

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Efeitos da congelação lenta e da vitrificação na viabilidade,  
ultraestrutura e expressão gênica de embriões caninos produzidos “*in vivo*”**

Carlos Renato de Freitas Guaitolini

Botucatu-SP

Julho – 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Efeitos da congelação lenta e da vitrificação na viabilidade,  
ultraestrutura e expressão gênica de embriões caninos produzidos “*in vivo*”**

Carlos Renato de Freitas Guaitolini

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal –  
Curso de Doutorado para obtenção do título  
de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Tit. Maria Denise Lopes

Botucatu-SP

Julho – 2014

Nome do Autor: Carlos Renato de Freitas Guaitolini

**Título: Efeitos da congelação lenta e da vitrificação na viabilidade, ultraestrutura e expressão gênica de embriões caninos obtidos *in vivo*.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Tit. Maria Denise Lopes

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa. Tit. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

UFMG – Belo Horizonte

Profa. Dra. Maricy Apparício Ferreira

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

FCAV – UNESP – Jaboticabal

Data da Defesa: 28 de Julho de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus  
País, por todos os ensinamentos,  
amor e pela força que sempre me  
deram para seguir em frente.*

*Amo vocês.*

*“Somos insignificantes. Por mais que  
você programe sua vida, a qualquer  
momento tudo pode mudar.”*

*Ayrton Senna*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Renato e Lourdes, pela educação e carinho que me deram. Muito obrigado por tudo que sempre fizeram por mim. Amo vocês.

A Rosiara, obrigado por estar ao meu lado, me dando força para que eu não desanimasse.

A Professora Maria Denise Lopes por aceitar me orientar, pela paciência e amizade. Muito Obrigado

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária: Fabiana Ferreira de Souza, João Carlos Pinheiro Ferreira, Frederico Ozanam Papa, Fernanda da Cruz Landim, Nereu Carlos Prestes, Eunice Oba, Sony Dimas Bicudo, Cezinande Meira, Marco Antonio Alvarenga por todos os ensinamentos durante o meu doutorado, muito obrigado.

A equipe de trabalho, que acordava cedo para estar aqui, Rodrigo, Ana Augusta, Camila e Lidia, foram bons os momentos que passamos juntos.

Aos amigos que fizeram parte destes anos, Eduardo (Duroc), Vitor, Marcel (Braxola), Leandro (Alemão), Ian, Lucas, Paulinha e Fabiane.

Aos colegas do laboratório REPAS: Carmen, Jorge, Carla, Gabriele e Carol, obrigado pela companhia.

Aos amigos Mateus José Sudano e Anthony Cesar Castilho foi muito importante a colaboração de vocês neste experimento.

Aos funcionários do DRARV: Edilson, Valter, Edivaldo, Zé Luis e Dona Raquel.

A FAPESP pela concessão da bolsa (2011/08798-6) e auxílio (2012/03912-8) para realização deste trabalho.

## Lista de Tabelas

### *Capítulo 2*

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Média da intensidade de fluorescência e erro padrão (EP) do Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo (IP) dos grupos controle, congelados e vitrificados nos momentos 0 e 24 horas..... | 28 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### *Capítulo 3*

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em embriões caninos..... | 47 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 2: Valores das médias e erro padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes candidatos em blastocistos caninos frescos, congelados/descongelados e vitrificados/aquecidos e após o cultivo <i>in vitro</i> de 24 horas..... | 48 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Blastocistos caninos com citoplasma escuro devido a alta concentração de lipídios. .... | 12 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Capítulo 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Embrião do grupo controle no momento 0h. A – observar a zona pelúcida (ZP); núcleo (n) com membrana íntegra (mn); gotículas lipídicas (gL); retículo endoplasmático rugoso (RER) e espaço perivitelínico (EP). B e C – presença de mitocôndrias (Mt) e microvilosidades (setas). D – microvilosidades (seta) e junções do tipo <i>tight</i> . .... | 28 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2 – Células trofoblásticas caninas. A – Embrião do grupo Co com número grande de gotículas lipídicas no interior dos blastômeros (setas cheias). B – Embrião do grupo Co24 com menor número de gotículas lipídicas e figuras mielínicas (setas) ..... | 29 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3 – Embriões caninos do grupo congelado. A – desorganização do citoplasma (dc) e zona pelúcida (ZP). B – núcleo picnótico (np). C – mitocôndrias degeneradas (Mtd). D – junção de tipo <i>tight</i> (seta) e lesão de membrana nuclear (seta branca). .... | 30 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4 – Embriões caninos do grupo vitrificado. A – presença dos blastômeros (Bl), espaço perivitelínico (EP) e zona pelúcida (ZP). B e C – junções do tipo <i>tight</i> (tj) e mitocôndrias (Mt). C – microvilosidades (Mi) e junções do tipo <i>tight</i> (tj). .... | 31 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 5 – Embriões caninos vitrificados no momento 24h. A – presença da zona pelúcida (ZP) e citoplasma desorganizado (dc). B – núcleo picnótico (np). .... | 32 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## Sumário

|                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Resumo .....</b>                                                                                             | <b>xi</b>  |
| <b>Abstract .....</b>                                                                                           | <b>xii</b> |
| <b>1. Introdução .....</b>                                                                                      | <b>2</b>   |
| <b>2. Hipótese .....</b>                                                                                        | <b>5</b>   |
| <b>3. Objetivo .....</b>                                                                                        | <b>5</b>   |
| <b>3.1. Objetivos específicos.....</b>                                                                          | <b>5</b>   |
| <b>Capítulo 1 .....</b>                                                                                         | <b>6</b>   |
| <b>4. Revisão de Literatura.....</b>                                                                            | <b>7</b>   |
| <b>4.1. Criopreservação embrionária .....</b>                                                                   | <b>7</b>   |
| <b>4.2. Particularidades dos embriões caninos.....</b>                                                          | <b>11</b>  |
| <b>4.3. Avaliação da viabilidade embrionária.....</b>                                                           | <b>13</b>  |
| <b>4.4. Genes relacionados a sobrevivência, transporte de água e solutos e<br/>implantação embrionária.....</b> | <b>15</b>  |
| 4.4.1. Apoptose.....                                                                                            | 15         |
| 4.4.2. Transporte de água e solutos .....                                                                       | 16         |
| 4.4.3. Falhas na formação da blastocle e reexpansão .....                                                       | 18         |
| 4.4.4. Implantação embrionária .....                                                                            | 18         |
| <b>Capítulo 2 .....</b>                                                                                         | <b>20</b>  |
| <b>Viabilidade e ultraestrutura de blastocistos caninos criopreservados produzidos <i>in vivo</i>.....</b>      | <b>21</b>  |
| <b>Resumo .....</b>                                                                                             | <b>22</b>  |
| <b>Introdução .....</b>                                                                                         | <b>23</b>  |
| <b>Material e Métodos.....</b>                                                                                  | <b>24</b>  |
| <b>Resultados.....</b>                                                                                          | <b>27</b>  |
| <b>Discussão.....</b>                                                                                           | <b>32</b>  |
| <b>Referências .....</b>                                                                                        | <b>35</b>  |
| <b>Capítulo 3.....</b>                                                                                          | <b>39</b>  |
| <b>Expressão gênica de blastocistos caninos criopreservados produzidos <i>in vivo</i> .....</b>                 | <b>40</b>  |
| <b>Resumo .....</b>                                                                                             | <b>41</b>  |
| <b>Introdução .....</b>                                                                                         | <b>42</b>  |
| <b>Material e Métodos.....</b>                                                                                  | <b>43</b>  |

|                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Resultados.....</b>                                                                   | <b>47</b>  |
| <b>Discussão.....</b>                                                                    | <b>48</b>  |
| <b>Referências .....</b>                                                                 | <b>52</b>  |
| <i>Considerações Finais .....</i>                                                        | <i>57</i>  |
| <b>6. Considerações Finais .....</b>                                                     | <b>58</b>  |
| <i>Referências.....</i>                                                                  | <i>59</i>  |
| <b>Referências .....</b>                                                                 | <b>60</b>  |
| <i>Anexos .....</i>                                                                      | <i>73</i>  |
| <b>Anexos.....</b>                                                                       | <b>74</b>  |
| <b>Manual Kit de Extração RNeasy Micro Kit.....</b>                                      | <b>74</b>  |
| <b>Manual Kit de Amplificação RiboAmp HS Plus .....</b>                                  | <b>74</b>  |
| <b>Normas para publicação no periódico <i>Theriogenology</i> .....</b>                   | <b>81</b>  |
| <b>Normas para publicação no periódico <i>Reproduction in Domestic Animals</i> .....</b> | <b>101</b> |

## Resumo

Objetivou-se com este estudo comparar os efeitos da congelação lenta vs vitrificação sobre a viabilidade, ultraestrutura e expressão gênica de blastocistos caninos produzidos *in vivo*. A coleta dos embriões foi realizada por lavagem uterina 12 dias após a primeira IA. A congelação lenta foi realizada em máquina programável e a vitrificação pela técnica do *cryotop*. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado por 24 horas, em meio SOFaa acrescido de 20% de soro fetal bovino. A reexpansão embrionária foi avaliada 24 horas após a CIV e a viabilidade embrionária avaliada com o uso das sondas Hoscht 33342 e Iodeto de propídeo. A extração e amplificação do RNA foram realizadas segundo recomendações do fabricante. Foram utilizados 70 blastocistos separados nos grupos Co, Co24, Cg, Cg24, Vi e Vi24. No experimento I foram utilizados 34 embriões. Não foi evidenciada reexpansão da blastocle após 24 horas de CIV nos grupos Cg24 e Vi24, já no grupo Co24, 100% dos embriões reexpandiram. Não foi verificada diferença na intensidade da fluorescência do Hoescht entre os grupos Co, Cg e Vi, em ambos os momentos de avaliação, 0 e 24 horas. Quando comparada a intensidade do iodeto de propídeo (IP) foi observada diferença significativa entre o grupo Co em relação aos grupos Cg e Vi, independente da metodologia de criopreservação. Observou-se uma redução na quantidade de gotas lipídicas após 24 horas de CIV comparando-se os grupos Co e Co24. No grupo Vi foram observadas mitocôndrias alongadas, integridade da membrana dos blastômeros e nuclear, retículo endoplasmático liso, vesículas de digestão, microvilosidades, junções do tipo *tight* e desmossomas. No Experimento II, foram utilizados 36 embriões para a avaliação da expressão gênica. Todos os genes estudados, com excessão do LIF, foram expressos. Entretanto, não houve diferença na expressão dos genes BAX, Bcl2, AQP3,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\alpha 1$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\beta 1$  e LIFr, nos momentos 0 e 24 horas dentro dos grupos. Podemos concluir que a vitrificação foi a melhor metodologia de criopreservação para embriões de cadelas pela análise ultraestrutural. E não foi possível, entretanto, a comparação da expressão gênica dos genes candidatos entre os embriões caninos congelados e vitrificados, uma vez que os resultados podem ter sido influenciados pela amplificação do RNA.

**Palavras chave:** blastocisto, criopreservação, cão.

## Abstract

The purpose of this study was to compare the effects of slow freezing versus vitrification in canine embryo produced in vitro: viability, ultra structure and gene expression. Embryos collection was performed using uterus flush technique 12 days after the first AI. For slow freezing protocol we used a programmed machine and vitrification was performed using *cryotop*. In vitro culture (IVC) was conducted for 24 hours using SOFaa added with 20% of fetal bovine serum. Embryo expansion was evaluated 24 hours after in vitro culture (IVC) and embryo viability was evaluated using Hoescht 33342 and iodine propidium (PI). Extraction and amplification of the RNA was performed according to manufacturer recommendations. We used 70 blastocysts divided in groups: Co, Co24, Cg24, Vi and Vi24. In experiment I 34 embryos were used. No blastocoele expansion was observed after 24 hr of IVC in groups Cg24 and Vi24, however 100% of embryos expanded in Co24. No difference was observed in Hoescht staining intensity between Co, Cg and Vi groups, which were observed at the 0 and 24 hr periods. The iodine propidium (PI) intensity in Co was different when compared to Cg and Vi, independent of the cryopreservation method used. A reduction in the quantity of lipid drops was observed after 24 hr of IVC when comparing groups Co and Co24. In group Vi, elongated mitochondria, membrane and nuclear integrity of blastomere, smooth endoplasmic reticulum, vesicle digestion, microvilli, tight junctions and types of desmosomes were observed. In experiment II, 36 dog embryos were used for gene expression evaluation. All studied genes, except LIF were expressed. However no difference between gene expression of BAX, Bcl2, AQP3, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases  $\alpha$ 1, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases  $\beta$ 1 and LIFr were observed at 0 and 24h in all groups. We concluded that the vitrification technique was the best method to cryopreserve canine embryo when we observe ultrastructure. However, it was not possible to compare expression of candidate genes between frozen and vitrified dog embryos, due to possible influence of the RNA amplification.

