horas em meio SOF; (F) Embriões eclodidos, ou não após 48 horas de re-cultivo.

4.9. Delineamento experimental

No experimento avaliou-se os efeitos da suplementação protéica com BSA, SFB e FE e as associações, na maturação dos oócitos e no cultivo de desenvolvimento sobre a produção embrionária e a capacidade de eclosão dos embriões após vitrificação e cultivo por 24 e 48 horas após o reaquecimento. Foi delineado um experimento com sete tratamentos na maturação dos oócitos (SFB, BSA, FE, BSA+SFB, BSA+FE, SFB+FE e BSA+SFB+FE), e quatro tratamentos no cultivo de desenvolvimento embrionário (BSA, BSA+SFB, BSA+FE e BSA+SFB+FE), conforme figura 3.

TRATAMENTOS FONTE PROTÉICA NA MATURAÇÃO	TRATAMENTOS FONTE PROTÉICA NO DESENVOLVIMENTO
SFB (10%)	BSA (8 mg/mL)
BSA (8mg/mL)	
FE (10%)	
BSA (6 mg/mL) + SFB (2,5%)	
BSA (6mg/mL) + FE (2,5%)	
SFB (5,0%) + FE (5,0%)	
BSA (6mg/mL) + SFB (2,5%) + FE (2,5%)	
	BSA (6mg/mL) + SFB (2,5%)
	BSA (6mg/mL) + FE (2,5%)
	BSA (6mg/mL) + SFB + (2,5%) + FE (2,5%)

Figura 3: Representação esquemática dos tratamentos utilizados na maturação dos oócitos e no cultivo de desenvolvimento embrionário.

4.10. Análise estatística

Os resultados obtidos de produção de embriões foram avaliados quanto aos efeitos da suplementação protéica na maturação *in vitro*, no cultivo de desenvolvimento, na interação destes tratamentos e a taxa de eclosão com 24 e 48 horas de cultivo após vitrificação/ reaquecimento destes embriões produzidos *in vitro* foram avaliados pelo teste de χ^2

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da fonte protéica da maturação sobre as taxas de clivagem, produção e sobrevivência embrionária pós vitrificação.

Neste experimento 8.629 oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* utilizando três diferentes fontes protéicas SFB, BSA e FE isolados ou em suas associações, totalizando sete tratamentos. Submetidos a um único método de fecundação pelo sêmen de um único touro e de mesma partida de congelação. Nas três repetições foram obtidos 7.369 (85,4%) estruturas clivadas (com duas ou mais células). Entre as diferentes fontes protéicas utilizadas na maturação, o BSA apresentou a menor taxa de clivagem (80,96%) ($p < 0,05$) diferindo de todas as demais fontes protéicas SFB e FE, e associações do BSA com FE e SFB. A maturação com as três fontes protéicas (BSA+SFB+FE) proporcionou a melhor taxa de clivagem (87,84%). A taxa de clivagem reflete a qualidade da maturação e a capacidade de fecundação do sêmen utilizado. Dessa forma a associação das três fontes protéicas na maturação nos sugere que as mesmas possuem propriedades complementares que melhoram a maturação oocitária e a primeira divisão celular embrionária. O SFB e o BSA são as fontes protéicas tradicionalmente mais utilizadas, e que promovem os melhores resultados na maturação (HOLM et al., 1999; GORDON, 2003). O FE, por sua vez, é uma fonte de macromoléculas de composição não totalmente definida. É recomendada pelo fabricante para uso em cultivo celular, no entanto é ainda pouco utilizada na produção *in vitro* de embriões. Sua capacidade em promover a maturação nuclear e citoplasmática é equivalente ao SFB e foi demonstrada por TETZNER et al., 2010, mesmo quando utilizada como fonte protéica na maturação. Nossos resultados demonstraram que o FE como fonte protéica única na maturação promove taxa de clivagem melhor do que a verificada com o BSA e similar à observada no SFB e nas associações BSA+SFB, BSA+FE e SFB+FE, sendo inferior apenas à associação do BSA+SFB+FE ($p < 0,05$), onde os efeitos benéficos das três fontes utilizadas se

sobressaem e proporcionam melhor maturação e conseqüentemente maior taxa de clivagem (tabela 1).

A qualidade da maturação oocitária tem reflexos na produção de embriões (RUSSELL et al., 2006), sempre respeitando as condições do cultivo embrionário que é o fator mais importante para o desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002). Neste experimento foram utilizadas quatro diferentes combinações de fonte protéica no desenvolvimento embrionário e todas elas foram utilizadas para os sete diferentes tratamentos utilizados na maturação. Com isto procurou-se diminuir a variabilidade no desenvolvimento embrionário, o que permitiu a avaliação do comportamento de cada associação de maturação com o desenvolvimento sobre a capacidade de produção e qualidade dos embriões para a criopreservação. Foram produzidos 3.065 (35,52%) embriões entre os estádios de blastocisto inicial a blastocisto expandido até o sétimo dia de cultivo *in vitro*. Observou-se que a produção embrionária foi influenciada pela maturação oocitária ($p < 0,05$) e teve o SFB como a fonte protéica na maturação de melhor reflexo na produção embrionária. Produzindo embriões em percentuais muito próximos quando utilizado como fonte protéica única ou combinado com BSA, FE ou ambos. Resultados melhores do que quando se utilizou BSA e BSA+FE e pouco acima quando se utilizou FE, demonstrando que o SFB contém importantes fatores promotores de maturação oocitária nuclear e ou citoplasmática com reflexos no desenvolvimento embrionário. O FE também mostrou possuir fatores que podem melhorar a produção embrionária quando utilizado como única fonte protéica ou de macromoléculas na maturação (FE a 10%) (tabela 1 e figura 4).

A qualidade do oócito e da maturação reflete no desenvolvimento embrionário principalmente no desenvolvimento inicial até que ocorra a transição materno-zigótica, momento em que é ativado o genoma embrionário (FERREIRA et al., 2009). Os oócitos maturados em meio com fonte protéica de BSA, mesmo suplementado com ITS (insulina, transferrina e selênio) teve menor taxa de produção de embriões, sugerindo que o mesmo seja carente de alguns fatores que podem melhorar a qualidade da maturação *in vitro* dos oócitos bovinos.

Dos 3.065 embriões produzidos, 2.711 foram submetidos à vitrificação e 2.352 embriões vitrificados foram reaquecidos para avaliação de sobrevivência embrionária. Os resultados das taxas de eclosão dos embriões após 24 e 48 horas de cultivo de recuperação mostraram que os embriões provenientes dos oócitos maturados em SFB (35,73%) ou associado com o BSA (BSA+SFB) (33,98%) apresentaram menor ($p < 0,05$) resistência à vitrificação (tabela 2 e figura 5). Por outro lado, os melhores resultados dos efeitos da maturação sobre a criotolerância foram obtidos nos tratamentos onde se utilizou o FE em associações com o SFB (SFB+FE) (44,90%) ou o BSA (BSA+FE) (44,35%) ou os três associados (BSA+SFB+FE) (42,48%). Esta menor criotolerância quando se utiliza do SFB como fonte protéica durante a maturação foi verificada por diversos autores (ABE et al., 2002; MOORE et al., 2007) e tem sido atribuída ao menor número de células na formação dos embriões (PINYOPUMMINTR et al., 1991; GOMEZ et al. 2008), alterações no padrão de expressão de genes como os relacionados com a apoptose, formação das junções intercelulares e diferenciação (RIZOS et al., 2002b), deposição excessiva de lipídeos no citoplasma dos embriões (ABE et al., 1999; CROSIER et al., 2001) levando a alterações na fluidez e função da membrana plasmática (TARIN e TROUSON, 1993). Os lipídeos servem como fonte de energia, sendo substrato para a formação de ATP pelas mitocôndrias durante o desenvolvimento embrionário. No caso dos embriões produzidos *in vitro*, a utilização do SFB causa um desequilíbrio entre a quantidade de lipídeo acumulado e mitocôndrias funcionais (CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002).

Tabela 1: Produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando SFB, BSA, FE e associações no meio de maturação independentemente do cultivo de desenvolvimento.

Maturação	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
SFB	1383	1202 (86,91) ^{bc}	536	38,76 ^{bc}	44,59 ^{bc}
BSA	1308	1059 (80,96) ^a	365	27,91 ^a	34,47 ^a
FE	1345	1139 (84,68) ^b	477	35,46 ^b	41,88 ^b
BSA+SFB	1173	1011 (86,19) ^{bc}	472	40,24 ^c	46,69 ^c
BSA+FE	1120	951 (84,91) ^{bc}	316	28,21 ^a	33,23 ^a
SFB+FE	1128	981 (86,91) ^{bc}	427	37,85 ^{bc}	43,53 ^{bc}
BSA+SFB+FE	1172	1026 (87,84) ^c	472	40,27 ^c	46,00 ^{bc}
TOTAL	8629	7369 (85,40)	3065	35,52	41,59

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, pelo teste de χ^2 .

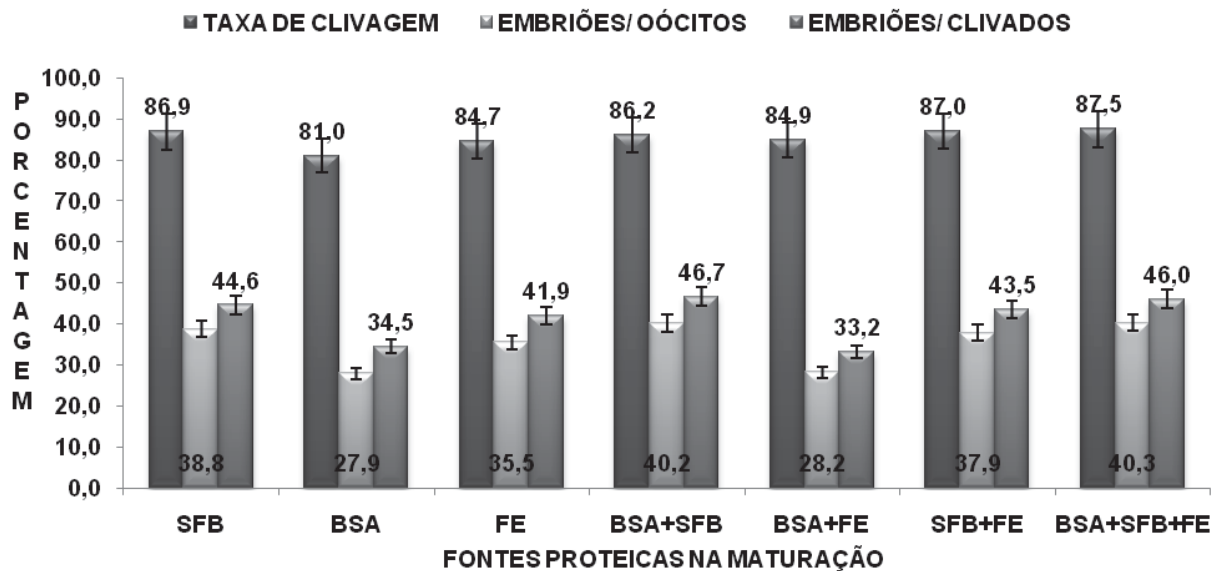


Figura 4: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando BSA, SFB, FE e associações no cultivo de maturação.