**Keywords:** blastocysts, cryopreservation, dog

# *Introdução*

## 1. Introdução

Diversos animais domésticos e de laboratório foram produzidos nos últimos 50 anos com uso de gametas e embriões criopreservados. Esta metodologia é aplicada com maior frequência e urgência para conservar material genético e descendente de animais em vias de extinção, pela formação de “bancos genômicos” ou “zoológicos congelados”. Leibo e Songsasen (2002) afirmaram que métodos padrões de criopreservação podem funcionar de forma temporária de preservar germoplasma de espécies não domésticas, até que se adquiram maiores conhecimentos sobre estas espécies.

No caso dos carnívoros, por estarem no topo da cadeia alimentar, existe grande importância ecológica na criopreservação de seu material biológico, pois regulam a população de presas naturais e, desta forma, influenciam toda a dinâmica do ecossistema em que vivem. Algumas espécies de canídeos brasileiros estão classificadas como ameaçadas ou quase ameaçadas de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) e o IBAMA, destacando-se: o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o cachorro-do-mato (*Speothos venaticus*) e o cachorro-do-mato-de-orelha-curta (*Atelocynus microtis*) (PLANO DE AÇÃO, 2004).

Wildt (1989) afirma que a manutenção da diversidade genética nas espécies é dependente de sua reprodução. Assim, a técnica de reprodução assistida apresenta-se como uma das ferramentas mais importantes utilizadas nos programas de conservação (MATTOS, 2004). Deste modo, cães e gatos vêm sendo utilizados como modelos comparativos para estudos, objetivando-se a aplicação dos conhecimentos obtidos nestas espécies, em carnívoros selvagens (LUVONI, 2000). Técnicas de manipulação de gametas, cultivo embrionário e criopreservação de embriões, utilizando o cão como modelo experimental, pode levar ao desenvolvimento de técnicas que permitam preservar importante material genético de canídeos (HEWITT e ENGLAND, 2001).

A partir deste estudo, outras técnicas para a criopreservação de germoplasma vêm sendo aprimoradas, sendo que as mais utilizadas são a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é a primeira técnica de criopreservação desenvolvida (WHITTINGHAM, 1971; WHITTINGHAM et al., 1972; WILMUT, 1972). Nesta técnica, o germoplasma é lentamente exposto a baixas concentrações de crioprotetor penetrante. Já a técnica de vitrificação, que nos últimos anos tem ganhado muitos adeptos, três fatores são importantes: a taxa de congelação, viscosidade do meio no qual

o embrião está diluído e o volume; sendo que volumes menores têm mais possibilidade de vitrificar melhor (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

Uma vez congelado ou vitrificado, o germoplasma pode ser armazenado por longos períodos de tempo, sem nenhuma alteração. A criopreservação de embriões humanos por 20 anos não demonstrou efeitos nocivos sobre os parâmetros avaliados após a descongelação – sobrevivência pós-descongelação, taxas de implantação, gestação, abortamentos e nascimentos (RIGGS et al., 2010). Enquanto muito progresso tem sido verificado na criopreservação de germoplasma na medicina, na indústria bovina e nos animais de laboratório, nos demais mamíferos o avanço tem ocorrido de forma mais lenta.

O sucesso da criopreservação de embriões depende, em parte, da tolerância dos embriões a crioinjúrias. Um dos problemas mais sérios da criopreservação dos embriões caninos é a grande quantidade de lipídios no interior do citoplasma. As partículas lipídicas são semelhantes às observadas em embriões suínos e bovinos, entretanto, a densidade lipídica é mais elevada nos embriões caninos.

A criopreservação de embriões caninos e subsequente transferência pode ser relevante na tecnologia reprodutiva, permitindo otimizar o transporte e o armazenamento de material genético e auxiliar na eliminação de doenças verticalmente transmitidas.

Em vista do exposto fica clara a importância do estudo da criopreservação de embriões caninos, devido ao grande potencial desta tecnologia como ferramenta na conservação de material genético de canídeos ameaçados de extinção.

# *Hipótese e Objetivo*

## 2. Hipótese

Embriões caninos vitrificados e aquecidos apresentam uma viabilidade superior aos embriões submetidos à congelção lenta.

## 3. Objetivo

Objetiva-se com este estudo comparar os procedimentos de criopreservação – **congelção lenta x vitrificação** de embriões caninos produzidos *in vivo* e avaliar o efeito desses procedimentos na viabilidade, ultraestrutura e expressão gênica desses embriões.

### 3.1. Objetivos específicos

1. Viabilidade e ultraestrutura de blastocistos caninos criopreservados produzidos *in vivo*;
2. Expressão gênica de blastocistos caninos criopreservados produzidos *in vivo*.

# *Capítulo 1*

#### **4. Revisão de Literatura**

Em 1972, Whittingham et al. relataram o primeiro nascimento de filhotes por transferência de embriões criopreservados. Estes autores congelaram embriões de camundongos utilizando o dimetil sulfoxido (DMSO) e glicerol como crioprotetores, em uma taxa lenta de resfriamento de 0,3 a 2°C / minuto e temperatura de descongelação de 4 a 25°C. Neste experimento, 921 embriões foram transferidos para 118 fêmeas e apenas 13 fêmeas ficaram prenhes e nasceram 57 filhotes. Assim, concluiu-se que esta técnica pode ser utilizada em outras espécies de mamíferos.

Desde o sucesso da primeira congelação de embriões em mamíferos, dois métodos são os mais utilizados, a congelação lenta e a vitrificação. Com algumas exceções, os processos de armazenamento, congelação e hidratação não diferem entre os métodos, mas a maior diferença entre eles são os crioprotetores e a curva de congelação utilizados (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Blastocistos apresentam alguns desafios a criopreservação, a entrada do crioprotetor é relativamente lenta devido a sua estrutura multicelular, a zona pelúcida representa uma barreira que impede a entrada do crioprotetor de forma adequada a todos os blastômeros e a blastocle desidrata insuficientemente durante a congelação ou antes da vitrificação. Como resultado de um ou todos os desafios acima, há possibilidade de danos embrionários resultantes da formação de cristais de gelo (KARDER et al., 2010).

##### **4.1. Criopreservação embrionária**

A congelação lenta é o método no qual a concentração de crioprotetor intracelular é baixa, a água extracelular cristaliza resultando num gradiente osmótico que retira água do compartimento intracelular. Já na vitrificação a taxa de congelação é rápida e a concentração de crioprotetor intracelular é alta (ARAV, 1992; SEKI e MAZUR, 2009), ambos os compartimentos intra e extracelular aparentemente vitrificam após a ocorrência da desidratação. Apesar dessas diferenças, os termos congelação/descongelação são relevantes ao processo de congelação lenta, enquanto os termos vitrificação/reaquecimento são relacionados a vitrificação.

Os embriões podem ser submetidos a diferentes taxas de diminuição de temperatura, denominadas quantitativamente como lenta e rápida. Essas taxas exercem

um efeito importante sobre a formação dos cristais de gelo. Na taxa de resfriamento lenta, os cristais de gelo se formam lentamente e se transformam em grandes cristais; os solutos permanecem diluídos em canais entre os cristais de gelo. Em taxas de resfriamento rápidas, os cristais de gelo se formam mais rapidamente, de modo que os cristais são menores, mas os solutos concentram-se ainda mais nos canais (LEIBO, 2008).

Os protocolos de congelação lenta envolvem a utilização de crioprotetor intracelular ou a combinação de crioprotetores intra e extracelular (DOBRINSKY, 2002).

Os crioprotetores intracelulares ou penetrantes possuem baixo peso molecular e são completamente miscíveis em água. Nesta categoria estão o glicerol (PM = 92,1), etilenoglicol (PM = 62,1), dimetilsulfóxido (DMSO) (PM = 78,2), propilenoglicol (PM = 76,1), metanol (PM = 32) e propanodiol (PM = 76,09) (NIEMANN, 1991). Esses crioprotetores substituem a água intracelular nas células embrionárias antes da congelação e, combinada com taxas de congelação lenta e controlada, reduzem o volume celular minimizando a formação de cristais de gelo em seu interior (PALASZ e MAPLETOFT, 1996). A taxa de permeabilidade do crioprotetor pode se modificar, em vista das diferenças nas dimensões moleculares desses compostos, propriedades das membranas celulares, estágio de desenvolvimento embrionário e espécie estudada (LEIBO, 2008).

Os crioprotetores extracelulares ou não penetrantes, possuem alto peso molecular e são representados pela sacarose (PM = 342,3), glicose (PM = 181,1), trealose (PM = 378,3) (CROWE, 1983; PALASZ e MAPLETOFT, 1996). A ação desses crioprotetores é baseada na desidratação das células embrionárias antes da congelação o que resulta na redução da formação de cristais de gelo. Geralmente esses crioprotetores são combinados com os crioprotetores intracelulares, para uma proteção efetiva durante o processo de congelação (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Os métodos de congelação lenta se desenvolveram à medida que dados relativos a permeabilidade da membrana plasmática dos embriões à água e aos crioprotetores em diferentes temperaturas foram disponibilizados. Estes protocolos geralmente constam de uma curva de congelação controlada (-0,3 a -0,6°C/minuto) até -6°C/ -7°C, induzindo nesta temperatura a cristalização, com o objetivo de evitar a formação de grandes cristais de gelo no interior das células, o que causaria danos físicos e morte celular, até a temperatura de -32°C/-35°C. O espaço extracelular é congelado primeiro e as células

são desidratadas gradualmente durante o resfriamento (DINNYES et al., 2006).

Um equilíbrio intracelular deve ser mantido para evitar danos como a formação de cristais de gelo, choque osmótico, efeitos tóxicos dos crioprotetores, danos por resfriamento, rompimento da zona pelúcida ou do embrião, alterações do citoesqueleto e organelas intracelulares (VAJTA, 2000; PYLES, 2002; DINNYES et al., 2006; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Todos os protocolos de congelação lenta são destinados a proteger os embriões contra a formação intracelular de cristais de gelo durante a congelação e a recristalização durante a descongelação. A fim de evitar a formação de cristais de gelo, a água intracelular é normalmente substituída pelos crioprotetores permeáveis e os embriões são desidratados pela taxa de resfriamento lento. A recristalização costuma não ocorrer durante a descongelação devido a rápida taxa de aquecimento. As técnicas de congelação utilizadas permitem o sucesso da criopreservação de embriões de diferentes espécies de animais domésticos (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

De acordo com Vajta (2000), a vitrificação é definida como a solidificação de uma solução a baixa temperatura sem a formação de cristais de gelo. Isso é conseguido pelo aumento da viscosidade da solução crioprotetora associado à alta velocidade de resfriamento. Diferentemente da congelação lenta que requer equipamentos sofisticados para manipulação das taxas de congelação, a vitrificação pode ser realizada em condições de campo sem necessidade de equipamentos especiais, tornando-se uma alternativa para uso em diversos locais como zoológicos, laboratórios pouco equipados ou em fazendas. Entretanto, para a realização da vitrificação há necessidade de grande experiência do técnico (VAJTA, 2000; DINNYES, et al., 2006).

Embora a vitrificação possa apresentar taxa de sobrevivência embrionária *in vivo* e *in vitro* melhores que a congelação lenta, Vajta (2000) elencou vários fatores responsáveis pela pouca difusão da técnica: tais como altas taxas de prenhez na congelação lenta de embriões de ruminantes; variação dos resultados de vitrificação, além da falta de uma técnica padronizada para os profissionais de campo; vantagens práticas relativas já que, a vitrificação individual de uma palheta pode durar menos de três minutos, mas ao se congelar 15 a 25 embriões, o tempo e o trabalho pode ser maior que na congelação lenta.

O equilíbrio necessário para a o sucesso da vitrificação depende de um sistema seguro de resfriamento e aquecimento e um sistema que minimize os efeitos tóxicos e osmóticos das altas concentrações de crioprotetores (VAJTA e NAGY, 2006). O

aumento de danos causados pelos efeitos osmóticos e tóxicos pode ser diminuído ou evitado quando se utiliza uma breve exposição ao crioprotetor e uma rápida velocidade de resfriamento, evitando a temperatura crítica de +15° a -5°C, dessa forma, os danos causados a estruturas ricas em lipídios e citoesqueleto diminuem (PYLES, 2002).

Há vários métodos de vitrificação descritos na literatura entre eles o *open pulled straw* (OPS), *cryoloop*, *cryotop*, malha de náilon (VAJTA e NAGY, 2006). O método OPS foi desenvolvido por Vajta et al. (1997) e nessa técnica os tampões de algodão das palhetas francesas de 0,25 mL foram removidos e as palhetas amolecidas em sua região central e esticadas manualmente até que o diâmetro interno e a espessura da parede sejam reduzidas pela metade do tamanho original. O envasamento dos embriões deve ser realizado por capilaridade e imediatamente submerso em nitrogênio líquido. As taxas de congelamento com este método chegam a 20.000°C/minuto (VAJTA, 2000). Dentre os princípios da técnica, buscou-se diminuir o volume do crioprotetor ao se diminuir o diâmetro da palheta (VAJTA e NAGY, 2006).

Em um dos métodos clássicos de vitrificação descritos, os embriões são inicialmente colocados por dois minutos em um meio de equilíbrio contendo DMSO (12,5%) associado a etilenoglicol (12,5%). Em seguida os embriões são transferidos por 30 segundos para o meio de vitrificação composto de DMSO (25%) e etilenoglicol (25%), ao mesmo tempo em que são envasados. As palhetas são expostas ao vapor de nitrogênio líquido e em seguida imersas. O aquecimento é realizado em banho maria a 20°C; imediatamente as palhetas são agitadas. Os embriões permanecem por cinco minutos no interior da palheta e em seguida são rehidratados em solução de 0,5M de sacarose (REICHENBACH et al., 2002).

Dinnyes et al. (2006) relataram que na vitrificação os danos causados nas membranas pelo resfriamento e formação de gelo são variáveis. Em revisão publicada por estes autores foi relatado sucesso na vitrificação de mórula e blastocisto pelo método de OPS, demonstrando que com o aperfeiçoamento da técnica, embriões suínos em estádios precoces de desenvolvimento podem ser criopreservados com sucesso.

A eficácia da congelamento lenta e vitrificação foi comparada por Zander-Fox et al. (2013) em mórulas e blastocistos de ratos. Taxas de sobrevivência e desenvolvimento embrionário foram maiores nos embriões vitrificados quando comparadas aos congelados e os blastocistos congelados apresentaram uma redução no número de células quando comparados ao grupo controle (embriões frescos). As taxas de implantação dos embriões foram similares nos dois métodos de criopreservação.

Foram observadas placentas mais leves no grupo de embriões congelados lentamente (115,95 mg) quando comparados ao grupo controle (122,0 mg) e vitrificado (125,25). Os autores concluíram que a vitrificação de mórulas e blastocistos apresentou resultados de sobrevivência e desenvolvimento embrionário superiores quando comparada a congelação lenta.

Stinshoff et al. (2011) estudaram a taxa de reexpansão da blastocela, número de células e expressão de oito genes de embriões bovinos congelados, vitrificados e frescos. Os embriões foram produzidos *in vitro* e avaliados 24 e 48 horas após a descongelação ou aquecimento. O número de células embrionárias não diferiu entre os embriões criopreservados e o grupo controle. Porém, houve uma diferença na expressão em quatro de oito genes avaliados no grupo vitrificado, e em seis de oito genes no grupo congelado, ambos em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que mesmo sem alteração morfológica em relação a metodologia de criopreservação, houve uma alteração dos genes expressos e um melhor resultado para a vitrificação.

#### **4.2. Particularidades dos embriões caninos**

O citoplasma do embrião canino (Figura 1) é particularmente rico em lipídios, e as chances de sucesso na criopreservação parecem remotas (LEE et al., 2006, CHASTANT-MAILLARD et al., 2010). Além da maior sensibilidade causada pelos lipídios, o estágio de desenvolvimento e a origem dos embriões (*in vivo* x *in vitro*) também afeta o resultado da criopreservação (ABE et al., 2004, DINNYES et al., 2006).

O acúmulo e a fonte de lipídios no citoplasma dos blastômeros caninos ainda não estão claros. A maioria dos lipídios é derivada dos triglicerídeos presentes nas lipoproteínas do soro sanguíneo (ABE et al. 2002). Este acúmulo de lipídios foi reportado também por Leibo et al. (1993) em embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios suplementados com soro. Embriões com menor teor lipídico no citoplasma são mais resistentes a criopreservação, diferindo daqueles com maior teor lipídico, que se apresentam mais densos e escuros (TOMINAGA et al, 2000; VAJTA, 2006).

De acordo com Ferguson e Leese (1999) as fontes de energia utilizadas pelo embrião são o glicogênio e lipídios. Os lipídios são componentes da membrana celular e do citoplasma desempenhando um papel importante como fonte de energia necessária para o desenvolvimento do embrião (ROMEK et al., 2008). O glicogênio é a forma de

armazenamento da glicose, também uma importante fonte de energia metabólica que pode ser facilmente mobilizado quando necessário (VOET e VOET, 2006).



Figura 1 – Blastocistos caninos com citoplasma escuro devido a alta concentração de lipídios.

O glicerol foi utilizado como crioprotetor de embriões caninos por Kim et al. (2002) que realizaram transferência de 17 embriões, sendo oito mórulas, um blastocisto e oito gástrulas, criopreservados por congelação lenta. As estruturas foram transferidas para três cadelas das quais não se obteve nenhuma gestação. Os autores, nesse trabalho, não avaliaram a viabilidade embrionária pós-descongelação.

Luz et al. (2011) avaliaram a taxa de sobrevivência *in vitro* de embriões caninos produzidos *in vivo* e criopreservados em glicerol 10% e etilenoglicol 3,0M. Após a descongelação, 9/11 (81,8%) embriões criopreservados em etilenoglicol apresentaram ruptura de zona pelúcida e 2/11 (18,2%) apresentaram-se intactos. Já 90% (9/10) dos embriões criopreservados em glicerol apresentaram-se intactos. Todos os embriões intactos (n = 11) apresentaram-se morfologicamente normais quando avaliados em estereomicroscópio. Estes embriões foram cultivados em meio SOF por sete dias a 38,3°C e avaliados a cada 24 horas. Após a última avaliação, a taxa de eclosão para ambos os crioprotetores foi de 0,0%.

### 4.3. Avaliação da viabilidade embrionária

O estudo da viabilidade celular após a descongelação embrionária é uma forma de avaliação *in vitro* dos métodos de criopreservação. Dentre as técnicas utilizadas para a avaliação *in vitro* pós-descongelação de embriões criopreservados, destaca-se a microscopia de luz, a microscopia eletrônica, a microscopia confocal e a técnica de TUNEL. Para a avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro*, utilizam-se a avaliação da taxa de reexpansão da blastocele e o uso de sondas fluorescentes (HARDY, 1997).

Avaliação embrionária ainda é um dos aspectos mais subjetivos e qualitativos, e os padrões utilizados variam de acordo com os pesquisadores. Embriões com qualidade excelente e boa geram maiores taxas de prenhez, ao contrário de embriões com baixa qualidade. Porém há diferenças nas características ultraestruturais entre embriões classificados como alta ou baixa qualidade (LINDNER e WRIGHT, 1983).

A associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 foram utilizadas para estimar a quantidade de células vivas e mortas em embriões bovinos produzidos *in vitro*. As células mortas são permeáveis ao IP e se coram em vermelho ou laranja, já as células vivas possuem membrana celular intacta e se coram pelo Hoechst em azul. Este método permite uma correlação entre as células vivas e mortas, contudo pode ocorrer uma análise subestimada das células mortas se estas estiverem circundadas por células vivas, pois impede a penetração do IP (PRYOR et al., 2011).

No trabalho publicado por Guaitolini et al. (2012) estas sondas acima descritas foram utilizadas para avaliação de embriões caninos criopreservados em glicerol 1,0M e etilenoglicol 1,5M, e também após o cultivo de 72 e 144 horas. Foram considerados viáveis os embriões que possuíam mais de 50% de blastômeros corados pelo Hoescht. Não foi observado efeito do crioprotetor sobre a viabilidade embrionária pós-descongelação. Imediatamente após a descongelação 62,3% dos blastômeros estavam viáveis. No grupo avaliado após seis dias de cultivo 66,5% das células estavam viáveis, menor número de células viáveis (56,9%) foi observada no grupo avaliado após três dias de cultivo. Os autores sugeriram que o tempo maior de cultivo favoreceu a recuperação celular.

Abe et al. (2011) utilizaram o *cryotop* para criopreservação de embriões caninos. Para avaliação da viabilidade pós-aquecimento foi utilizada a sonda fluorescente IP.

Neste estudo foram considerados viáveis os embriões que apresentaram 75% ou mais de células negativas ao IP (coradas em vermelho). Após a avaliação 50% e 40% das mórulas e blastocistos, respectivamente, apresentaram-se viáveis. Uma taxa maior de viabilidade foi verificada em embriões nos estágios de 1 a 16 células (90 a 100%). Os autores concluíram que a vitrificação é um método eficiente para a criopreservação de embriões caninos.

A ultraestrutura de embriões caninos frescos coletados *in vivo* foi descrita por Landim-Alvarenga e Bicudo (1997). Os blastocistos apresentaram espaço perivitelínico estreito, e a superfície apical das células trofoblásticas ainda estavam cobertas por microvilosidades e possuíam junções do tipo *tight*. A principal característica dos embriões estudados foi um grande número de grânulos de lipídios e mitocôndrias pequenas. Os autores sugeriram que estes grânulos poderiam ser um reservatório nutricional importante para a sobrevivência do embrião durante seu desenvolvimento inicial.

Bettencourt et al. (2009) investigaram as alterações ultraestruturais induzidas pela vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo* nas fases de mórula e blastocisto. Após a vitrificação, os blastocistos de grau 1 mostraram uma excelente preservação da zona pelúcida, do trofoderma e da massa celular interna. Não foram encontradas diferenças entre as células do trofoderma e massa celular interna, com exceção da presença de microvilosidades nas células trofoderma externo. Junções intracelulares intactas, junções do tipo *tight e gap* e desmossomas, foram observadas em todas as células, incluindo entre o trofoderma e a massa celular interna. O citoplasma continha mitocôndrias com numerosas cristas transversais, cercada por cisternas do retículo endoplasmático liso e rugoso, os complexos de Golgi mais abundantes e bem desenvolvidos e gotículas lipídicas.

Dalcin et al. (2013) avaliaram a ultraestrutura de embriões ovinos produzidos *in vivo* congelados ou vitrificados, e as alterações encontradas foram similares, redução do contato entre microvilosidades e zona pelúcida em blastocistos, menor número de desmossomas visíveis, áreas citoplasmáticas sem organelas, retículo endoplasmático liso e mitocôndrias edemaciadas, complexo de Golgi presente em diferentes locais do citoplasma, nem sempre próximo ao núcleo. Apenas no grupo vitrificado foi observado vesículas que ocupavam grandes áreas do citoplasma e células degeneradas entre células embrionárias viáveis.

De acordo com Abe et al. (2002) mudanças na estrutura e desenvolvimento

mitocondrial foram observadas em embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estádios de mórula e blastocisto. Mitocôndrias maduras e alongadas foram encontradas em mórulas e blastocistos cultivados em meios sem a adição de soro, diferentemente das cultivadas em meio com soro fetal que apresentaram mitocôndrias ainda imaturas. O mesmo foi encontrado nas mitocôndrias de embriões ovinos cultivados em meio SOF suplementado com soro humano, e a degeneração embrionária foi ainda maior quando acrescentado albumina sérica bovina e aminoácidos. Desta forma, os autores concluíram que a presença de soro causa efeitos adversos na estrutura e atividade metabólica das mitocôndrias.

#### **4.4. Genes relacionados a sobrevivência, transporte de água e solutos e implantação embrionária**

A avaliação do perfil de expressão de genes relacionados com a apoptose celular (BAX e Bcl2), transporte de água e solutos (AQP3), falhas na formação e reexpansão da blastocle ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ ), implantação embrionária (LIF e LIFr) também podem ser utilizados na avaliação *in vitro* dos métodos de criopreservação embrionária.

##### **4.4.1. Apoptose**

A apoptose ou morte celular programada é caracterizada por contração celular, fragmentação do DNA e segmentação da célula. A família Bcl-2 é dividida em duas classes: os membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, que protegem as células da apoptose, e os membros pró-apoptóticos, como Bax, que desencadeiam a apoptose. Interações entre os genes pró e anti-apoptóticos determinam o início ou não da apoptose (BORNER, 2003).

O estresse celular induz os membros pró-apoptóticos, BAX, a translocar do citosol para a mitocôndria, onde induzem a liberação do citocromo c, enquanto que os anti-apoptóticos, Bcl-2, evitam a liberação do citocromo c na mitocôndria, e desse modo preservam a célula (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN 2001).