Tabela 2: Porcentagem de embriões bovinos eclodidos após 24 e 48 horas de reaquecimento, produzidos *in vitro* utilizando SFB, BSA, FE e associações no meio de maturação.

Maturação	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
SFB	486	431	98 (22,74) ^a	154 (35,73) ^a
BSA	318	271	58 (21,40) ^a	101 (37,27) ^{ab}
FE	430	376	107 (28,46) ^{bc}	149 (39,63) ^{ab}
BSA+SFB	401	362	84 (23,20) ^{ab}	123 (33,98) ^a
BSA+FE	273	230	61 (26,52) ^{abc}	102 (44,35) ^b
SFB+FE	384	343	91 (26,53) ^{abc}	154(44,90) ^b
BSA+SFB+FE	419	339	107 (31,56) ^c	144 (42,48) ^b
TOTAL	2711	2352	606 (25,77)	927 (39,41)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, pelo teste de χ^2 .

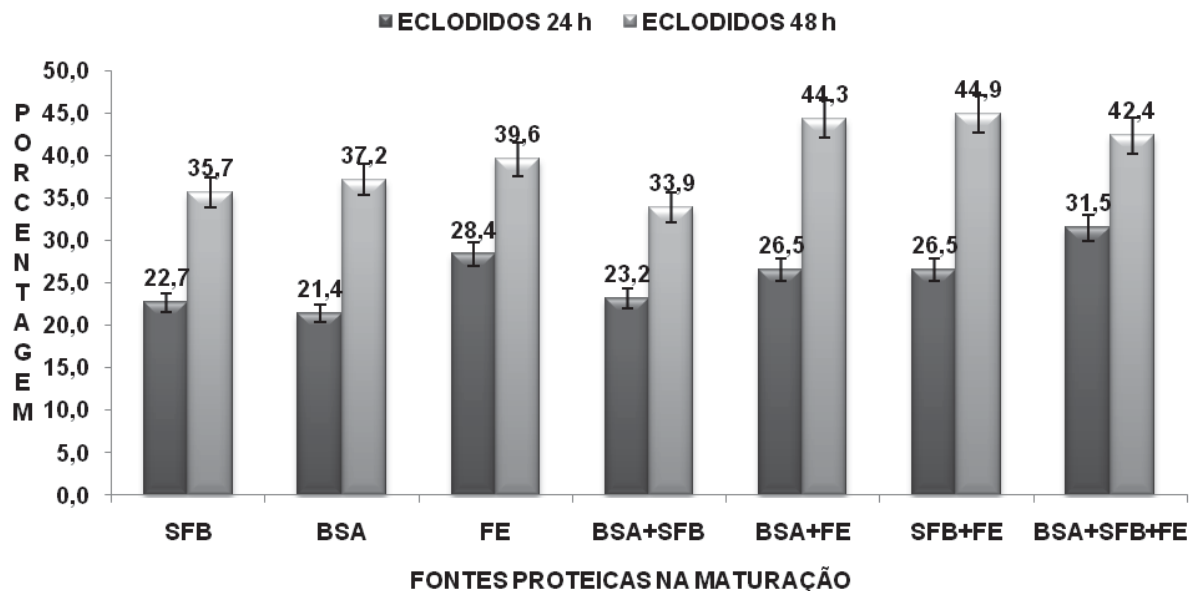


Figura 5: Taxas de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas, dos embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando BSA, SFB, FE e associações no cultivo de maturação.

5.2. Efeitos da fonte protéica no cultivo de desenvolvimento sobre a taxa de clivagem, produção e sobrevivência embrionária pós vitrificação.

Embora que a o desenvolvimento embrionário inicial esteja mais vinculado com a origem e qualidade dos oócitos utilizados na PIV, sabe-se que o cultivo de desenvolvimento embrionário está diretamente relacionado à qualidade dos embriões produzidos, isto é, com as características morfológicas, de expressão gênica, capacidade em desenvolver gestação e tolerância frente às adversidades do meio ambiente, e principalmente à criotolerância destes embriões (LONERGAN, et al., 2006; RIZOS, et al., 2002a).

Neste experimento foi utilizado o BSA associado, ou não, com o SFB e FE. Os resultados de clivagem não diferiram ($p>0,05$) entre os tratamentos (BSA; BSA+SFB; BSA+FE e BSA+SFB+FE), dessa maneira acredita-se que as primeiras divisões celulares estão mais vinculadas com a qualidade da maturação oocitária do que com o cultivo de desenvolvimento embrionário, onde a menor taxa de clivagem foi 84,09% (BSA+SFB) e a maior taxa de 86,06% (BSA).

Por outro lado, a produção de embriões *in vitro* foi influenciada pela fonte protéica do cultivo ($p<0,05$). O BSA como fonte protéica no cultivo de desenvolvimento proporcionou menor taxa de embriões (31,88%), e suas associações com outras fontes, como o SFB (44,83%), FE (43,46%) e as três associadas (45,55%) proporcionaram maior percentual de produção de embriões (tabela 3 e figura 6). Apesar do BSA ser a fonte protéica que apresentou o menor desempenho em suprir as necessidades de todo o desenvolvimento embrionário, ainda assim os resultados obtidos nesse experimento estão de acordo com a média de produção *in vitro* de embriões descrita na literatura, onde é estimada uma produção de blastocistos entre 30 e 40% a partir da taxa de clivagem (SIRARD et al., 2006).

A maior taxa de desenvolvimento embrionário nos meios de cultivo onde se utilizou de SFB e ou FE associado ao BSA, pode estar relacionado a fatores de crescimento ou estimuladores de multiplicação celular que estão presentes no SFB e FE. O SFB é a fonte de proteínas e fatores de crescimento celular mais utilizada em

cultivo celular, apesar da indefinição na composição, foi observado que a sua utilização promove uma elevação nas taxas de embriões produzidos conforme descrito por LEIVAS et al. 2010. A sua parcial ou completa substituição vem sendo objeto de estudo em pesquisas de cultivo celular ou embrionário como o Knockout SR[®] (MOORE et al.; 2007), o substituto sintético do soro (SSS) (SAGIRKAYA et al., 2007). Neste experimento a utilização da associação entre as três fontes protéicas (BSA+SFB+FE) apresentou os melhores resultados de desenvolvimento embrionário, provavelmente em virtude da combinação de fatores (não definidos) que fazem parte da sua composição e melhoram a produção dos embriões até o estágio de blastocisto expandido.

A sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação vem sendo cada vez mais utilizada como indicador de qualidade embrionária, tendo em vista que os embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características que diferem dos produzidos *in vivo*, e que conseqüentemente tornando-os mais sensíveis. Dessa forma os embriões mais resistentes aos eventos de desidratação, resfriamento, reidratação e reaquecimento seriam os de melhor qualidade (FAIR et al., 2001).

Para ser observada a influência das fontes protéicas na sobrevivência embrionária após a criopreservação, os embriões produzidos neste experimento (conforme os diferentes grupos de desenvolvimento, já descritos anteriormente) foram vitrificados no sétimo dia de desenvolvimento, reaquecidos e cultivados novamente por até 48 horas. As taxas de eclosão embrionária (tabela 4 e figura 6) foram tomadas após 24 e 48 horas de cultivo dos embriões. As menores taxas de eclosão ($p < 0,05$) em 24 e 48 horas de cultivo foram observadas nos meios onde se utilizou BSA+SFB+FE (17,13% e 31,34%, respectivamente) e BSA+SFB (23,19% e 33,27%, respectivamente). As melhores taxas de eclosão nos meios com BSA puro (26,04% e 43,32%, respectivamente) ou associado ao FE (BSA+FE) (37,64% e 51,34%, respectivamente).

O cultivo de desenvolvimento embrionário em meio livre de SFB tem proporcionado maior criotolerância aos embriões produzidos *in vitro* (ABE et al., 2002 e GÓMEZ et al., 2008). Neste experimento foi possível observar que a presença do SFB no meio de cultivo aumentou a produção embrionária, porém diminuiu a criotolerância. O BSA, como única fonte protéica, diminuiu a produção embrionária, mas melhorou a

criotolerância. Entretanto, quando se utilizou do 2,5% de FE associado ao BSA (6,0mg/mL) (BSA+FE) foi possível manter alta produção embrionária e com melhor criotolerância (51,34% de eclosão após 48 horas de cultivo). A produção de embriões com alta criotolerância quando se utilizou BSA+FE, pode estar associado aos fatores de crescimento celular presentes no FE e a menor capacidade em incorporar lipídeo ao embrião na presença do BSA e ausência do SFB (ABE et al., 2002).

Tabela 3: Produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando BSA e associações com SFB e FE no meio de desenvolvimento.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	2023	1741 (86,06) ^a	555	27,43 ^a	31,88 ^a
BSA+SFB	2106	1771 (84,09) ^a	794	37,70 ^b	44,83 ^b
BSA+FE	2286	1958 (85,65) ^a	851	37,23 ^b	43,46 ^b
BSA+SFB+FE	2214	1899 (85,77) ^a	865	39,07 ^b	45,55 ^b
TOTAL	8629	7369 (85,40)	3065	35,52	41,59

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, pelo teste de χ^2 .

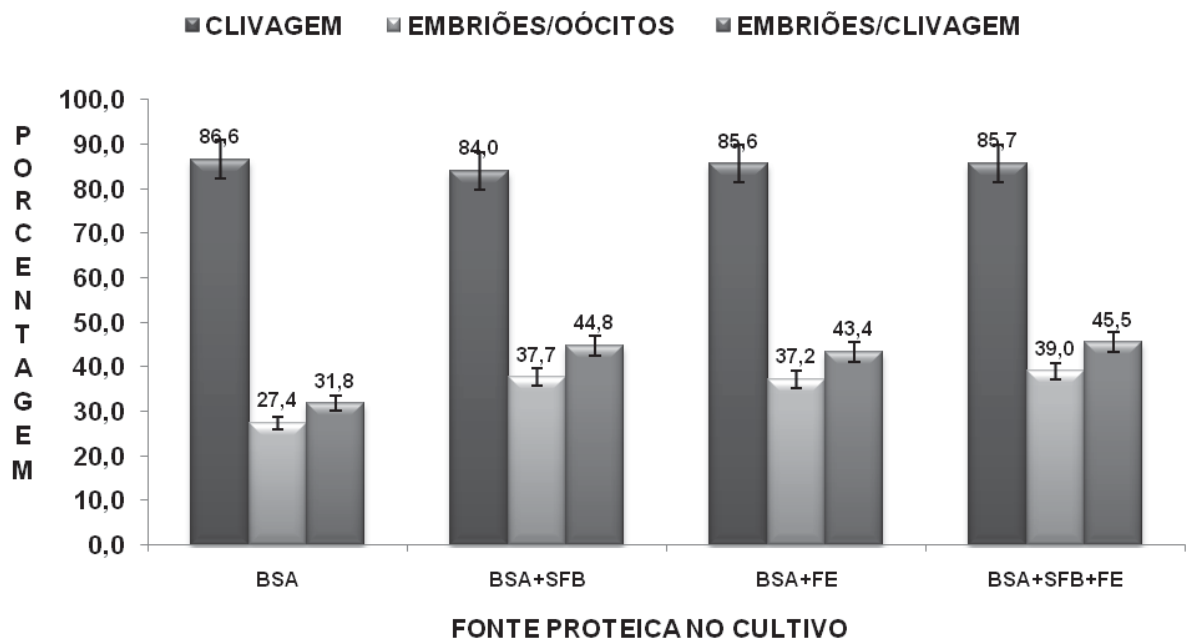


Figura 6: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando BSA e associação com SFB e FE no cultivo de desenvolvimento embrionário.