A presença de blastômeros apoptóticos em embriões no estágio de pré-implantação tem sido descrito em várias espécies. Estes blastômeros apoptóticos são

observados na massa celular interna, predominantemente, tanto nos embriões produzidos *in vitro* como nos *in vivo* (GJORRET et al., 2007, WARZYCH et al., 2007). No decorrer do desenvolvimento embrionário a elevação dos blastômeros apoptóticos é indicativa de que os próprios embriões são capazes de remover as células com um potencial inapropriado, regulando a diferenciação celular (DE LA FUENTE e KING, 1997).

No estudo realizado por Turathum et al. (2010) foi avaliada a expressão dos genes Bcl-2 e BAX em oócitos caninos submetidos à vitrificação. Os resultados evidenciaram uma expressão constante dos genes em ambos os grupos, oócitos controle e vitrificados. O gene Bcl2, entretanto, mostrou-se mais fortemente expresso no grupo vitrificados/aquecidos, quando comparado ao controle, e o BAX não foi expresso em 0, 24 e 48 horas de cultivo. Os autores concluíram que a expressão diferencial do gene Bcl2 observada no grupo vitrificados/aquecidos, pode ser utilizada para prever a qualidade e a capacidade de desenvolvimento de oócitos imaturos caninos vitrificados.

#### **4.4.2. Transporte de água e solutos**

Os canais de aquaporinas (AQPs) estão distribuídos em animais e plantas, e mediam o movimento transmembrana da água, para manutenção do fluido celular e o balanço osmótico. Foram identificados dois grupos (ou subfamílias) na família aquaporina: as aquaporinas (AQPs 0, 1, 2, 4, 5 e 6), que são consideradas canais específicos de água e as aquagliceroporinas (AQPs 3, 7, 8, 9 e 10), que além de serem permeáveis à água, são também a outras pequenas moléculas, como os crioprotetores (BENGA, 2009).

Há uma alta expressão de genes AQPs no sistema reprodutivo de mamíferos participando ativamente do crescimento folicular, espermatogênese, formação e desenvolvimento embrionário e implantação (NONG et al., 2007). Para confirmar a hipótese que as aquaporinas estão presentes nas células do trofoderma de embriões pré-implantação, Offenbergl et al. (2000) encontraram RNA mensageiro (mRNA) das aquaporinas 1, 3, 5, 6, 7 e 9 nos embriões de camundongos a partir do estágio de uma célula até blastocisto. Este resultado confirma a presença destas AQPs durante o desenvolvimento pré-implantação em camundongos. A AQP3 parece apresentar uma maior contribuição no movimento rápido de água em mórulas e blastocistos de

camundongos (EDASHIGE e KASAI, 2007).

Nong et al. (2013) compararam a expressão da AQP3 em embriões de camundongos, nos estágios de 8 células, mórulas e blastocistos, antes e após a vitrificação, por imunofluorescência. Observou-se alta expressão nos três estágios embrionários estudados, antes e após a vitrificação, porém houve uma diferença no local de expressão. Nos embriões de oito células, o sinal fluorescente específico para AQP3 apresentava-se distribuído no citoplasma e mais fortemente expresso na carioteca dos blastômeros. Nas mórulas, apresentava-se distribuído uniformemente ao longo da membrana plasmática de cada blastômero, e em blastocistos, ao longo da membrana plasmática, citoplasma das células trofoblásticas e na blastocèle. Após o aquecimento a localização da AQP3 em mórulas e blastocistos foi semelhante ao grupo controle, todavia, nos embriões de oito células a AQP3 se manteve no citoplasma mas não foi observada na carioteca. Os autores concluíram que a AQP3 variou de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário, provavelmente desempenhando um papel ativo na manutenção do equilíbrio da pressão osmótica durante congelamento e descongelamento de embriões, especialmente no estágio de mórula.

A AQP3 tem papel importante no movimento da água, crioprotetores e na criotolerância de mórulas de camundongos. Alterações na permeabilidade dos crioprotetores não foram observadas em embriões de camundongos, bovinos e ratos. A expressão dos canais permeáveis a água e aos crioprotetores aumenta durante o estágio de desenvolvimento embrionário inicial em várias espécies. Esta expressão é alterada na permeabilidade aos crioprotetores e consequentemente na criotolerância dos embriões congelados e ou vitrificados (EDASHIGE e KASAI, 2007).

Blastocistos são mais permeáveis a água e aos crioprotetores provavelmente pela presença da blastocèle, quando comparado as mórulas. Blastocistos de camundongos possuem uma distribuição heterogênea da AQPs na membrana plasmática do trofoderma e no interior da massa celular (BARCROFT et al., 2003), sugerindo diferenças na permeabilidade das membranas do mesmo embrião (EDASHIGE e KASAI, 2007). Camargo et al. (2005) observaram que embriões bovinos produzidos *in vivo*, com maior resistência a criopreservação, apresentaram maior expressão do gene aquaporina 3 (AQP3).

#### 4.4.3. Falhas na formação da blastocele e reexpansão

A bomba de sódio e potássio tem um importante papel na diferenciação do trofoderma e na cavitação do embrião. Essa enzima, presente em todos os estágios de desenvolvimento embrionário pré-implantação, utiliza energia proveniente da hidrólise do ATP para transportar  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana em direções opostas, com o objetivo de manter elevado o gradiente eletroquímico de ambos os cátions. As  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases possuem uma subunidade catalítica,  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ ), e uma subunidade não catalítica e glicosada,  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ), que é necessária para a maturação funcional e estrutural da subunidade  $\alpha$  (MACPHEE et al., 2000). Falhas na expansão e/ou reexpansão da blastocele em embriões bovinos, após a criopreservação, podem estar relacionadas a alterações na expressão do gene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (VIANA, 2009).

As subunidades de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  se acumulam durante o desenvolvimento embrionário em ratos, como produto da transcrição embrionária (WATSON e BRACROFT, 2001). Transcritos da subunidade  $\alpha 1$  parecem estar presentes a partir do estágio de duas células até blastocistos (LATHAM et al., 1999). Já mRNA da subunidade  $\beta 1$  não foi encontrado em mórulas, apenas em blastocistos. Resultado diferente do descrito por MacPhee et al. (1998) que encontraram níveis baixos de mRNA da subunidade  $\beta 1$  que persiste nos estádios iniciais de clivagem e aumentam até o estágio final de mórulas.

A maior expressão da subunidade  $\beta 1$  está relacionada com a implantação e o início da formação da blastocele. Este resultado já foi demonstrado em embriões bovinos e de camundongos (BETTS et al., 1998). Ambas as subunidade  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , também já foram identificadas em blastocistos de equinos e coelhos (GARDINER et al., 1990; WAELCHLI et al., 1997).

#### 4.4.4. Implantação embrionária

Para o sucesso da implantação vários fatores precisam estar presentes: embrião com qualidade favorável ao desenvolvimento, receptividade endometrial e interação entre o embrião e o endométrio. Uma série de fatores desempenham um papel essencial na modulação das alterações de diferenciação e proliferação do endométrio, incluindo hormônios esteróides, fatores de crescimento e citocinas, sendo as mais estudadas: fator

estimulante de colônias, fator de crescimento epidérmico, interleucina-1 e fator inibidor de leucemia – LIF (CHEN et al., 1999).

O LIF desempenha um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário inicial e exerce seus efeitos biológicos pela ligação a um sistema receptor específico: receptor do fator de inibição de leucemia (LIFr). O LIF foi encontrado como mRNA ou proteína no útero de várias espécies próximo a implantação e de forma semelhante no tecido endometrial na espécie bovina. Já o LIFr foi encontrado apenas durante a gestação em mulheres. Camundongos *knockout* para LIFr nasceram com alterações, enquanto que, nos LIF *knockout* os blastocistos não foram capazes de implantar (ECKERT e NIEMANN, 1998).

A importância fisiológica do fator inibidor de leucemia (LIF) e seu receptor (LIFr) para o desenvolvimento embrionário foi demonstrado em ratos. Fêmeas com o gene LIF afuncional podem produzir blastocistos viáveis, porém, não há implantação, enquanto que a inativação do LIFr leva a mortalidade embrionária, ou então, os descendentes morrem após o nascimento (WARE et al., 1995).

O LIF e o LIFr participam das interações materno fetais em coelhos sendo detectados no útero no período pré-implantação e em blastocistos (LEI et al., 2004). Também foram detectados em embriões de camundongos (NICHOLS et al., 1996), bovinos (ECKERT e NIEMANN, 1998) e humanos (CHEN et al., 1999). Em humanos, a secreção do LIF e a presença do LIFr nas células do trofoblasto é importante para o crescimento e diferenciação, para a sobrevivência embrionária (KWAK-KIM et al., 2005).

Transcritos do LIFr foram encontrados em embriões nos estádios de mórula e blastocisto, e apenas em blastocistos foi encontrado o mRNA do LIF, indicando uma atuação autócrina sobre o processo de desenvolvimento do blastocisto (LEI et al., 2004). No trabalho de Schafer-Somi et al. (2008) foi encontrado mRNA para LIF no útero e em embriões pré-implantação de cadelas.

## *Capítulo 2*

Artigo a ser submetido ao periódico *Theriogenology*

Normas para publicação no link:

<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

**Viabilidade e ultraestrutura de blastocistos caninos criopreservados produzidos *in vivo***

GUAITOLINI, C.R.F., DERUSSI, A.A.P., VOLPATO, R., ACKERMANN, C.L.,  
MATSUBARA, L.M., MAZIERO, R.R.D., SUDANO, M.J., LANDIM-ALVARENGA,  
F.C., LOPES, M.D.

Autor para correspondência:

Carlos Renato de Freitas Guaitolini

Endereço:

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Campus de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-970 - Botucatu/SP - Brasil

e-mail: [carlosrfg@hotmail.com](mailto:carlosrfg@hotmail.com); [denise@fmvz.unesp.br](mailto:denise@fmvz.unesp.br)

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo comparar a congelação lenta e a vitrificação de blastocistos caninos pela avaliação da viabilidade embrionária e danos ultraestruturais. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em: controle (Co), controle + cultivo por 24 hs (Co24), congelado (Cg), após a descongelação e cultivado por 24 hs (Cg24), vitrificado (Vi), após o aquecimento e cultivado por 24hs (Vi24). A colheita após OHE foi realizada por lavagem uterina. A CIV de 34 blastocistos foi realizada em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a uma temperatura de 38,5°C, em meio SOFaa acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB). A reexpansão da blastocele foi avaliada após 24 horas do CIV, sendo os embriões classificados em reexpandidos ou não. A taxa de recuperação embrionária foi de 78% e apenas os embriões do grupo Co24 apresentaram reexpansão da blastocele. Houve diferença na intensidade da fluorescência do Iodeto de propídeo entre os grupos Co em comparação ao Cg e Vi. Nos embriões do grupo Co24 observou-se uma redução na quantidade de gotículas lipídicas após o CIV em comparação ao grupo Co. No grupo Cg foram observadas mitocôndrias degeneradas, perda do contorno dos blastômeros, núcleos picnóticos e membranas nucleares rompidas. Já no grupo Vi foram observadas mitocôndrias alongadas, integridade das membranas dos blastômeros e nucleares, retículo endoplasmático liso, vesículas de digestão, microvilosidades, junções do tipo *tight* e desmossomas. Entretanto, no grupo Vi24 foram observadas características semelhantes aos embriões do grupo Cg. Com os resultados observados da integridade de membrana e ultraestrutura pode-se concluir que os embriões do grupo Vi apresentavam-se viáveis ao contrário dos embriões congelados.

**Palavras-chave:** congelação lenta, vitrificação, cão.

## Introdução

A criopreservação de embriões apesar de acessível apresenta desafios que necessitam ser superados, como a velocidade lenta de entrada do crioprotetor nos embriões devido a estrutura multicelular do blastocisto, a barreira representada pela zona pelúcida que impede a interiorização do crioprotetor de forma adequada a todos os blastômeros e a desidratação insuficiente da blastocela durante a congelação ou antes da vitrificação. Como resultado de um ou de todos os desafios acima mencionados, há grande possibilidade dos embriões sofrerem danos estruturais resultantes da formação de cristais de gelo (KARDER et al., 2010).

O citoplasma do embrião canino é rico em lipídios (LEE et al., 2006, CHASTANT-MAILLARD et al., 2010). Embriões com menor teor lipídico no citoplasma são mais resistentes a criopreservação, diferindo daqueles com maior teor lipídico, que se apresentam mais densos e escuros (TOMINAGA et al, 2000; VAJTA, 2000).

A utilização do *cryotop* para criopreservação de embriões caninos foi descrita apenas por Abe et al. (2011), que avaliaram a viabilidade embrionária pós-aquecimento utilizando iodeto de propídeo (IP), considerando viáveis embriões com 50% ou mais de células não coradas pelo IP. Nos embriões vitrificados nas fases iniciais, quatro a 16 células, 100% estavam viáveis, porém, mórulas e blastocistos apresentaram viabilidade de 50 e 40%, respectivamente. Apesar da tolerância as crioinjúrias referentes aos estágios embrionários não ter ficado clara neste estudo, a diferenciação durante o desenvolvimento pré-implantação parece influenciar na susceptibilidade a vitrificação.

Guaitolini et al. (2012) utilizaram IP e Hoescht 33342 para avaliação de embriões caninos, pós-descongelação, criopreservados em glicerol 1,0M e etilenoglicol 1,5M. A utilização das sondas fluorescentes mostrou-se eficiente na visualização e quantificação dos blastômeros vivos (azuis) e lesados (vermelhos). Não houve diferença estatística entre os crioprotetores utilizados e imediatamente após a descongelação 62,3% dos blastômeros mostraram-se viáveis, corados pelo Hoescht 33342.

Além das sondas fluorescentes as características ultraestruturais podem avaliar a eficiência dos métodos de criopreservação. Dalcin et al. (2013) avaliaram a ultraestrutura de embriões ovinos produzidos *in vivo* congelados ou vitrificados e observaram alterações semelhantes entre os métodos de criopreservação como redução do contato entre microvilosidades e zona pelúcida em blastocistos, menor numero de

desmossomas visíveis, áreas citoplasmáticas sem organelas, retículo endoplasmático liso e mitocôndrias edemaciadas, complexo de Golgi presente em diferentes locais do citoplasma. Todavia, não há dados na literatura sobre avaliação ultraestrutural de embriões caninos pós-criopreservação.

Shu et al. (2009) avaliaram a velocidade de reexpansão da blastocele pós-descongelamento de embriões humanos criopreservados, e observaram que 49% dos embriões apresentaram rápida reexpansão após 2 a 4 horas do início do cultivo *in vitro*, e apenas três gestações foram estabelecidas a partir de 42 transferências de 63 blastocistos sem reexpansão da blastocele. A taxa de reexpansão também foi utilizada por Guaitolini et al. (2012) para avaliação da viabilidade de embriões caninos criopreservados com etilenoglicol e glicerol.

Frente ao exposto este trabalho teve como objetivo comparar a congelamento lento e a vitrificação de blastocistos caninos pela avaliação da viabilidade embrionária e danos ultraestruturais.

## **Material e Métodos**

O delineamento experimental utilizado foi 3 X 2 para testar três tratamentos (controle, congelamento e vitrificação) em dois momentos: imediatamente após a coleta, descongelamento ou aquecimento; e após 24 horas de cultivo *in vitro*. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: controle (Co), controle + cultivo por 24 hs (Co24), congelado / descongelado (Cg), após a descongelamento e cultivado por 24 hs (Cg24), vitrificado / aquecido (Vi), após o aquecimento e cultivado por 24hs (Vi24). O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número 145/2011.

**Animais:** Foram utilizadas cadelas hípidas, com peso entre 5 a 30 kg, idade entre um e cinco anos, as quais foram submetidas à ovariectomia (OHE) eletiva. As cadelas foram submetidas inicialmente a um exame clínico geral, ginecológico completo e exame de citologia vaginal para a determinação da fase do ciclo estral.

**Coleta dos embriões:** As cadelas foram identificadas em proestro pela presença de edema vulvar, secreção vaginal sero-sanguinolenta, ou ambos. A partir do início do proestro, as fêmeas foram monitoradas por citologia vaginal a cada 48 horas, até a

detecção de 80 a 90% de células superficiais e inseminadas artificialmente (IA) com sêmen fresco, por três vezes a cada 48 horas, com macho fértil.

A colheita dos embriões foi realizada por lavagem uterina, pela técnica *ex vivo* descrita por Luz et al. (2010), 12 dias após a primeira inseminação artificial. O lavado foi drenado diretamente para placas de Petri contendo PBS acrescido de 0,4% de BSA para a identificação das estruturas embrionárias, as quais foram transferidas para placas de Petri de 35 x 10 mm descartáveis. As estruturas embrionárias foram avaliadas e classificadas quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1999) em estereomicroscópio (Leica MZ 12,5<sup>®</sup>, Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 10X e 40X.

A taxa de recuperação embrionária foi determinada pela divisão do número de embriões obtidos pelo número de corpos lúteos presentes nos ovários da doadora, multiplicado por 100 (TSUTSUI et al., 2001; LUZ et al., 2010).

**Congelação lenta / Descongelção:** A congelação lenta dos blastocistos iniciais e expandidos graus 1 e 2 foi realizada em máquina de congelação programável modelo TK 3000 (TK Tecnologia em Congelação, Uberaba, MG, Brasil). Os embriões foram equilibrados em gotas de 200µL de glicerol 1M por 10 minutos e envasados em palhetas de 0,25 mL na temperatura ambiente. Ato contínuo as palhetas foram colocadas em suporte, com temperatura previamente estabilizada a -6°C, e mantidas nesta temperatura por 2 minutos para equilíbrio, quando realizou-se a cristalização, a temperatura diminuiu em curva constante e controlada de -0,6°C/minuto até - 35°C, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos, quando as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L).

A descongelção foi realizada pela exposição das palhetas ao ar por 15 segundos e imersas em banho-Maria a 37°C por 15 segundos, o crioprotetor foi removido em três etapas, com banhos de 15 minutos em soluções com concentrações decrescentes de glicerol (6,6%, 3,3% e 0,0%) acrescidas de sacarose 1,0M.

**Vitrificação / Aquecimento:** Os blastocistos iniciais e expandidos graus 1 e 2 foram vitrificados individualmente em hastes de polipropileno de 0,7 mm de espessura (Vitri-Ingá<sup>®</sup>, Ingamed – Produtos Médico Hospitalares, Perobal, Paraná, Brasil), método conhecido como *cryotop*. As soluções de vitrificação e aquecimento foram produzidas pela Kitazato BioPharma Company Ltda., Shizuoka, Japão. Após a permanência de 15

minutos na solução de equilíbrio (SE), os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação 1 (SV1), e mantidos nesta solução por 1 minuto, sendo, em seguida, colocados na solução de vitrificação 2 (SV2), por mais 30 segundos. Durante este período foram colocados sobre as hastes e mergulhados imediatamente em N<sub>2</sub>L.

Para o aquecimento as hastes foram retiradas do botijão criogênico e mantidas em uma caixa de isopor com N<sub>2</sub>L, o protetor foi removido da haste e a extremidade mergulhada na solução de aquecimento (SA). Os embriões foram transferidos, imediatamente, para a solução diluente (SD), por 3 minutos. Ato contínuo, os embriões foram transferidos para a solução de lavagem 1 (SL1) e mantidos nesta solução por 5 minutos, sendo, em seguida, na solução de lavagem 2 (SL2) por mais 1 minuto.

**Cultivo embrionário:** O cultivo dos embriões *in vitro* foi realizado em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a uma temperatura de 38,5°C, em meio SOFaa acrescido de 20% de soro fetal bovino por 24 horas.

**Avaliação da reexpansão da blastocle embrionária:** A taxa de reexpansão embrionária foi avaliada após 24 horas do cultivo *in vitro*, sendo os embriões classificados como reexpandidos ou não, conforme a aparência da blastocle em observação realizada em esteriomicroscópio.

**Avaliação da taxa de viabilidade embrionária:** Os embriões foram avaliados quanto à viabilidade pós-descongelamento ou aquecimento com o auxílio dos corantes fluorescentes Hoechst 33342 (Sigma Chemical CO, St. Louis) e iodeto de propídeo (IP) (Sigma Chemical CO, St. Louis). Os embriões foram incubados em solução de PBS contendo 0,4% de BSA, acrescida de 125µg/mL do IP durante 30 segundos. Em seguida, transferidos para uma gota, sobre lâmina histológica, contendo solução de 1mg/mL de Hoechst 33342 e glicerol. A gota foi recoberta por lamínula e examinada após 15 minutos em microscópio de fluorescência (Leica<sup>®</sup> DM LB- filtro azul 535 e 617 nm). A intensidade da fluorescência foi avaliada pelo software ImageJ 1.47V (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) de acordo com metodologia descrita por Sudano et al. (2012) e Dobbs et al. (2013).

**Análise ultraestrutural do embrião:** Dois embriões de cada grupo experimental foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4) e posteriormente

fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. Após a desidratação em séries crescentes de acetona os embriões foram incluídos em Epon. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grades de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram então examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301.

**Análise dos dados:** As variáveis dependentes binomiais (porcentagem de reexpansão e intensidade de fluorescência) foram avaliadas por ANOVA seguido do teste de Tukey através do PROC GLM do SAS 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Foi adotado o nível de 5% de significância. Para a análise da ultraestrutura embrionária foi realizado um estudo descritivo dos achados.

## Resultados

Trinta e nove embriões foram coletados de sete cadelas, 34 blastocistos e cinco mórulas e apenas os blastocistos foram utilizados nesse experimento. Foram identificados 50 corpos lúteos em ambos os ovários perfazendo uma taxa de recuperação de 78%.

Não foi evidenciada reexpansão da blastocele após 24 horas de cultivo nos grupos Cg24 e Vi24. Já nos embriões do grupo Co24, 100% dos embriões expandiram a blastocele.

Na tabela 1 estão descritos os dados referentes a intensidade de fluorescência das sondas Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo (IP) nos blastocistos caninos dos grupos controle, congelados e vitrificados nos momentos 0 e 24 horas.

Os embriões do grupo Co e Co24 apresentaram constituição semelhante a dos demais mamíferos com espaço perivitelínico e superfície apical dos blastômeros ainda coberta com microvilosidades, mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático rugoso (RER), junções do tipo *tight* e como particularidade uma grande quantidade de gotículas lipídicas (Figura 1). Quando os embriões do grupo controle nos momentos 0h e 24h foram comparados observou-se uma menor quantidade de gotículas lipídicas após 24 horas de cultivo *in vitro* (Figura 2).

Tabela 1 – Média da intensidade de fluorescência e erro padrão (EP) do Hoescht 33342 e Iodeto de Propídeo (IP) nos blastocistos caninos dos grupos controle, congelados e vitrificados nos momentos 0 e 24 horas.

| Grupo       | Momento | n | Hoescht 33342       |         | IP                  |        |
|-------------|---------|---|---------------------|---------|---------------------|--------|
|             |         |   | Média               | ±EP     | Média               | ±EP    |
| Controle    | 0h      | 4 | 45,489 <sup>a</sup> | ±13,241 | 1,296 <sup>a</sup>  | ±3,906 |
|             | 24h     | 4 | 5,701 <sup>b</sup>  | ±13,241 | 0,847 <sup>a</sup>  | ±5,524 |
| Congelado   | 0h      | 4 | 53,596 <sup>a</sup> | ±15,290 | 11,289 <sup>b</sup> | ±3,189 |
|             | 24h     | 3 | 48,017 <sup>a</sup> | ±13,241 | 7,031 <sup>b</sup>  | ±2,762 |
| Vitrificado | 0h      | 3 | 23,451 <sup>a</sup> | ±15,290 | 8,008 <sup>b</sup>  | ±3,189 |
|             | 24h     | 4 | 34,054 <sup>a</sup> | ±13,241 | 6,490 <sup>b</sup>  | ±2,762 |