Tabela 4: Porcentagem de embriões bovinos eclodidos após 24 e 48 horas de reaquecidos, produzidos *in vitro* utilizando BSA e associações com SFB e FE no meio de desenvolvimento.

Desenvolvimento	Embriões			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	499	434	113 (26,04) ^a	188 (43,32) ^a
BSA+SFB	690	565	131 (23,19) ^a	188 (33,27) ^b
BSA+FE	719	635	239 (37,64) ^b	326 (51,34) ^c
BSA+SFB+FE	803	718	123 (17,13) ^c	225 (31,34) ^b
TOTAL	2711	2352	606 (25,77)	927 (39,41)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, pelo teste de χ^2 .

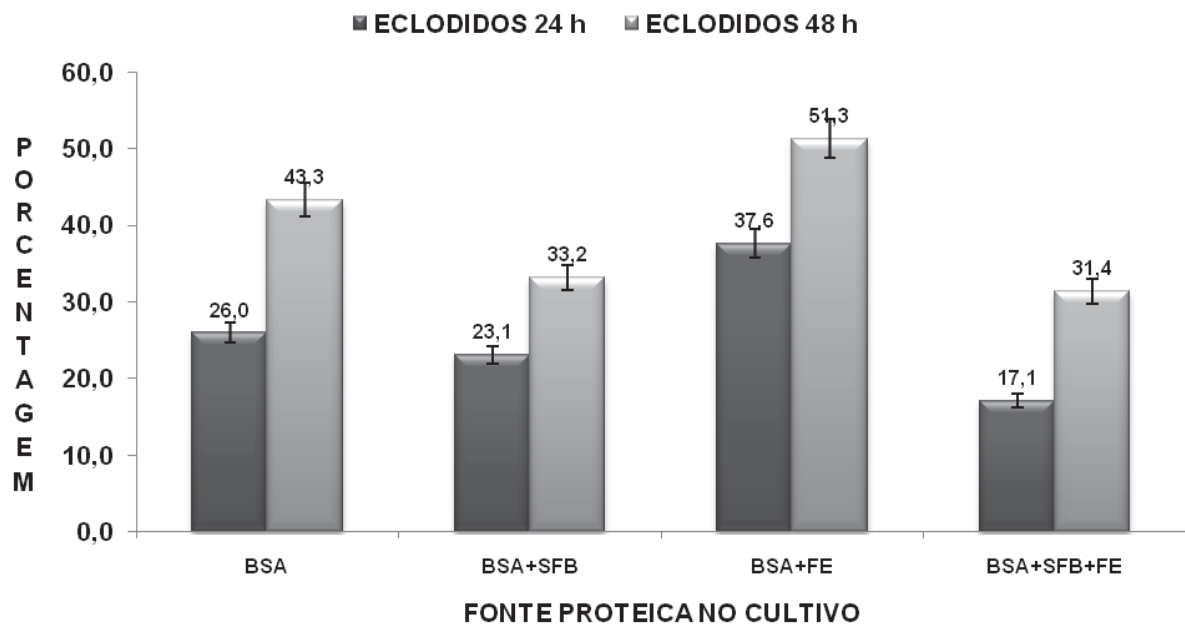


Figura 7: Taxas de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas, de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando BSA e associação com SFB e FE no cultivo de desenvolvimento embrionário.

5.3. Efeitos das fontes protéicas utilizadas na maturação sobre os diferentes grupos de cultivo embrionário

As fontes protéicas utilizadas no cultivo de maturação (SFB, BSA e FE) foram as mesmas utilizadas no cultivo de desenvolvimento embrionário. Na maturação foram utilizados como fonte única (SFB a 10% ou BSA a 8,0mg/mL ou FE a 10%) ou associadas entre si (BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de FE ou 5,0% de SFB+5,0% de FE ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB+2,5% de FE). Estes sete tratamentos na maturação foram utilizados para os quatro diferentes tratamentos de fontes protéicas utilizados no cultivo de desenvolvimento (BSA 8,0mg/mL ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de FE ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB+2,5% de FE) os resultados estão nas tabelas de 5 a 12 e figuras 8 e 9.

5.3.1. Efeitos das fontes protéicas na maturação com cultivo de desenvolvimento suplementado com BSA.

As taxas de clivagem, produção embrionária e criotolerância dentro do grupo de cultivo com BSA foram influenciadas pela fonte protéica na maturação ($p < 0,05$), tabelas 5 e 6.

O BSA quando utilizado como fonte protéica única, tanto na maturação como no desenvolvimento apresentou as menores taxas de clivagem (81,91%) e de produção de embriões, 19,41% e 23,69%, sobre o total de oócitos e oócitos clivados, respectivamente ($p < 0,05$). Por outro lado o SFB quando associado ao BSA (BSA+SFB) e ao FE (SFB+FE) proporcionou as melhores taxas de clivagem (90,21% e 92,41%, respectivamente) e de produção embrionária (37,98% e 36,33%, respectivamente sobre os oócitos clivados) dentro do cultivo de desenvolvimento com BSA.

Os tratamentos na maturação utilizando como fonte protéica o FE, SFB+FE e BSA+SFB+FE proporcionaram os melhores resultados ($p < 0,05$) de eclosão embrionária após reaquecimento e cultivo por 48 horas em embriões vitrificados (54,55%, 55,26% e 56,06%, respectivamente).

Tabela 5: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA.

Maturação	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
SFB	301	247 (82,06) ^a	75	24,92 ^{ab}	30,36 ^{abc}
BSA	304	249 (81,91) ^a	59	19,41 ^a	23,69 ^a
FE	298	248 (83,22) ^a	79	26,51 ^{bc}	31,85 ^{bc}
BSA+SFB	286	258 (90,21) ^{bc}	98	34,27 ^d	37,98 ^c
BSA+FE	266	224 (84,21) ^{ab}	63	23,68 ^{ab}	28,13 ^{ab}
SFB+FE	277	256 (92,42) ^c	93	33,57 ^{cd}	36,33 ^{bc}
BSA+SFB+FE	291	259 (89,00) ^{bc}	88	30,24 ^{bcd}	33,98 ^{bc}
TOTAL	2023	1741 (86,06)	555	27,43	31,88

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 6: Resultado de eclosão após reaquescidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA.

Maturação	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquescidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
SFB	73	57	8 (14,04) ^a	16 (28,07) ^a
BSA	48	45	7 (15,56) ^{ab}	19 (42,22) ^{ab}
FE	65	55	21 (38,18) ^c	30 (54,55) ^b
BSA+SFB	93	90	17 (18,89) ^{ab}	30 (33,33) ^a
BSA+FE	54	45	9 (20,00) ^{ab}	14 (31,11) ^a
SFB+FE	85	76	24 (31,58) ^{bc}	42 (55,26) ^b
BSA+SFB+FE	81	66	27 (40,91) ^c	37 (56,06) ^b
TOTAL	499	434	113 (26,04)	188 (43,32)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.3.2. Efeitos das fontes protéicas na maturação dentro do cultivo de desenvolvimento com BSA+SFB.

As taxas de clivagem, produção embrionária e criotolerância dentro do grupo de cultivo com BSA+SFB foram influenciadas pela fonte protéica na maturação ($p < 0,05$), tabelas 7 e 8.

Entre os tratamentos utilizados como fonte protéica na maturação, o BSA proporcionou a menor (69,90%) e o SFB a maior (89,27%) taxa de clivagem dentro do grupo com BSA+SFB no desenvolvimento. A produção embrionária foi mais elevada quando se utilizou o SFB (58,30%) como fonte protéica única na maturação em relação ao BSA e FE como únicas fontes protéicas e nas suas associações com o BSA e ou FE.

A presença do SFB (BSA+SFB), no cultivo de desenvolvimento, sobre a criotolerância embrionária só foi atenuado quando se utilizou o FE (40,48%) como única fonte protéica ou associada ao BSA (BSA+FE) (42,31%) ou ao SFB (SFB+FE) (38,04%) no cultivo de maturação.

Tabela 7: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+SFB.

Maturação	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
SFB	317	283 (89,27) ^c	165	52,05 ^c	58,30 ^c
BSA	309	216 (69,90) ^a	88	28,48 ^a	40,74 ^b
FE	290	253 (87,24) ^{bc}	120	41,38 ^b	47,43 ^b
BSA+SFB	306	261 (85,29) ^{bc}	112	36,60 ^b	42,91 ^b
BSA+FE	291	254 (87,29) ^{bc}	80	27,49 ^a	31,50 ^a
SFB+FE	297	249 (83,84) ^b	110	37,04 ^b	44,18 ^b
BSA+SFB+FE	296	255 (86,15) ^{bc}	119	40,20 ^b	46,67 ^b
TOTAL	2106	1771 (84,09)	794	37,70	44,83

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 8: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+SFB.

Maturação	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
SFB	151	124	25 (20,16) ^a	39 (31,45) ^a
BSA	69	52	10 (19,23) ^a	16 (30,77) ^a
FE	110	84	28 (33,33) ^a	34 (40,48) ^a
BSA+SFB	85	77	16 (20,78) ^a	23 (29,87) ^a
BSA+FE	70	52	13 (25,00) ^a	22 (42,31) ^a
SFB+FE	100	92	23 (25,00) ^a	35 (38,04) ^a
BSA+SFB+FE	105	84	16 (19,05) ^a	19 (22,62) ^a
TOTAL	690	565	131 (23,19)	188 (33,27)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.3.3. Efeitos das fontes protéicas na maturação dentro do cultivo de desenvolvimento com BSA+FE.

As taxas de clivagem, produção embrionária e criotolerância dentro do grupo de cultivo com BSA+FE foram influenciadas pela fonte protéica na maturação ($p < 0,05$), tabelas 9 e 10.

Entre os tratamentos utilizados como fonte protéica na maturação, o FE proporcionou a menor (80,86%) e o BSA a maior (89,52%) taxa de clivagem dentro do grupo com BSA+FE no desenvolvimento. Dentro do cultivo de desenvolvimento embrionário com BSA+FE, as duas menores taxas de produção embrionária foram nos tratamentos utilizando BSA como fonte única (33,44%) ou BSA+FE como fonte associada (34,43%) e as duas maiores taxas de produção foram utilizando BSA+SFB (55,56%) e BSA+SFB+FE (52,35%) como fontes protéicas associadas na maturação. Produções intermediárias foram observadas nos tratamentos com SFB (42,44%) e FE

(43,61%) como fontes protéicas únicas e SFB+FE (43,44%) como fonte protéica associada.