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

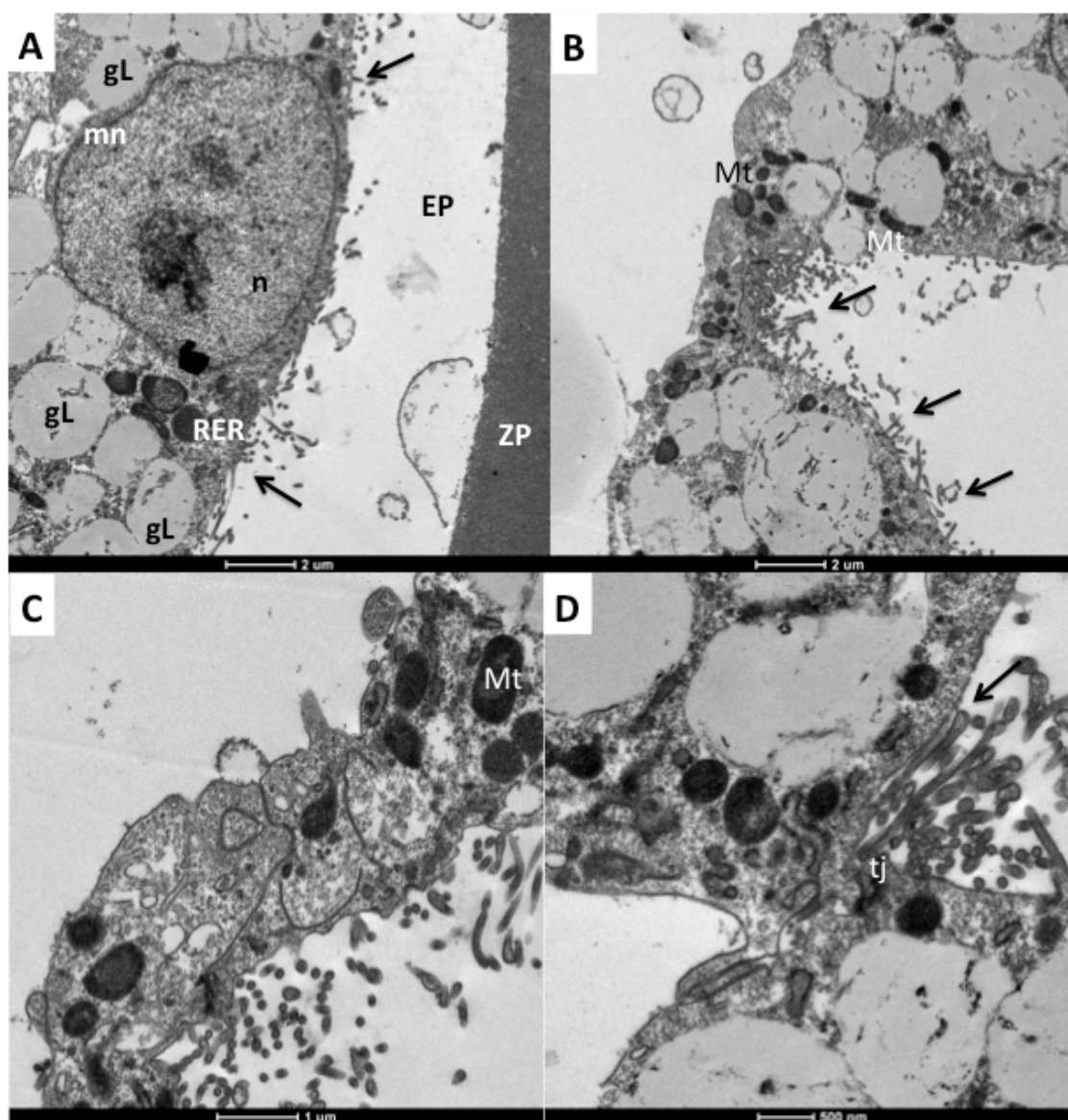


Figura 1 – Embrião do grupo controle no momento 0h. A – observar a zona pelúcida (ZP); núcleo (n) com membrana íntegra (mn); gotículas lipídicas (gL); retículo

endoplasmático rugoso (RER) e espaço perivitelínico (EP). B e C – presença de mitocôndrias (Mt) e microvilosidades (setas). D – microvilosidades (seta) e junções do tipo *tight*.

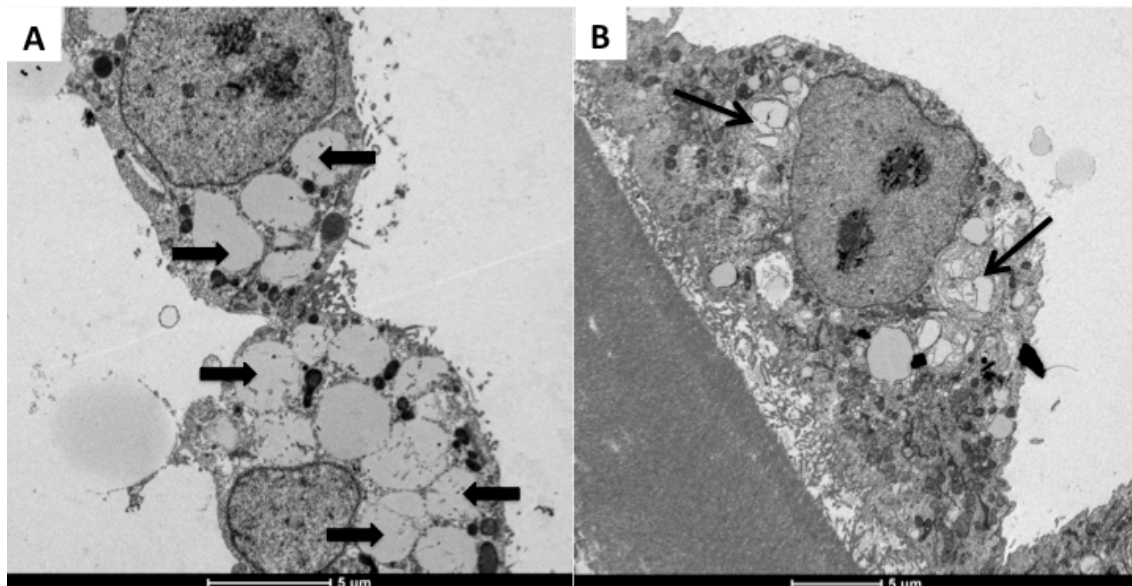


Figura 2 – Células trofoblásticas caninas. A – Embrião do grupo Co com número grande de gotículas lipídicas no interior dos blastômeros (setas cheias). B – Embrião do grupo Co24 com menor número de gotículas lipídicas e figuras mielínicas (setas).

Nos embriões do grupo Cg (Figura 3), em ambos os momentos (0h e 24h), foi observada uma perda do contorno dos blastômeros, mitocôndrias degeneradas, núcleos picnóticos e membrana nuclear rompida.

Nos embriões do grupo Vi (Figura 4) foram observadas membranas íntegras tanto dos blastômeros como do núcleo, mitocôndrias alongadas, retículo endoplasmático liso, vesículas de digestão, microvilosidades, junções do tipo *tight*. Após o cultivo *in vitro* dos embriões do grupo Vi24 (Figura 5) foram observadas características semelhantes aos embriões do grupo Cg. Os embriões apresentaram-se degenerados.

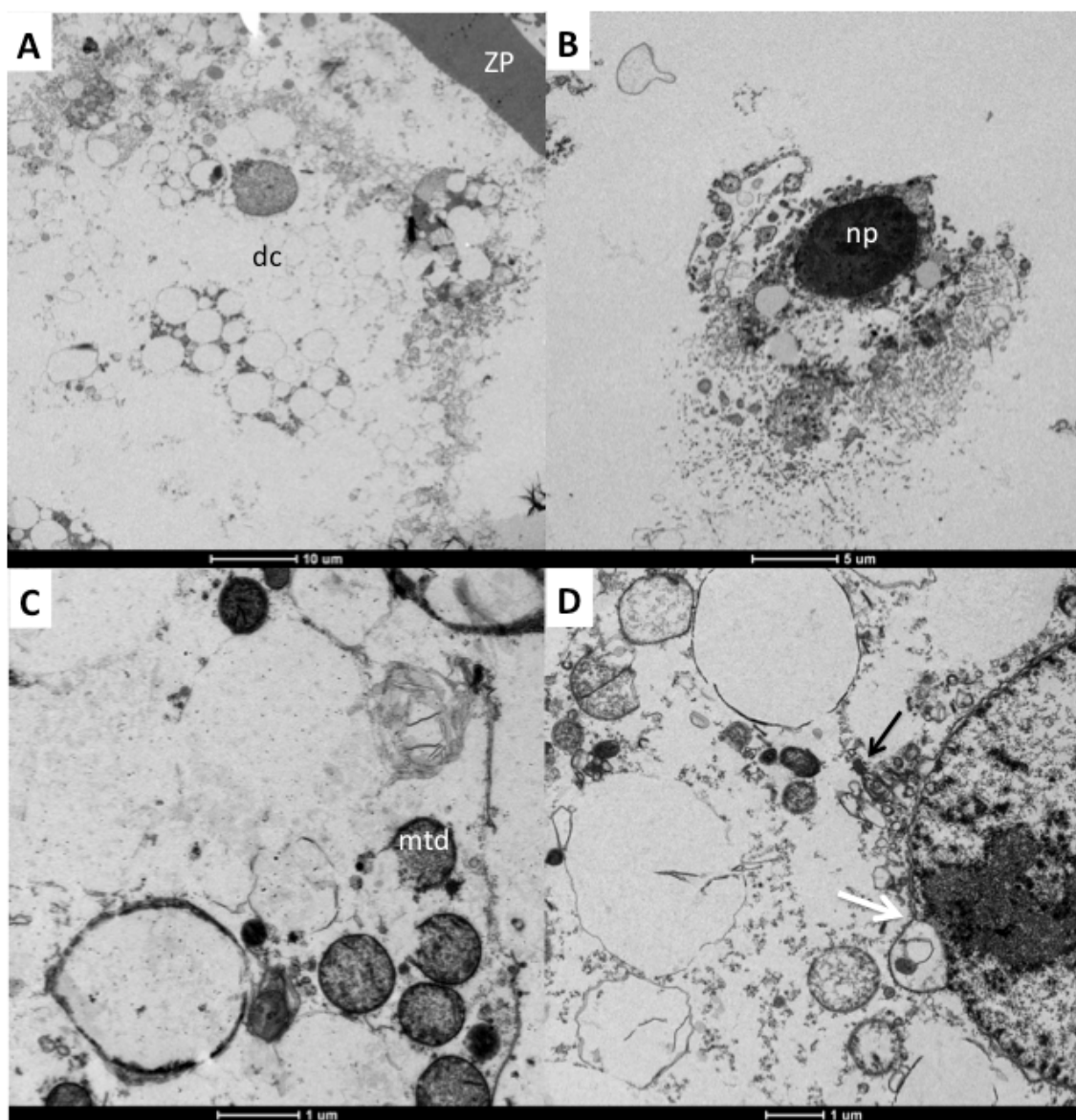


Figura 3 – Embriões caninos do grupo congelado. A – desorganização do citoplasma (dc) e zona pelúcida (ZP). B – núcleo picnótico (np). C – mitocôndrias degeneradas (Mtd). D – junção de tipo *tight* (seta) e lesão de membrana nuclear (seta branca).

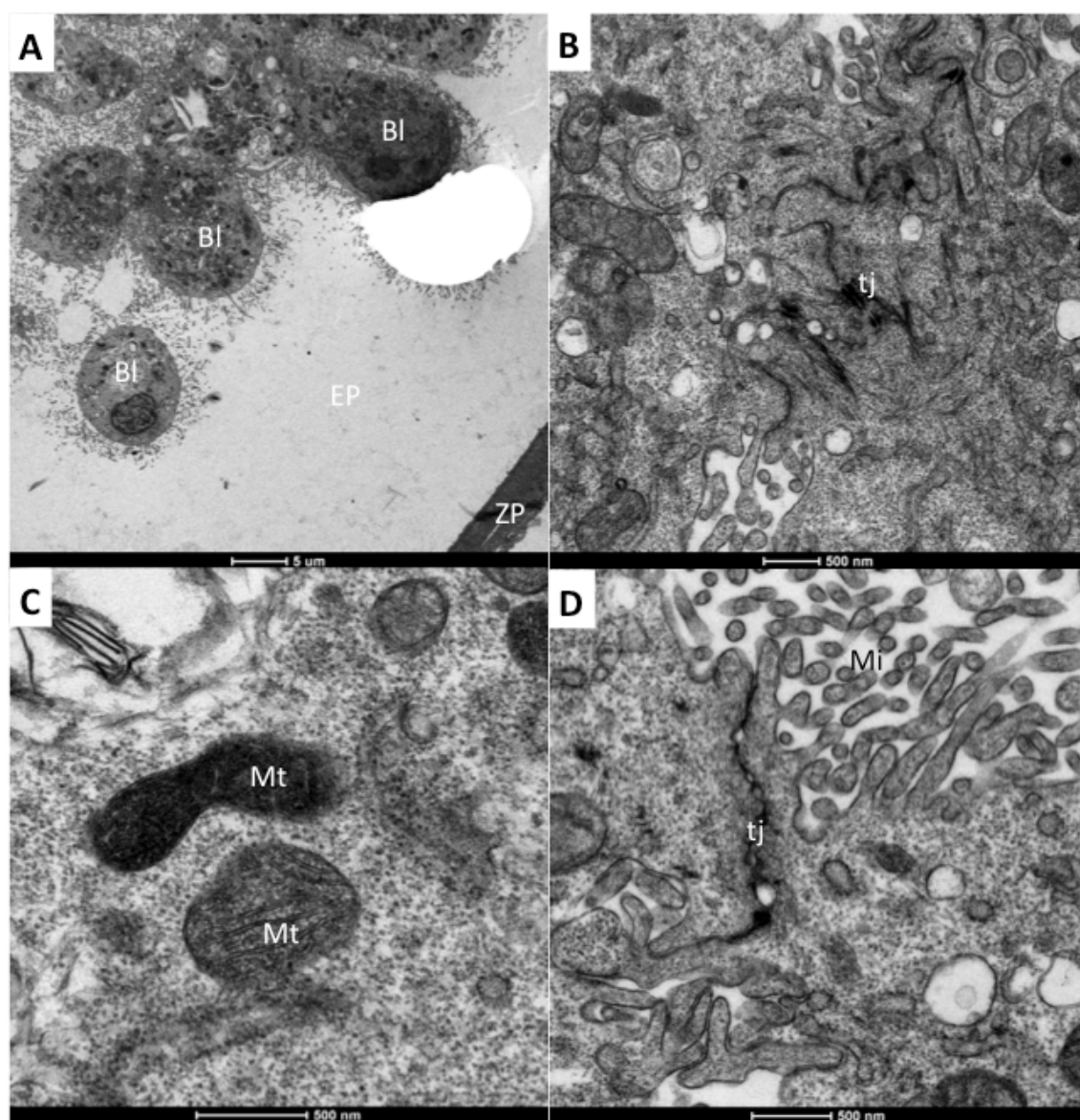


Figura 4 – Embriões caninos do grupo vitrificado. A – presença dos blastômeros (Bl), espaço perivitelínico (EP) e zona pelúcida (ZP). B e C – junções do tipo *tight* (tj) e mitocôndrias (Mt). C – microvilosidades (Mi) e junções do tipo *tight* (tj).