A criotolerância neste grupo de cultivo de desenvolvimento (BSA+FE) foi elevada em relação aos demais tratamentos utilizados (média de 51,34%), estando aumentada quando a maturação foi em BSA+FE com 62,69% de eclosão dos embriões após reaquecimento e cultivo por 48 horas.

Tabela 9: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+FE.

Maturação	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
SFB	400	344 (86,00) ^{abc}	146	36,50 ^b	42,44 ^b
BSA	334	299 (89,52) ^c	100	29,94 ^{ab}	33,44 ^a
FE	397	321 (80,86) ^a	140	35,26 ^{ab}	43,61 ^b
BSA+SFB	288	252 (87,50) ^{bc}	140	48,61 ^c	55,56 ^c
BSA+FE	296	244 (82,43) ^{ab}	84	28,38 ^a	34,43 ^a
SFB+FE	259	221 (85,33) ^{abc}	96	37,07 ^b	43,44 ^b
BSA+SFB+FE	312	277 (88,78) ^{bc}	145	46,47 ^c	52,35 ^c
TOTAL	2286	1958 (85,65)	851	37,23	43,46

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2

Tabela 10: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+FE.

Maturação	EMBRÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
SFB	118	110	42 (38,18) ^a	64 (58,18) ^a
BSA	92	75	24 (32,00) ^a	39 (52,00) ^a
FE	127	111	42 (37,84) ^a	53 (47,75) ^a
BSA+SFB	109	104	37 (35,58) ^a	47 (45,19) ^a
BSA+FE	75	67	28 (41,79) ^a	42 (62,69) ^a
SFB+FE	77	71	22 (30,99) ^a	32 (45,07) ^a
BSA+SFB+FE	121	97	44 (45,36) ^a	49 (50,52) ^a
TOTAL	719	635	239 (37,64)	326 (51,34)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.3.4. Efeitos das fontes protéicas na maturação dentro do cultivo de desenvolvimento com BSA+SFB+FE.

As taxas de clivagem, produção embrionária e criotolerância dentro do grupo de cultivo com BSA+SFB+FE foram influenciadas pela fonte protéica na maturação ($p < 0,05$), tabelas 11 e 12.

Entre os tratamentos utilizados como fonte protéica na maturação, o BSA proporcionou a menor (81,72%) e o SFB a maior (89,86%) taxa de clivagem dentro do grupo com BSA+SFB+FE como fonte protéica no cultivo de desenvolvimento embrionário.

Dentro do cultivo de desenvolvimento embrionário com BSA+SFB+FE, a menor taxa de produção embrionária foi no tratamento utilizando BSA como fonte única (40,00%) ou BSA+FE como fonte associada (38,86%) e as três maiores taxas de produção foram utilizando BSA+SFB (50,83%), SFB+FE (50,20%) e BSA+SFB+FE (51,06%) como fontes protéicas associadas na maturação. Produção intermediária foi

observada nos tratamentos com SFB (45,73%) e FE (43,53%) como fontes protéicas únicas na maturação.

Este tratamento (BSA+SFB+FE), no cultivo de desenvolvimento proporcionou alta taxa de produção embrionária, entretanto foi o grupo de desenvolvimento que apresentou a pior taxa de criotolerância de todos os tratamentos utilizados (média de 31,34%). A melhor taxa de sobrevivência embrionária à criopreservação utilizando a combinação das três fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento foi quando se realizou a maturação em BSA+FE com 43,27% de eclosão dos embriões após reaquecimento e cultivo por 48 horas.

Tabela 11: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA+SFB+FE.

Maturação	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
SFB	365	328 (89,86) ^b	150	41,10 ^b	45,73 ^{ab}
BSA	361	295 (81,72) ^a	118	32,69 ^a	40,00 ^a
FE	360	317 (88,06) ^b	138	38,33 ^{ab}	43,53 ^{ab}
BSA+SFB	293	240 (81,91) ^a	122	41,64 ^b	50,83
BSA+FE	267	229 (85,77) ^{ab}	89	33,33 ^a	38,86 ^a
SFB+FE	295	255 (86,44) ^{ab}	128	43,39 ^b	50,20 ^b
BSA+SFB+FE	273	235 (86,08) ^{ab}	120	43,96 ^b	51,06 ^b
TOTAL	2214	1899 (85,77)	865	39,07	45,55

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2

Tabela 12: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB, BSA, FE e associações, com o cultivo de desenvolvimento em BSA+SFB+FE.

Maturação	EMBRÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
SFB	144	140	23 (16,43) ^a	35 (25,00) ^a
BSA	109	99	17 (17,17) ^a	27 (27,27) ^a
FE	128	126	16 (12,70) ^a	32 (25,40) ^a
BSA+SFB	114	91	14 (15,38) ^a	23 (25,27) ^a
BSA+FE	74	66	11 (16,67) ^a	24 (36,36) ^{ab}
SFB+FE	122	104	22 (21,15) ^a	45 (43,27) ^b
BSA+SFB+FE	112	92	20 (21,74) ^a	39 (42,39) ^b
TOTAL	803	718	123 (17,13)	225 (31,34)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2

Os efeitos benéficos da utilização do SFB durante a maturação foram previamente reportados por RUSSELI et al. 2006, assim como o aumento na taxa de embriões produzidos quando foi usada a associação de SFB com BSA no SOF durante o cultivo de desenvolvimento (LEIVAS et al., 2010).

Embora, o SFB tenha a capacidade em aumentar a produção embrionária durante o cultivo *in vitro*, principalmente pelos fatores de crescimento nele presentes, estes embriões apresentam uma baixa criotolerância. Esse fato pode ser atribuído a uma série de modificações que ocorre nos embriões produzidos *in vitro* e que estão ligadas a utilização do SFB (ABE et al., 1999; RZUCIDLO et al., 2001), dentre estas a deposição excessiva de lipídios no citoplasma destes embriões (ABE et al., 2002).

Se por um lado a presença do SFB estimula a produção embrionária o FE demonstrou que tem efeito na qualidade embrionária e conseqüentemente de produzir embriões com maior criotolerância quando o cultivo de desenvolvimento tem como fonte protéica o BSA. Conforme descrito na literatura, o BSA quando utilizado no desenvolvimento embrionário eleva a sobrevivência embrionária à criopreservação

(PUGH et al., 1998), isto está relacionado à produção de embriões de boa qualidade morfológica (GOMEZ et al., 2008) e também ao menor acúmulo de conteúdo lipídico no citoplasma desses embriões (ABE et al., 1999).

Ao analisarmos em conjunto produção embrionária e sobrevivência e eclosão após reaquecimento e cultivo por 48 horas dos embriões vitrificados, o tratamento BSA+FE como fonte protéica no cultivo de desenvolvimento apresentou os melhores resultados de produção e sobrevivência embrionária. Ao compararmos com os demais grupos de cultivo de desenvolvimento verificamos que o BSA como fonte protéica única tem baixa produção de embriões com boas características para criopreservação. Ao ser associado BSA+SFB e BSA+SFB+FE como fontes protéicas no desenvolvimento apresentam alta capacidade em produção embrionária, mas de embriões com baixa resistência a criopreservação. A partir desses dados, fica claro que o BSA quando utilizado como fonte única de macromoléculas provavelmente não tenha sido capaz de suprir as exigências durante todo o desenvolvimento embrionário, o que se refletiu em uma baixa produção de blastocistos. No entanto o fato dos embriões apresentarem uma boa criotolerância pode estar vinculado à menor deposição lipídica destes embriões (cultivados em BSA) em comparação aos produzidos na presença de SFB (ABE, et al., 2002), como nos grupos cultivados em BSA+SFB e BSA+SFB+FE.

Apesar da utilização dos substitutos do SFB ser menos comum na produção *in vitro* de embriões bovinos (SAGIRKAYA et al., 2007) o fluído embriônico tem demonstrado bons resultados (TETZNER et al., 2010), como no caso deste experimento onde foi possível aliar simultaneamente boa capacidade de produção embrionária e alta resistência a criopreservação quando se utilizou a associação entre o BSA e FE no cultivo de desenvolvimento.

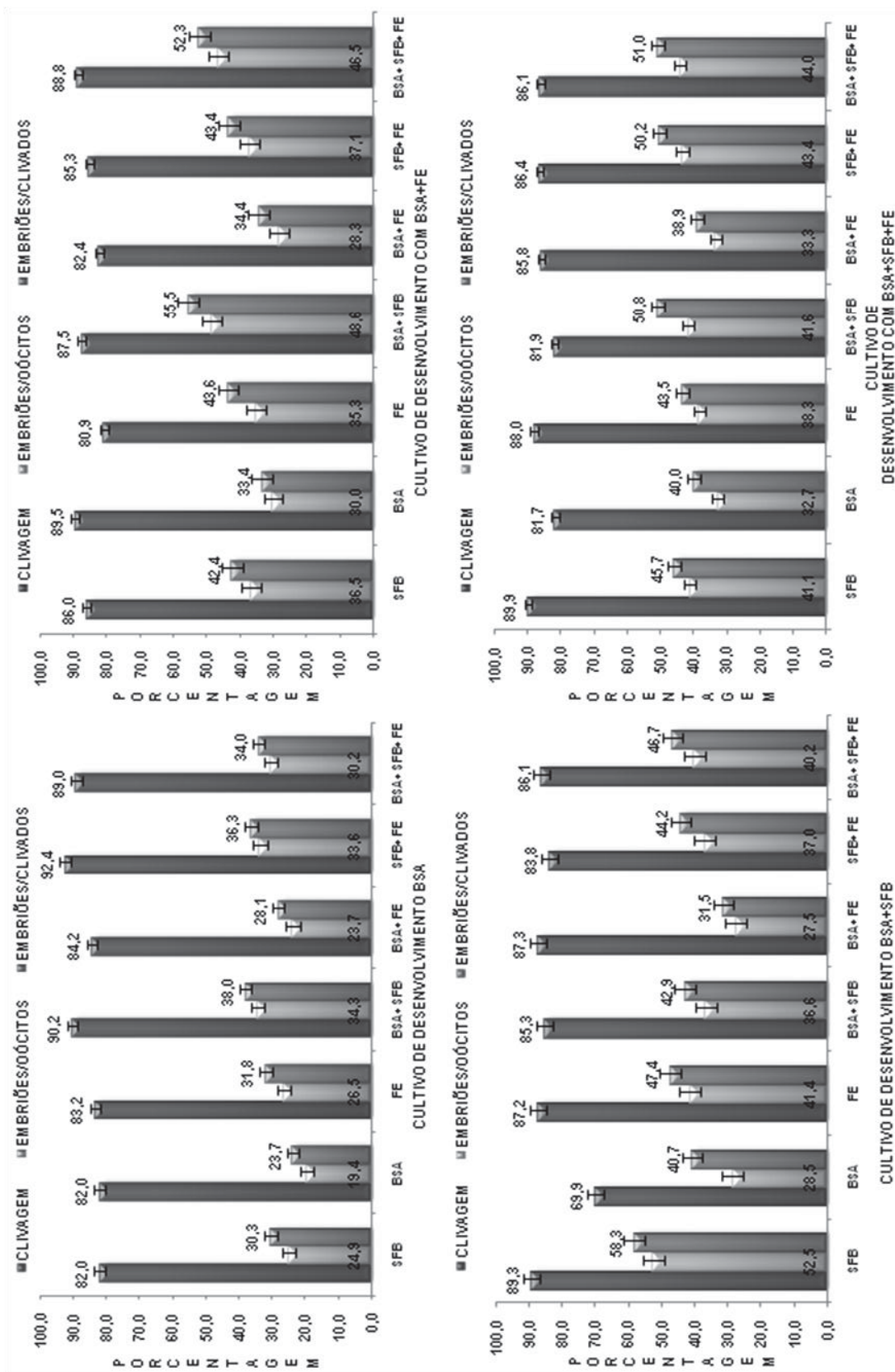


Figura 8: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando como fonte proteica BSA ou SFB ou FE isoladamente ou em associação no cultivo de maturação dos óocitos e no cultivo de desenvolvimento embrionário.

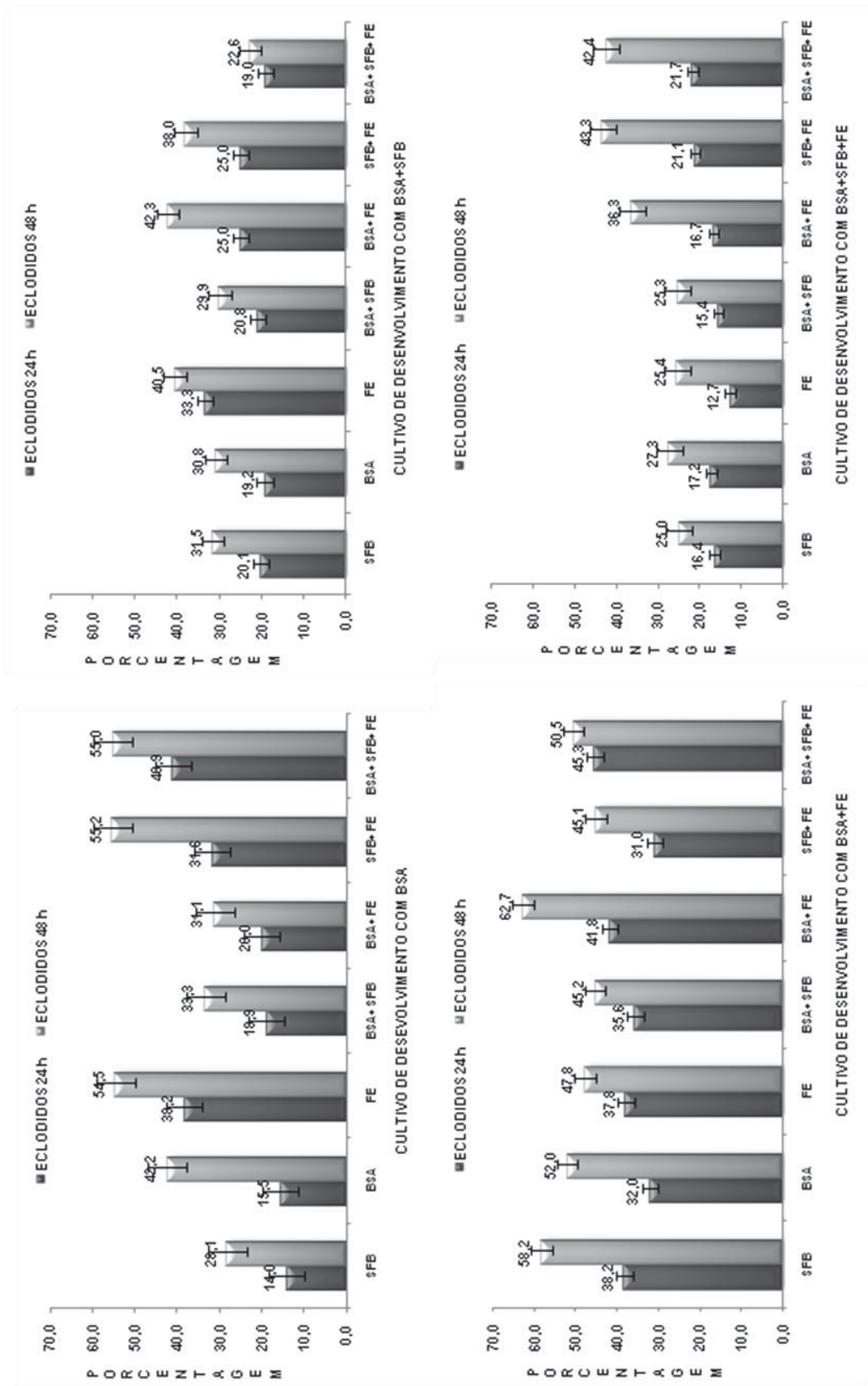


Figura 9: Taxa de eclosão após vitrificação e reaquecimento por 24 e 48 horas de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando BSA ou SFB ou FE e associações no meio de maturação e no meio de cultivo de desenvolvimento embrionário.

5.4. Efeitos das fontes protéicas utilizadas no cultivo de desenvolvimento embrionário sobre a maturação oocitária

As fontes protéicas utilizadas no cultivo de maturação (SFB, BSA e FE) foram as mesmas utilizadas no cultivo de desenvolvimento embrionário. Na maturação foram utilizados como fonte única (SFB a 10% ou BSA a 8,0mg/mL ou FE a 10%) ou associadas entre si (BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de FE ou 5,0% de SFB+5,0% de FE ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB+2,5% de FE). Estes sete tratamentos na maturação foram utilizados para os quatro diferentes tratamentos de fontes protéicas utilizados no cultivo de desenvolvimento (BSA 8,0mg/mL ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de FE ou BSA 6,0mg/mL+2,5% de SFB+2,5% de FE), os resultados estão nas tabelas de 13 a 26 e figuras 10 e 11.

Os tratamentos no cultivo de desenvolvimento BSA, BSA+SFB, BSA+FE e BSA+SFB+FE não influenciaram na taxa de clivagem ($p>0,05$) (tabela 3) por esta razão não foram avaliadas dentro da maturação. Já a produção embrionária só não foi influenciada pelo cultivo de desenvolvimento quando a maturação foi com BSA+FE ($p>0,05$) (tabela 21).

Os embriões submetidos à vitrificação, reaquecidos e cultivados por até 48 horas só não demonstraram ser influenciados pelo meio de desenvolvimento quando a maturação foi em SFB+FE ($p>0,05$) (tabela 24).

5.4.1. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com SFB.

A produção de embriões no tratamento com SFB como fonte protéica na maturação foi influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p<0,05$). A menor taxa de produção foi observada no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (30,36%) e a maior taxa quando se utilizou o BSA+SFB (58,30%), e valores intermediários foram observados para o BSA+FE (42,44%) e BSA+SFB+FE (45,73%) (tabela 13). A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas produzidos no meio de desenvolvimento com fonte protéica de BSA+FE (58,18%) foi a maior taxa dentro da maturação com SFB ($p<0,05$) (tabela 14).

Tabela 13: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	301	247 (82,06)	75	24,92 ^a	30,36 ^a
BSA+SFB	317	283 (89,27)	165	52,05 ^b	58,30 ^b
BSA+FE	400	344 (86,00)	146	36,50 ^c	42,44 ^c
BSA+SFB+FE	365	328 (89,86)	150	41,10 ^c	45,73 ^c
TOTAL	1383	1202 (86,91)	536	38,76	44,59

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 14: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	73	57	8 (14,04) ^a	16 (28,07) ^a
BSA+SFB	151	124	25 (20,16) ^a	39 (31,45) ^a
BSA+FE	118	110	42 (38,18) ^b	64 (58,18) ^b
BSA+SFB+FE	144	140	23 (16,43) ^a	35 (25,00) ^a
TOTAL	486	431	98 (22,74)	154 (35,73)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.2. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com BSA.

A produção de embriões no tratamento com BSA como fonte protéica na maturação foi uma das menores médias (34,47%) e influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p < 0,05$). A menor taxa de produção foi observada no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (23,69%) e as maiores taxas de produção quando se utilizou o BSA+SFB (40,74%) e BSA+SFB+FE (40,00%) e valor intermediários foi observado para o BSA+FE (33,44%) (tabela 15).

A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas produzidos no meio de desenvolvimento com fonte protéica de BSA+FE (52,00%) foi a melhor taxa dentro da maturação com BSA ($p < 0,05$) (tabela 16).

Tabela 15: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	304	249 (81,91)	59	19,41 ^a	23,69 ^a
BSA+SFB	309	216 (69,90)	88	28,48 ^b	40,74 ^b
BSA+FE	334	299 (89,52)	100	29,94 ^b	33,44 ^b
BSA+SFB+FE	361	295 (81,72)	118	32,69 ^b	40,00 ^b
TOTAL	1308	1059 (80,96)	365	27,91	34,47

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 16: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	48	45	7 (15,56) ^a	19 (42,22) ^a
BSA+SFB	69	52	10 (19,23) ^a	16 (30,77) ^a
BSA+FE	92	75	24 (32,00) ^a	39 (52,00) ^b
BSA+SFB+FE	109	99	17 (17,17) ^a	27 (27,27) ^a
TOTAL	318	271	58 (21,40)	101 (37,27)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.3. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com FE.

A produção de embriões no tratamento com FE como fonte protéica na maturação foi intermediária (41,88%) e influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p < 0,05$). A menor taxa de produção foi observada no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (31,85%) e as maiores taxas de produção quando se utilizou o BSA+SFB (47,43%), BSA+FE (43,61%) e BSA+SFB+FE (43,53%) (tabela 17).

A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas produzidos no meio de desenvolvimento com fonte protéica de BSA (54,55%) foi a melhor taxa dentro da maturação com FE ($p < 0,05$) (tabela 18).

Tabela 17: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	298	248 (83,22)	79	26,51 ^a	31,85 ^a
BSA+SFB	290	253 (87,24)	120	41,38 ^b	47,43 ^b
BSA+FE	397	321 (80,86)	140	35,26 ^b	43,61 ^b
BSA+SFB+FE	360	317 (88,06)	138	38,33 ^b	43,53 ^b
TOTAL	1345	1139 (84,68)	477	35,46	41,88

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 18: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	65	55	21 (38,18) ^a	30 (54,55) ^a
BSA+SFB	110	84	28 (33,33) ^a	34 (40,48) ^a
BSA+FE	127	111	42 (37,84) ^a	53 (47,75) ^a
BSA+SFB+FE	128	126	16 (12,70) ^b	32 (25,40) ^b
TOTAL	430	376	107 (28,46)	149 (39,63)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.4. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com BSA+SFB.

A produção de embriões no tratamento com BSA+SFB como fonte protéica na maturação foi a melhor de todas (46,69%) e influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p < 0,05$). As menores taxas de produção foram observadas no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (37,98%) e BSA+SFB (42,91%) e as maiores taxas de produção quando se utilizou o BSA+FE (55,56%) e BSA+SFB+FE (50,83%) (tabela 19).