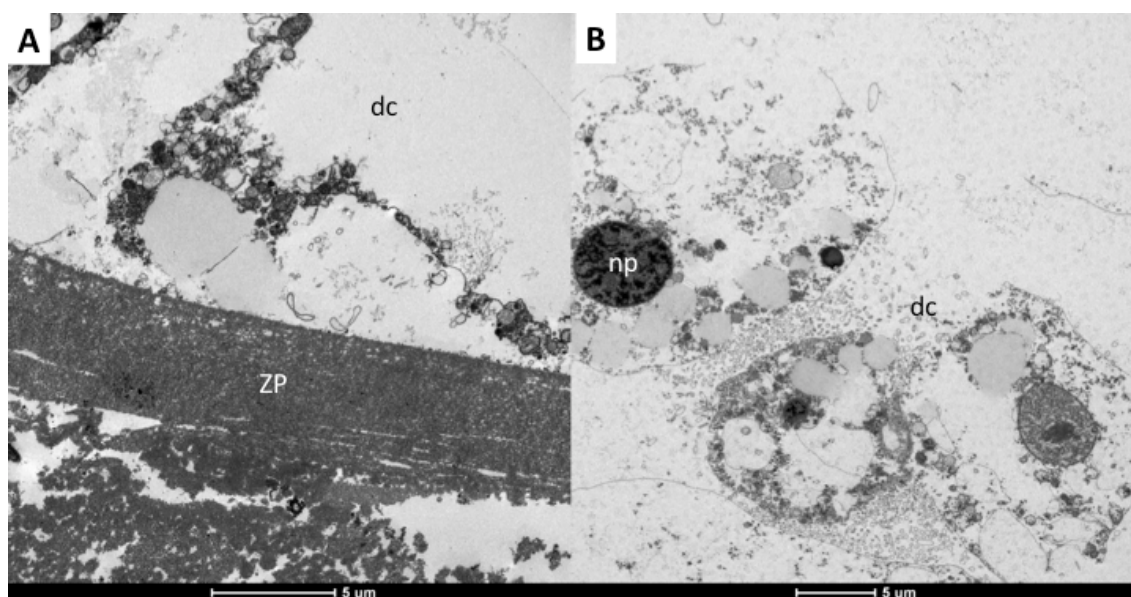


Figura 5 – Embriões caninos vitrificados no momento 24h. A – presença da zona pelúcida (ZP) e citoplasma desorganizado (dc). B – núcleo picnótico (np).

## Discussão

A taxa de recuperação de 78% foi superior a descrita por Guaitolini et al. (2012) de 57,6%, e inferior aos 91,7% descrito por Tsutsui et al. (2001). Fatores como presença de embriões no interior da tuba uterina (LUZ et al., 2011) e hiperplasia endometrial cística (TSUTSUI et al., 2001) poderiam afetar na recuperação de embriões em cadelas.

O glicerol foi utilizado em estudos de criopreservação de embriões caninos por Kim et al. (2002), os quais após descongelação foram transferidos para receptoras, sem obtenção de gestação. Esses autores não realizaram avaliação *in vitro* da viabilidade embrionária pós-descongelação. Já Guaitolini et al. (2012) compararam o glicerol e o etilenoglicol na congelação lenta de embriões caninos. A avaliação da viabilidade embrionária por sondas fluorescentes imediatamente após descongelação não demonstrou diferença entre os crioprotetores.

A não reexpansão dos grupos Cg24 e Vi24 diferem dos resultados descritos por Guaitolini et al. (2012), no qual 76,5% dos embriões congelados em glicerol 1M reexpandiram após 24 horas de cultivo *in vitro*. De acordo com Desai e Goldfar (2005), blastocistos que começam a se reexpandir em até uma hora após descongelação são de alta qualidade. Shu et al. (2009) correlacionaram a rápida reexpansão da blastocele de embriões humanos, entre duas a quatro horas de cultivo *in vitro*, com maiores taxas de implantação e gestação, quando comparado aos embriões com reexpansão mais lenta.

A avaliação da viabilidade embrionária pós-descongelamento com as sondas iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 permite estimar a porcentagem de blastômeros íntegros e lesados, as células lesadas são permeáveis ao IP e as células íntegras coram-se pelo Hoechst. Não foi verificada diferença na intensidade da fluorescência do Hoescht no grupo Co, em relação aos embriões dos grupos congelados e vitrificados, em ambos os momentos de avaliação – 0 e 24 horas, apenas no grupo Co24 foi observada uma menor intensidade de fluorescência em relação aos outros grupos. Quanto à intensidade do iodeto de propídeo (IP) foi observada diferença significativa entre o grupo controle em relação aos grupos congelado e vitrificado, porém, não houve diferença entre as metodologias de criopreservação.

Diferentemente desse estudo em que a intensidade da fluorescência foi avaliada, Abe et al. (2011), consideraram viáveis embriões que apresentavam mais que 50% de células não coradas pelo IP e um mínimo de 75% de blastômeros viáveis. Imediatamente após o aquecimento obtiveram taxas de viabilidade de 50% para mórulas e 40% para blastocistos. Guaitolini et al., (2012) também conseguiram melhores resultados que os apresentados neste estudo, 62,3% de blastômeros viáveis imediatamente após a descongelamento e 56,9% após 72 horas de cultivo *in vitro*. Fatores como a taxa de resfriamento e aquecimento e o crioprotetor utilizado podem causar alterações de membrana plasmática pós-descongelamento (LEIBO et al., 1978. SCHIEWE et al., 1991). Além disso, a presença de grande quantidade de lipídios intracelulares (CHASTANT-MAILLARD et al., 2010) pode ter contribuído para a maior quantidade de células lesadas e coradas pelo IP o que gerou uma maior intensidade de fluorescência. Assim como ocorre na espécie suína (HAYASHI et al., 1989), possivelmente embriões caninos apresentam maior sensibilidade a criopreservação em função da quantidade de lipídios intracelulares.

Os achados observados grupo Co e Co24 corroboram com Landim-Alvarenga e Bicudo (1997) que avaliaram a ultraestrutura de embriões caninos frescos no estágio de blastocisto. As junções evidenciadas são importantes como barreiras de permeabilidade seletiva e responsável por manter as células unidas (JOHNSON e ZIOMEK, 1981; YAMANAKA, 2006).

Além de componentes da membrana celular e do citoplasma os lipídios desempenham um papel importante como fonte de energia necessária para o desenvolvimento oocitário/embrionário (DYNNESEN et al. 2006; ROMEK et al., 2008). No presente estudo a diminuição das gotículas lipídicas, bem como a presença de

figuras mielínicas, que representam a metabolização dos lipídios, podem indicar que os lipídios foram consumidos para a reexpansão do embrião durante o período de cultivo.

Um equilíbrio intracelular deve ser mantido durante a criopreservação para evitar danos como a formação de cristais de gelo, choque osmótico, efeitos tóxicos dos crioprotetores, danos por resfriamento, rompimento da zona pelúcida ou do embrião, alterações do citoesqueleto e organelas intracelulares (VAJTA, 2000; PYLES, 2002; DINNYES et al., 2006; VAJTA e KUWAYAMA, 2006). Por não haver curvas de congelamento específicas para embriões caninos esses achados nos levam a crer que os danos sofridos durante o processo de congelamento / descongelamento resultaram em degeneração embrionária.

Achados semelhantes ao grupo Vi foram observados por Dalcin et al. (2013) em embriões ovinos vitrificados e aquecidos. De acordo com Skidmore et al. (2009) a congelamento lenta preserva melhor o citoesqueleto quando comparada a vitrificação, o que não foi observado neste estudo, em que os embriões congelados apresentaram-se degenerados após a descongelamento. Entretanto, após o cultivo *in vitro* dos embriões do grupo Vi24 os embriões apresentaram-se degenerados. A viabilidade dos embriões do grupo Vi24 pode ter sido afetada por fatores, como o meio de cultivo, fase do ciclo estral e mesmo a adição de suplementos como hormônios e fatores de crescimento (SONGSASEN e WILDT, 2007). Entretanto, Lindeberg et al. (1993) obtiveram sucesso com o meio TCM199 para o cultivo *in vitro* de embriões de raposa, entretanto os embriões deste experimento foram apenas observados em

Com os resultados observados da integridade de membrana e ultraestrutura pode-se concluir que os embriões do grupo Vi apresentavam-se viáveis ao contrário dos embriões congelados. A viabilidade embrionária deve ser avaliada de múltiplas formas não somente na porcentagem das células íntegras e lesadas, com a utilização de sondas fluorescentes., métodos complementares como análise ultraestrutural devem ser utilizados. A falha na observação da reexpansão da blastocle verificada durante o cultivo *in vitro* parece ser um indicativo de degeneração embrionária.

## Referências

- ABE, Y.; SUWA, Y.; TOMOYOSHI, A.; UETA Y. Y.; KOBAYASHI, N.; OHSHIMA, N.; SHIRASUNA, S.; ABDEL-GHANI, M. A.; OI, M.; KOBAYASHI, Y.; MIYOSHI, M.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 363-368, 2011.
- CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1049-1056, 2010.
- DALCIN, L.; SILVA, R.C.; PAULINI, F.; SILVA, B.D.M.; NEVES, J.P.; LUCCI, C.M. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v. 67, p. 137-145, 2013.
- DESAI, N.; GOLDFARB, J. Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst. **Reproductive BioMedicine Online**, v. II, n. 3, p. 349-354, 2005.
- DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Supl 1), p. 171-190, 2006.
- DOBBS, K.B.; RODRIGUEZ, M.; SUDANO, M.J.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation Bovine embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013.
- GUAITOLINI, C.R.F.; TAFFAREL, M.O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, M. J.; FREITAS, P.M.C.; LOPES, M.D.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; OLIVEIRA, C.A.; LUZ, M.R. Post-thaw viability of in vivo-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. **Theriogenology**, v. 78, p. 576–582, 2012.
- HAYASHI, S.; KOBAYASHI, K.; MIZUNO, J.; SAITOH, K.; HIRANO S. Birth of piglets from frozen embryos. **Veterinary Records**, v.125, p. 43-44, 1989.

JOHNSON, M.H.; ZIOMEK, C.A. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry and stability. **Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 303-308, 1981.

KADER, A.; SHARMA, R.K.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Mouse blastocyst previtrification interventions and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 1518-1525, 2010.

KIM, Y.J.; KIM, B.J.; YOU, I.J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. **The Korean Society of Veterinary Clinics**, v. 19, p. 73-79, 2002.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Ultrastructural study of pre-implantation dog embryos. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 14, p. 213-217, 1997.

LEE, H.S.; YIN, X.J.; KONG, I.K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology**, v. 66, p. 1468-1470, 2006.

LEIBO, S.; McGRATH, J.; CARVALHO, E. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilised mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v.15, p. 257-271, 1978.

LINDEBERG, H.; JALKANEN, L.; SAVOLAINEN, R. *In vitro* culture of silver fox embryos. **Theriogenology**, v. 40, p. 779-788, 1993.

LINDNER, G.M.; WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-416, 1983.