A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas dentro do cultivo de maturação com BSA+SFB foi a menor de todas (33,98%), tendo se destacado a produção no meio de desenvolvimento com fonte protéica de BSA+FE (45,19%) ($p < 0,05$) (tabela 20).

Tabela 19: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+SFB e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	286	258 (90,21)	98	34,27 ^a	37,98 ^a
BSA+SFB	306	261 (85,29)	112	36,60 ^a	42,91 ^a
BSA+FE	288	252 (87,50)	140	48,61 ^b	55,56 ^b
BSA+SFB+FE	293	240 (81,91)	122	41,64 ^{ab}	50,83 ^{ab}
TOTAL	1173	1011 (86,19)	472	40,24	46,69

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 20: Resultado de eclosão após reaquescidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+SFB e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	93	90	17 (18,89) ^a	30 (33,33) ^{ab}
BSA+SFB	85	77	16 (20,78) ^a	23 (29,87) ^a
BSA+FE	109	104	37 (35,58) ^b	47 (45,19) ^b
BSA+SFB+FE	114	91	14 (15,38) ^a	23 (25,27) ^a
TOTAL	401	362	84 (23,20)	123 (33,98)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.5. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com BSA+FE.

A produção de embriões no tratamento com BSA+FE como fonte protéica na maturação foi a pior de todas (33,23%) e não foi influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento. As menores taxas de produção foram observadas no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (28,13%) e BSA+SFB (31,50%) e as maiores taxas de produção quando se utilizou o BSA+SFB+FE (38,86%) e BSA+FE (34,43%) e (tabela 21). A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquescidos e

cultivados por 48 horas dentro do cultivo de maturação com BSA+FE foi uma das melhores (média de 44,35%), tendo se destacado a produção no meio de desenvolvimento com fonte protéica de BSA+FE (62,69%) ($p < 0,05$) (tabela 22).

Tabela 21: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	266	224 (84,21)	63	23,68 ^a	28,13 ^a
BSA+SFB	291	254 (87,29)	80	27,49 ^a	31,50 ^a
BSA+FE	296	244 (82,43)	84	28,38 ^a	34,43 ^a
BSA+SFB+FE	267	229 (85,77)	89	33,33 ^a	38,86 ^a
TOTAL	1120	951 (84,91)	316	28,21	33,23

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 22: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	54	45	9 (20,00) ^a	14 (31,11) ^a
BSA+SFB	70	52	13 (25,00) ^a	22 (42,31) ^a
BSA+FE	75	67	28 (41,79) ^b	42 (62,69) ^b
BSA+SFB+FE	74	66	11 (16,67) ^a	24 (36,36) ^a
TOTAL	293	230	61 (26,52)	102 (44,35)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.6. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com SFB+FE.

A produção de embriões no tratamento com SFB+FE como fonte protéica na maturação foi uma das melhores (43,53%) e influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p < 0,05$). A menor taxa de produção foi observada no cultivo

de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (36,33%), a maior taxa de produção quando se utilizou o BSA+SFB+FE (50,20%) e taxas intermediárias quando se utilizou BSA+SFB (44,18%) e BSA+FE (43,44%) e (tabela 23).

A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas dentro do cultivo de maturação com SFB+FE foi a mais elevada (média de 44,90%) e não foi influenciada pelas fontes protéicas do cultivo de desenvolvimento. Assim mesmo apresentou a menor taxa de eclosão quando o desenvolvimento embrionário foi em BSA+SFB (38,04%) e a maior em BSA (55,26%) (tabela 24).

Tabela 23: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com SFB+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	277	256 (92,42)	93	33,57 ^a	36,33 ^a
BSA+SFB	297	249 (83,84)	110	37,04 ^a	44,18 ^{ab}
BSA+FE	259	221 (85,33)	96	37,07 ^a	43,44 ^{ab}
BSA+SFB+FE	295	255 (86,44)	128	43,39 ^a	50,20 ^b
TOTAL	1128	981 (86,97)	427	37,85	43,53

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 24: Resultado de eclosão após reaquecidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em SFB+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	85	76	24 (31,58) ^a	42 (55,26) ^a
BSA+SFB	100	92	23 (25,00) ^a	35 (38,04) ^a
BSA+FE	77	71	22 (30,99) ^a	32 (45,07) ^a
BSA+SFB+FE	122	104	22 (21,15) ^a	45 (43,27) ^a
TOTAL	384	343	91 (26,53)	154 (44,90)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

5.4.7. Efeitos das fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento dentro do cultivo de maturação com BSA+SFB+FE.

A produção de embriões no tratamento com BSA+SFB+FE como fonte protéica na maturação foi uma das melhores (46,00%) e influenciada pelas fontes protéicas do cultivo do desenvolvimento ($p < 0,05$). A menor taxa de produção foi observada no cultivo de desenvolvimento onde se utilizou o BSA (33,98%) e as maiores taxas de produção quando se utilizou o BSA+FE (52,35%) e BSA+SFB+FE (51,06%) e produção intermediária quando se utilizou o BSA+SFB (46,67%) (tabela 25).

A taxa de eclosão dos embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados por 48 horas dentro do cultivo de maturação com BSA+SFB+FE foi de 42,48%, tendo se destacado, com melhores taxas, quando a produção foi nos meios de desenvolvimento com fonte protéica BSA (56,06%) e BSA+FE (50,52%) e a pior taxa, quando a produção foi no meio de desenvolvimento com fonte protéica BSA+SFB (22,62%) ($p < 0,05$) (tabela 26).

Tabela 25: Taxa de clivagem e produção de embriões após Maturação dos oócitos em meio suplementado com BSA+SFB+FE e cultivo dos embriões em meio suplementado com BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	Oócitos	Clivagem (%)	Embriões Total	Embriões/	
				Oócitos (%)	Clivados (%)
BSA	291	259 (89,00)	88	30,24 ^a	33,98 ^a
BSA+SFB	296	255 (86,15)	119	40,20 ^b	46,67 ^b
BSA+FE	312	277 (88,78)	145	46,47 ^b	52,35 ^b
BSA+SFB+FE	273	235 (86,08)	120	43,96 ^b	51,06 ^b
TOTAL	1172	1026 (87,54)	472	40,27	46,00

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2 .

Tabela 26: Resultado de eclosão após reaquescidos por 24 e 48 horas, de embriões bovinos vitrificados, produzidos com oócitos Maturados em BSA+SFB+FE e cultivo de desenvolvimento em BSA e associações com SFB e FE.

Desenvolvimento	EMBRIÕES			
	Vitrificados	Reaquecidos	Eclodidos 24 h	Eclodidos 48 h
BSA	81	66	27 (40,91) ^a	37 (56,06) ^a
BSA+SFB	105	84	16 (19,05) ^b	19 (22,62) ^b
BSA+FE	121	97	44 (45,36) ^a	49 (50,52) ^a
BSA+SFB+FE	112	92	20 (21,74) ^b	39 (42,39) ^a
TOTAL	419	339	107 (31,56)	144 (42,48)

Colunas com letras diferentes diferem entre si $p < 0,05$, teste de χ^2

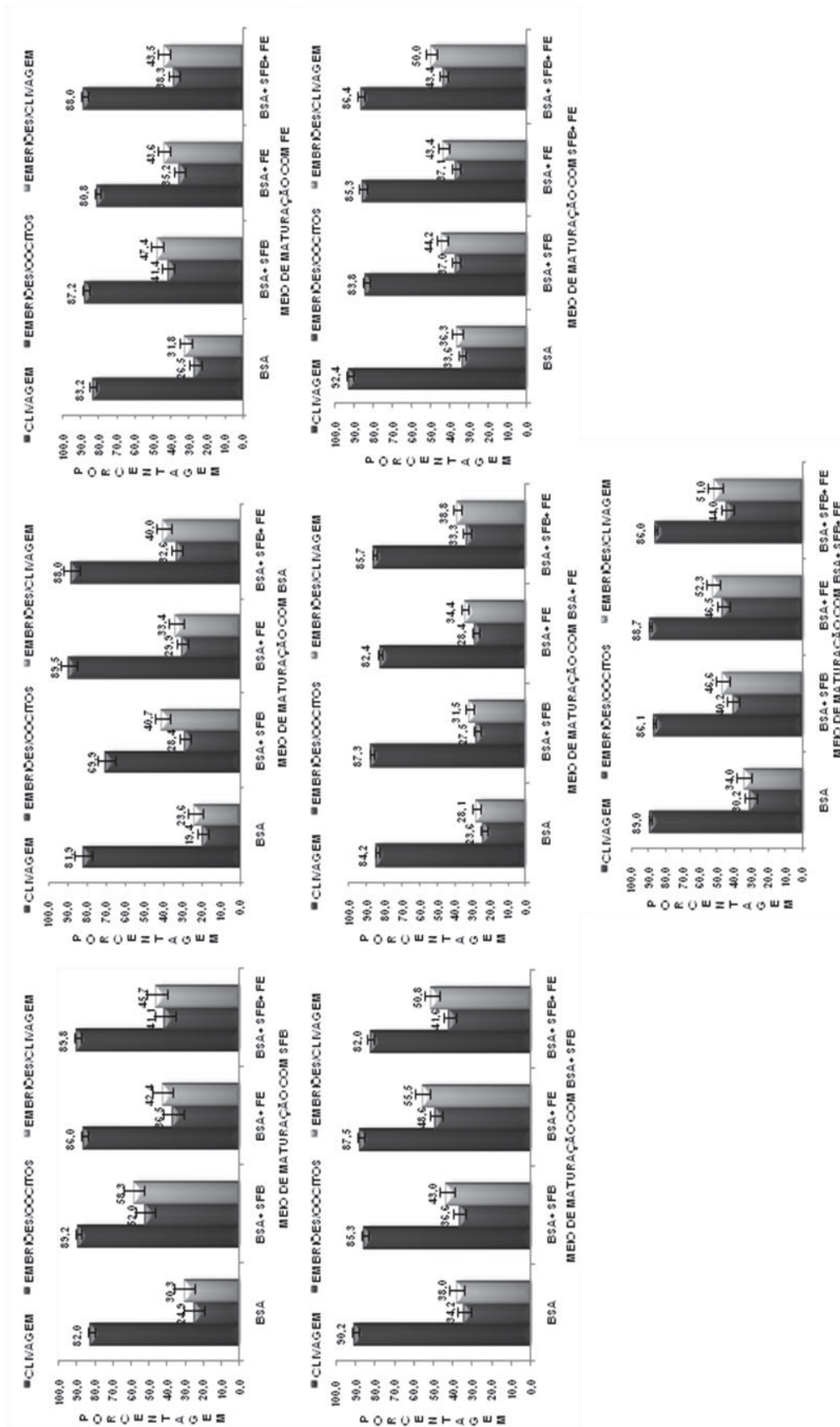


Figura 10: Taxas de clivagem e produção de embriões bovinos *in vitro* utilizando o SFB ou BSA ou FE e suas associações como fonte proteica no cultivo de maturação e do desenvolvimento embrionário.

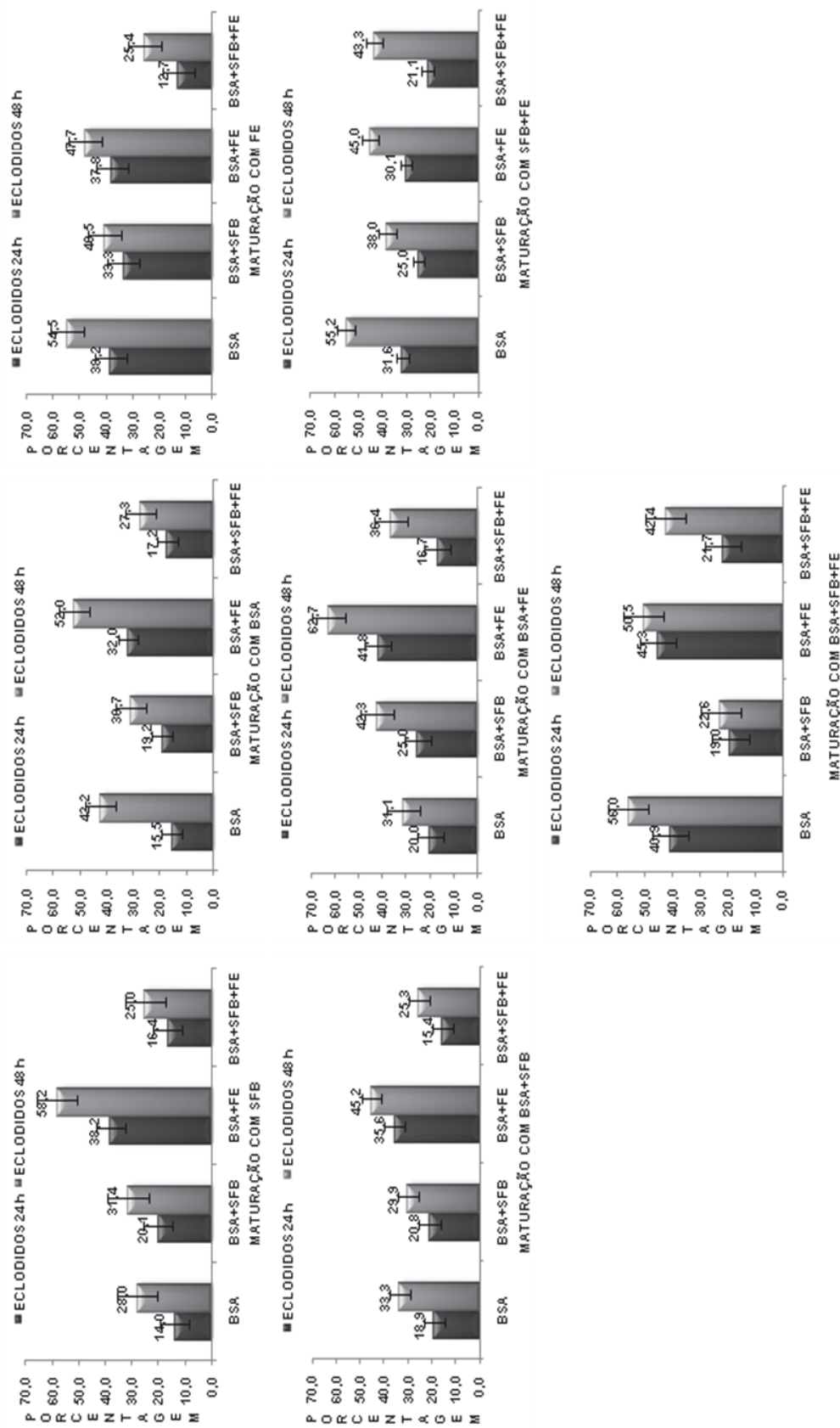


Figura 11: Taxas de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando SFB ou BSA ou FE e suas associações como fonte proteica no cultivo de maturação e do desenvolvimento embrionário.

6. CONCLUSÕES

Conforme a metodologia utilizada neste estudo e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

A presença do SFB como fonte protéica única ou associado ao BSA e ou FE durante a maturação oocitária aumenta a taxa de produção embrionária.

O SFB e FE associados ao BSA como fontes protéicas no cultivo de desenvolvimento embrionário melhoram a taxa de produção embrionária.

O SFB associado ao BSA e ou FE como fonte protéica no desenvolvimento embrionário aumenta a taxa de produção embrionária, entretanto prejudica a sobrevivência embrionária à criopreservação.

O FE como fonte protéica única ou associada durante a maturação oocitária melhora a sobrevivência embrionária à criopreservação.

O FE como fonte protéica associado ao BSA no desenvolvimento melhora a taxa de sobrevivência embrionária à criopreservação.

7. REFERÊNCIAS

ABE, H., YAMASHITA, S., T. SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium.

Molecular Reproduction and Development, v. 53, p.325- 335. 1999.

ABE, H., YAMASHITA, S., T. SATOH, T., HOSHI, H. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media.

Molecular Reproduction and Development, v. 61, p.57-66, 2002.

ABE, H., SHIKU, H., AOYAGI, S., HOSHI, H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine Embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.21, p.22-30. 2004.

ABD EL RAZEK, I.M., CHARPIGNY, G., KODJA, S., MARQUANT-LE, B.G., MERMILLOD, P., GUYADER-JOLY, C., HUMBLLOT, P. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, (Abstract) v. 53, p. 346, 2000.

AGCA, Y., MONSON, R.L., NORTBEY, D.L., ABAS MAZNI, O., SCHAEFER, D.M., RUTLEDGE J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v. 50, p.147-162, 1998.

ARAV, A., ZENON, Y., OCHERETNY, A.A. A new device method for vitrification increases the cooling rate and allow successful cryopreservation of bovine oocytes **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.

AUGUSTIN, R., POCAR, P., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H., FISCHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. **Reproduction**, v. 126, p. 91-99, 2003.

BARNES, D., SATO, G. Methods for growth of cultured cells in serumfree medium. **Analytical Biochemistry**, v. 102, p. 255-270, 1980.

BAUNGARD, L.H., CORL, B.A., DWYER, D.A., BAUMAN, D.E. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid methabolism in lacting dairy cows. **Journal of Animal Sciences**, v. 80, p. 1285-1293, 2002.

BEN-YOSEF, D., YOVEL, I., SCHWARTZ, T., AZEM, F., LESSING, J.B., AMIT, A. Increasing synthetic serum substitute (SSS) concentrations in P1 glucose/phosphate-free medium improves implantation rate: a comparative study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.18, p. 588-92, 2001.

BONI, R., TOSTI, E., ROVIELLO, S., DALE, B. Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v, 61, p. 1050-1055. 1999.

BROWN, J.M., HALVORSEN, Y.D., LEA-CURRIE, Y.R.,GEIGERMAN, C., McINTOSH, M. *Trans-10, cis-12* but not *cis-9, trans-11*, Conjugated linoleic acid attenuates lipidogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2316-2321, 2001.

CAMPOS-CHILLON, L. F., WALKER, D. J., DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F., SEIDEL JR., G. E. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1200-1214, 2006.

CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDOCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 43, p.1115–1128, 1995.

COOK, M.E., MILLER, C.C., PARK, Y., PARIZA, M.W. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. **Poultry Science**, v. 72, p. 1301-1305, 1993.

CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J., ALEXANDER, J.E., FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

DATTENA, M., ACCARDO, C., PILICHI, S., ISACHENKO, V., MARA, L., CHESSA, B., CAPPAL, P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, 62, p., 481-493, 2004.

DIEZ, C., HEYMAN, Y., LE BOURHIS, D., GUYADER-JOLY, C., DEGROUARD, J., RENARD, J. P. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, p. 923-936. 2001.

DINNYÉS, A., CAROLAN, C., LONERGAN, P., MASSIP, A., MERMILLOD. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v. 42, p. 1425-1439, 1996.

DINNYÉS, A., DAI, Y., JIANG, S., YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cells nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.513-518, 2000.

DOMINKO, T., FIRST, N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 456-467, 1997.

DUGAN, M.E., AALHUS, J.L., SCHAEFER, A.L., KRAMER, J.K.G. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, p. 723-725, 1997.

DUQUE, P., HIDALGO, C.O., GOMEZ, E., PINTADO, B., FACAL, N., DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p.487–496, 2003.

ECKERT, J. NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v. 43, p. 1211-1225, 1995.

FAIR, T., HYTTEL,, P., GREV, T., BOLAND, M. Cytoplasmic ultrastructure of growing and fully grown bovine embryos. **Anatomy and Embryology**, v. 195, p. 327-336, 1997.

FAIR, T., LONERGAN, P., DINNYES, A., COTTELL, D.C., HYTTEL, P., WARD, F.A. Ultrastructure of Bovine Blastocysts Following Cryopreservation: Effect of Method of Blastocyst Production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p, 186-195, 2001.

FERGUSON, E. M. E LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 373-378, 1999.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical

modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

GANDHI, A. P., LANE, M., GARDNER, D.K., KRISHER, R.L., A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 395-401, 2000.

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

GÓMEZ, E., DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 23-37, 2000.

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

GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISINTIN, J.A., COSTA, L.F.S. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2nd. Ed. 2008. São Paulo, Rocca,. p. 261- 291.

GONÇALVES, P. B. D, BARRETA, M. H., SANDRI, L. R., FERREIRA, R. ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p.212-217, 2007.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**, 2nd Edition, CAB International, University Press, Cambridge, 548 p. 2003.

GOLDSBOROUGH, M.D., TILKINS, M.L., PRICE, P.J., LOBO-ALFONSO, J., MORRISON, J.R., STEVENS, M.E., et al. Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells. **Focus**, v.20, p.8-12, 1998.

GRANLUND, L., JUVET, L.K., PEDERSEN, J.I., NEBB, H.I. *Trans-10, cis-12* Conjugated linoleic acid prevents triacyl glycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. **Journal of Lipid Research**, v.44, p. 1441-1452, 2003.

HAN, M.S., NIWA, K. Effects of BSA and fetal calf serum in culture medium on development of rat embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 235-242, 2003.

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 245-264, 2003.

HOCHI, S. KIMURA, K., HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v.52, p.497- 504, 1999.

HOLM, P., BOOTH, P.J., SCHMIDT, M.H., GREVE, T., CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683–700, 1999.

HUR, S.J., KANG, G.H., JEONG, J.Y., YANG, H.S., HA, Y.L., PARK, G.B., JOO, S.T. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid characteristics of egg yolk. Asian-australas. **Journal of Animal Science**, v. 16, p. 1165-1170, 2003.

HUR, S.J., YE, B.W., LEE, J.L., HA, Y.L., PARK, G.B., JOO, S.T. Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. **Meat Science**, v. 66, p. 771-775, 2004.

HUR, S.J., PARK, G.B., JOO, S.T. Biological activities of conjugated Linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, v. 110, p. 221-229, 2007.

IMAIL, K., KOBAYASHIL, S., GOTO, Y., DOCHI, O., SHIMOHIRA, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in-vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology**, v.47, p.347 abstr. 1997.

IP, C., SINGH, M., THOMPSON, H.J., SCIMECA, J.A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, v. 54, p. 1212-1215, 1994.

JOHANSON, K.O. Refoldind of bovine serum albumin and its proteolytic fragments. Regain of disulfide bonds, secondary structure and ligand binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 445-450, 1981.

KASAI, M., ITO, K., EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. **Human Reproduction**, v. 17, p. 1863-1874, 2002.

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

KATO, Y., NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. **Theriogenology**, v. 72, p. 624-635, 2009.

KEPPLER, C.R., IRNOS, K.P., McNEILL, J.J., TOVE, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 1350-1354, 1966.

KHURANA, N.K., NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v 62, p. 947-856, 2000.

KONG I.K., LEE, S.I., CHO, S.G., CHO, S.K., PARK, C.S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1817-1826, 2000.

KRISHER, R.L., LANE, M., BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v.60, p. 1345-1352, 1999.

KUBELKA, M., MOTLIK, J., SCHULTZ, R.M., PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

KULESHOVA L.L., LOPATA A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v.78, p.449-454, 2002.

KUWAYAMA M, KATO O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.17, p. 477, 2000.

KUWAYAMA, M., VAJTA, G., IEDA, S., KATO, O. Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, p. 73-80, 2007.

LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containersless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**. v.17, p. 1234- 1236, 1999.

LANGENDONCKT, V., DONNAY, A., SHUURBIERS, N., AUQUIER, P., CAROLAN, C., MASSIP, A., DESSY, F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Reproduction and Fertility**. V.109, p. 87-93. 1997.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., NORTHEY, D.L., FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 376-383, 1987.

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

LEIBO S.P., MARTINO A., KOBAYASHI S., POLLARD J.W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.45-53, 1996.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, v. 69, p. 37–47, 2008.

LEIVAS, F.G., BRUM, D.S., FIALHO, S.S., SALIBA, W.P, ALVIM, M.T.T., BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., SILVA, C.A.M. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, 2010.

LIEBERMANN, J., DIETL, J., VANDERZWALMEN, P., TUCKER, M.J. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, p. 623-633, 2003.

LIM, K.T., JANG, G. KO, K.H., LEE, W.W., PARK, H.J., KIM, J.J., LEE, S.H., HWANG, W.S., LEE, B.C., KANG, S.K. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v. 67, p. 293-302, 2007.

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

MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12c* CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98, p.293–301, 2007.

MANJUNATHA, B.M., GUPTA, P.S.P., RAVINDRA, J.P., DEVARAJ, M., NANDI, S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. **The veterinarian Journal**, v. 179, p. 287-291, 2009.

MARTÍNEZ, A.G., VALCÁCEL, A., DE LAS HERAS, D.G., MATOS, D.G., FURNUS, C.C., BROGLIATTI, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 11-21, 2002.

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

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals (review). **Reproduction in Domestic Animals**, v 36, p. 49-55, 2001.

MAURER, H.R. Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture. **Animal cell culture: a practical approach**. p. 15±46, 1992.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247, p. 125-142, 1984.

MEHTA, T.S., KIESSLING, A.A. Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. **Biology of Reproduction**, v.43, p.600-606, 1990.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E., MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.183-188, 2001.

MEN, H., AGCA, Y., RILEY, L.K., CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, v. 66, p. 2008-2010, 2006.

MENEZO, Y. Cryopreservation of IVF embryos: Which stage? **Obstetrics and Gynecology**, v. 113, p. 28-32, 2004.

MCEVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction Domestic Animals**, v. 38, p. 268-275, 2003.

MCKIERNAN, S.H., BAVISTER, B.D. Different lots of bovine serum albumin inhibit or stimulate in vitro development of hamster embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 28, p. 154-156,1992.

MOORE, K., BONILLA, A.Q., Cryopreservation of mammalian embryos: The state of the art. **In: Annual Review of Biomedical Sciences**. v. 8, p. 19-32, 2006.

MOORE, K., RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C.J., KRAMER, J.M., JOHNSON, S., WROCLAWSKA, E., GOICOA, S., NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316-1325, 2007.

MORIMOTO, C. KAMEDA, K., TSUJITA, T., OKUDA, H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 120-127, 2001.

NICOLOSI, R.J., ROGERS, E.J., KRITCHEVSKI, D., SCIMECA, J.A., HUTH, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherogenesis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, v. 22, p. 266-277, 1997.

ORSI, N.M., LEESE, H.J. Amino acid metabolism of pre implantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. **Theriogenology**, v. 61, p. 561-572, 2004.

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

PARK, Y., ALBRIGHT, K.J., LIU, W., COOK, M.E., PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v. 32, p. 853-858, 1997.

PARK, Y., STORKSON, K.J., ALBRIGHT, K.J., LIU, W., PARIZA, M.W. Evidence that the *trans-10, cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v. 34, p. 235-241, 1999.

PEGORARO, L.M.C. Efeito das condições de cultivo sobre a proporção macho: fêmea e a congelabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. 1997 117f **Tese Doutorado**. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas-RS, 1997.

PEREIRA, R.M., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., HORTA, A.E.M., PORTUGAL, P.V., BESSA, R.J.B., MARQUES, C.C. Postthawing resistance of bovine embryos is improved by *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (CLA). **In: Proceedings of fifteenth International Congress on Animal Reproduction (ICAR)**, vol. 2, p. 538, 2004.

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

PEREIRA, R.M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., HORTA, A.E.M., SANTOS, I.C., MARQUES, M.R., REIS, A., SILVA PEREIRA, M., MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10, cis12* conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. In vitro matured/in vitro fertilized bovine oocytes can develop into morulae/ blastocysts in chemically defined protein – free culture media. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 736- 742. 1991.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v. 41, p.1241- 1249, 1994.

POLLARD, J.W., LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101- 106, 1994.

PUGH, P.A., ANKERSMIT, A.E.L., MCGOWAN, L.T., TERVIT, H.R. Cryopreservation of in-vitro produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, v. 50, p. 495-506, 1998.

PRYOR, J.H., LOONEYA, C.R., ROMOB, S., KRAEMERC, D.C., LONGC, C.R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, 2010.

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

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M. P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., et al. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66 p. 589-95, 2002.

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

RUSSELI, D.F., BAGIR, S., BORDIGNON, J., BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

RZUCIDLO, S.J., GIBBONS, J., STICE, S.L. Comparison by restriction fragment differential display RT-PCR of gene expression pattern in bovine oocytes matured in the

presence or absence of fetal calf serum. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.90-96. 2001.

SAGIRKAYA, H., MISIRLIOGLU, M., KAYA, A., FIRST, N.L., PARRISH, J.J., MEMILI, E. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 225-240, 2007.

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

SIRARD, M.A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., SOTOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P.B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

STREHLER E, BACCETTI B, STERZIK K, CAPITANI S, COLLODEL G, SANTO DM, et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (*Notulae seminologicae* 13). **Human Reproduction**, v. 13, p. 120-123, 1998.

STRINGFELLOW, D.A., GIVENS, M.D., WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reproduction Fertility and Development**, v. 16, p. 93-102, 2004.

TARIN, J.J. e TROUSON, A.O. Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos . **Biology of Reproduction**, v.49, p.1362-1368, 1993.

TETZNER, T.A.D. **Efeitos da substituição do soro fetal bovino e da albumina sérica bovina pela ovalbumina na produção in vitro de embriões bovinos**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Jaboticabal.

TETZNER, T.A.D., SARAIVA, N.Z., PERECIN, F., OLIVEIRA, C.S., MONTEIRO, F.M., LIMA, M.R., MÉO, S.C., FERREIRA, C.R., GARCIA, J.M. Effects of embryonic fluid and serum replacer as protein sources for in vitro maturation of bovine oocytes. **In: III International Symposium Animal Biology of Reproductive (ISABR)**, v. 7, n. 3, p. 332, 2010.

THIBIER, M. Data retrieval committee annual report. **IETS Embryo Transfer Newsletter**, v. 24, p. 12-18, 2006.

THOMPSON, J.G., ALLEN, N., MCGOWAN, L.T., BELL, A.C.S., LAMBERT, M.G., TERVIT, H.R. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. **Theriogenology**, v. 49, p. 1239-49, 1998.

THOMPSON, J.G., In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 263-275, 2000.

TSANG, W.H., CHOW, K.L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. **Bio Techniques**, v. 46, p. 550-552, 2009.

TSUJII, H., NAKAMURA, Y., HAMANO, K. In vitro effects of insulin on glucose and lipid metabolism in rat embryos. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 185-189, 2002.

UTO, N., YAMAHAMA, Y. The motility and fertility of golden hamster sperm culture in BSA-free medium. **Biology of cell**, v. 88, p. 23-28, 1996.

USHIJIMA, H., YAMAKAWA, H., NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biology of Reproduction**, v.60, p. 535-539. 1999.

VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle, **Theriogenology**, v.45, p. 683-689, 1996.

VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P. GREVE, T., CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 51-53, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.357-364, 2000.

VAJTA G, KUWAYAMA M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-44, 2006.

VANROOSE, G., VAN SOOM, A., DE KRUIF, A. From co-culture to defined medium: state of the art and practical considerations. **Reproductive of Domestic Animals**, v. 36, p.25-28, 2001.

VARAGO, F.C., SALIBA, W.P., ALVIM, M.T.T., VASCONCELOS A.B., OLIVEIRA, C.H., STAHLBERG, R., LAGARES M.A. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. **Animal Reproduction Sciences**. v. 3, n. 3, p. 353-358, 2006.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 915-924, 2007.

VICENTE, J.S., GARCIA-XIMENEZ, F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. **Theriogenology**, v. 42, p. 1205-1215, 1994.

VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., RUBIN, M.I.B., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 45, p. 91–94, 2002.

VIEIRA, A.D., FORELL, F., FELTRIN, C., RODRIGUES, J.L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Production Science**, v. 99, p. 377-383, 2007.

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

VIUFF, D., RICKORDS, L., OFFENBERG, H., HYTTEL, P., AVERY, B., GREVE, T., OLSAKER, I., WILLIAMS, J.L., CALLESEN, H., THOMSEN, P.D. A high proportion of

bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1273-1278, 1999.

VISCONTI, P.E., BAILEY, J.L., MOORE, G.D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129-1150, 1995.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 155-163, 1998.

ZENON Y., PEARL M., BOROCHOV A. & ARAV A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p 35-42, 1999.

WANG, W., DAY, B.N., WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research Techniques**, v.61, p.335-341, 2003.

WARD, F., ENRIGHT, B., RIZOS, D., BOLAND, M., LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v.57, n.8, p. 2105-2117, 2002.

WEATHERSBEE, P.S., POOL, T.B., ORD, T. Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.12, p. 354-360,1995.

WERLICH, D.E., BARRETA, M.H., MARTINS, L.T., VIEIRA, A.D., MORAES, A.N, MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 77-82, 2006.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: ASHWOOD-SMITH M.J., FARRANT J. (Eds). **Low temperature in medicine and biology**, Tumbridge Wells: Pitman Medical, p.65-83, 1980.

WRENZYCKI, C., HERRMAN, D., CARNWAT, 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.

WRIGHT R.W., ELLINGTON J. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, p.1167-1189, 1995.