LUZ, M.R.; HOLANDA, C.C.; PEREIRA, J.J.; FREITAS, P.M.C.; SALGADO, A.E.P.; GIANNOTTI, J.G.; OLIVEIRA, S.B.; TEIXEIRA, N.S.; GUAITOLINI, C.R.F. High embryonic recovery rates with in vivo and ex vivo techniques in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 724-727, 2010.

LUZ, M.R.; HOLANDA, C.C.; PEREIRA, J.J.; TEIXEIRA, N.S.; VANTINI, R.; FREITAS, P.M.C.; SALGADO, A.E.P.; OLIVEIRA, S.B.; GUAITOLINI, C.R.F.;

SANTOS, M.C. Survival rate and *in vitro* development of *in vivo* produced and cryopreserved dog embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 208-209, 2011.

NICOLA, E. S.; DESCHAMPS, J. C.; JÚNIOR, M. M.; SOBRINHO, J. B. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v.29, p.111-115, 1999.

PYLES, E.S.C.S. Vitrificação de ovócitos bovinos: efeito do método e do estágio de maturação sobre o desenvolvimento embrionário. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 99, 2002.

ROMEK, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWIEZ, E.; SMORAG, Z. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 24-32, 2008.

SCHIEWE, M. C.; RALL, W. F.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. **Theriogenology**, v.36, p.279-293, 1991.

SHU, Y.; WATT, J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. **Fertility and Sterility**, v.91, n.2, p. 401-406, 2009.

SKIDMORE, J.A.; SCHOEVERS, E.; STOUT, T.A.E. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 196-204, 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.2-22, 2007.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de

Transferência de Embriões. 3 ed. Illinois: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões 1999.

SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A.; FERREIRA, C.R.; PASCHOAL, D.M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1-11, 2012.

TOMINAGA K.; SHIMIZU M.; OOOYAMA S.; IZAIKE Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different development stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1669-1680, 2000.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.401-405, 2001.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine**, v. 12, p. 779-796, 2006.

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

YAMANAKA, Y.; RALSTON, A.; STEPHENSON, R.; ROSSANT, J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. **Development Dynamics**, v. 235, p. 2301-2314, 2006.

## *Capítulo 3*

Artigo a ser submetido ao periódico *Reproduction in Domestic Animals*

Normas para publicação no link:

<http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/%28ISSN%291439-0531/homepage/ForAuthors.html>

**Expressão gênica de blastocistos caninos criopreservados produzidos *in vivo***

GUAITOLINI, C.R.F., CASTILHO, A.C., DERUSSI, A.A.P., VOLPATO, R.,  
ACKERMANN, C.L., MATSUBARA, L.M., MAZIERO, R.R.D., LOPES, M.D.

Autor para correspondência:

Carlos Renato de Freitas Guaitolini

Endereço:

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Campus de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N - CEP: 18.618-970 - Botucatu/SP - Brasil

e-mail: [carlosrfg@hotmail.com](mailto:carlosrfg@hotmail.com); [denise@fmvz.unesp.br](mailto:denise@fmvz.unesp.br)

## Resumo

Este trabalho objetivou identificar e quantificar a expressão de genes relacionados a apoptose celular (BAX e Bcl2), ao transporte de água e solutos (AQP3), a falhas na formação e reexpansão da blastocle (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1) e na implantação embrionária (LIF e LIFr) em embriões caninos obtidos *in vivo*, congelados e vitrificados. Para a coleta dos embriões, as cadelas foram inicialmente identificadas em pró-estro e a partir daí monitoradas por exames de citologia vaginal, a cada 48 horas, até a detecção de 80-90% de células superficiais e inseminadas artificialmente com sêmen fresco. A coleta dos embriões foi realizada após a OHE, seguida de lavagem uterina. A extração e amplificação do RNA foram realizadas segundo recomendação do fabricante e os embriões distribuídos aleatoriamente em controle (Co), congelado / descongelado (Cg) e vitrificado / aquecido (Vi). Dezoito blastocistos foram coletados de três cadelas. Os genes BAX, AQP3 e LIFr não diferiram entre os grupos estudados. Já o Bcl2 apresentou uma tendência a ser menos expresso em embriões congelados em comparação aos vitrificados. Houve uma tendência do gene Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1 ser mais expresso no grupo congelado e vitrificado em relação ao grupo controle e o gene Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\beta$ 1 diferiu entre os grupos, com uma maior expressão no grupo vitrificado. Neste estudo o gene LIF não foi expresso nos blastocistos. Concluiu-se que apenas o gene LIF não foi expresso em blastocistos caninos e que não se pode comparar com segurança as duas metodologias de criopreservação, visto que os resultados podem ter sido influenciados pela amplificação do RNA.

**Palavras-chave:** expressão gênica, embriões, congelação lenta, vitrificação, cadela

## Introdução

A criopreservação de embriões caninos e subsequente transferência são relevantes na utilização das tecnologias reprodutivas, permitindo otimizar o transporte e o armazenamento de material genético bem como método auxiliar no controle de doenças verticalmente transmitidas (ABE et al., 2011). O primeiro relato de sucesso da criopreservação de embriões data de 1972 quando Whittingham et al. obtiveram o nascimento de camundongos provenientes de embriões criopreservados.

Durante o processo de criopreservação as células embrionárias sofrem um processo de desidratação seguido por uma rehidratação causada pela entrada dos crioprotetores intracelulares (WOODS et al. 2004), este movimento de água e solutos através da membrana celular desempenha um papel importante na viabilidade celular. Um dos mecanismo pelo qual a água se move através das membranas é a difusão facilitada por canais de água denominados aquaporinas (AQP). A AQP3 é uma aquagliceroporina que aumenta a permeabilidade celular ao glicerol e a outros crioprotetores (EDASHIGE e KASAI, 2007). Também desempenha um papel na cavitação, permitindo o movimento da água através do trofoderma (BARCROFT et al., 2003). A AQP3 juntamente com a enzima de Na/K ATPase, que tem um papel no estabelecimento e manutenção do gradiente iônico pelo trofoderma, contribui para o acúmulo osmótico de água, formação e expansão da blastocèle (WATSON et al., 2004).

Além dos danos relativos ao movimento da água e solutos, o estresse celular induz a ativação de genes pró-apoptóticos, como o BAX, e genes anti-apoptóticos como o Bcl2, (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN 2001). Em estudo realizado por Turathum et al. (2010) foi avaliada a expressão dos genes Bcl2 e BAX em oócitos caninos controle e submetidos a vitrificação. Apesar da expressão constante dos genes em ambos os grupos, o gene Bcl2 mostrou-se mais fortemente expresso no grupo vitrificados/aquecidos. E poderia ser utilizada para prever a qualidade e a capacidade de desenvolvimento de oócitos imaturos vitrificados.

A capacidade de implantação dos embriões criopreservados deve ser avaliada e para seu sucesso vários fatores precisam estar presentes: embrião com qualidade favorável ao desenvolvimento, receptividade endometrial e a interação entre o embrião e o endométrio (CHEN et al., 1999). O LIF e o LIFr são genes que participam das interações materno fetais em coelhos sendo detectados no útero e nos blastocistos no período pré-implantação (LEI et al., 2004). Schafer-Somi et al. (2008) observaram

mRNA para LIF no útero e em embriões de cadelas na fase de pré-implantação. Em humanos, a secreção de LIF e a presença de LIFr no trofoblasto é importante para o crescimento e diferenciação embrionária (KOJIMA et al., 1995).

De acordo com o apresentado este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar a expressão de genes relacionados a apoptose (BAX e Bcl2), ao transporte de água e solutos (AQP3), a falhas na formação e reexpansão da blastocle ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ ) e na implantação embrionária (LIF e LIFr) em blastocistos caninos frescos, congelados/descongelados e vitrificados/aquecidos e após o cultivo *in vitro* de 24 horas.

## **Material e Métodos**

### **Delineamento experimental**

Neste experimento foi avaliada a abundância do RNA de genes candidatos relacionados a qualidade embrionária. Um total de 36 blastocistos foram utilizados, cada embrião foi considerado uma unidade experimental e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos: fresco (Co/n=6), fresco + cultivo *in vitro* (Co24/n=6); congelado/descongelado (Cg/n=6), congelado/descongelado + cultivo *in vitro* (Cg24/n=6), vitrificado/aquecido (Vi/n=6) e vitrificado/aquecido + cultivo *in vitro* (Vi24/n=6). O material genético dos embriões foi amplificado para avaliação dos genes selecionados.

**Animais:** O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo número 145/2011. Foram utilizadas cadelas hígdas, com peso entre 5 a 30 kg, idade entre um e cinco anos, as quais foram submetidas à ovariectomia (OHE) eletiva. As cadelas foram submetidas inicialmente a um exame clínico geral, ginecológico completo e exame de citologia vaginal para a determinação da fase do ciclo estral.

**Coleta dos embriões:** As cadelas foram identificadas em proestro pela presença de edema vulvar, secreção vaginal sero-sanguinolenta, ou ambos. A partir do início do proestro, as fêmeas foram monitoradas por citologia vaginal a cada 48 horas, até a

detecção de 80 a 90% de células superficiais e inseminadas artificialmente (IA) com sêmen fresco, por três vezes a cada 48 horas, com macho fértil.

A colheita dos embriões foi realizada por lavagem uterina, pela técnica *ex vivo* descrita por Luz et al. (2010), 12 dias após a primeira inseminação artificial. O lavado foi drenado diretamente para placas de Petri contendo PBS acrescido de 0,4% de BSA para a identificação das estruturas embrionárias, as quais foram transferidas para placas de Petri de 35 x 10 mm descartáveis. As estruturas embrionárias foram avaliadas e classificadas quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1999) em estereomicroscópio (Leica MZ 12,5<sup>®</sup>, Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), em aumento de 10X e 40X.

A taxa de recuperação embrionária foi determinada pela divisão do número de embriões obtidos pelo número de corpos lúteos presentes nos ovários da doadora, multiplicado por 100 (TSUTSUI et al., 2001; LUZ et al., 2010).

**Congelação lenta / Descongelção:** A congelação lenta dos blastocistos iniciais e expandidos graus 1 e 2 foi realizada em máquina de congelação programável modelo TK 3000 (TK Tecnologia em Congelação, Uberaba, MG, Brasil). Os embriões foram equilibrados em gotas de 200µL de glicerol 1M por 10 minutos e envasados em palhetas de 0,25 mL na temperatura ambiente. Ato contínuo as palhetas foram colocadas em suporte, com temperatura previamente estabilizada a -6°C, e mantidas nesta temperatura por 2 minutos para equilíbrio, quando realizou-se a cristalização, a temperatura diminuiu em curva constante e controlada de -0,6°C/minuto até - 35°C, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos, quando as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L).

A descongelção foi realizada pela exposição das palhetas ao ar por 15 segundos e imersas em banho-Maria a 37°C por 15 segundos, o crioprotetor foi removido em três etapas, com banhos de 15 minutos em soluções com concentrações decrescentes de glicerol (6,6%, 3,3% e 0,0%) acrescidas de sacarose 1,0M.

**Vitrificação / Aquecimento:** Os blastocistos iniciais e expandidos graus 1 e 2 foram vitrificados individualmente em hastes de polipropileno de 0,7 mm de espessura (Vitri-Ingá<sup>®</sup>, Ingamed – Produtos Médico Hospitalares, Perobal, Paraná, Brasil), método conhecido como *cryotop*. As soluções de vitrificação e aquecimento foram produzidas pela Kitazato BioPharma Company Ltda., Shizuoka, Japão. Após a permanência de 15

minutos na solução de equilíbrio (SE), os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação 1 (SV1), e mantidos nesta solução por 1 minuto, sendo, em seguida, colocados na solução de vitrificação 2 (SV2), por mais 30 segundos. Durante este período foram colocados sobre as hastes e mergulhados imediatamente em N<sub>2</sub>L.

Para o aquecimento as hastes foram retiradas do botijão criogênico e mantidas em uma caixa de isopor com N<sub>2</sub>L, o protetor foi removido da haste e a extremidade mergulhada na solução de aquecimento (SA). Os embriões foram transferidos, imediatamente, para a solução diluente (SD), por 3 minutos. Ato contínuo, os embriões foram transferidos para a solução de lavagem 1 (SL1) e mantidos nesta solução por 5 minutos, sendo, em seguida, na solução de lavagem 2 (SL2) por mais 1 minuto.

#### **Avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).**

**Preparo dos embriões:** Após a coleta, descongelação e/ou aquecimento, seis embriões de cada grupo experimental foram lavados em PBS, livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>, e congelados individualmente a -196°C em tubos criogênicos, previamente identificados.

**Extração de RNA em embriões:** Para a extração de RNA embrionário foi utilizado RNeasy Micro Kit (Quiagen), seguindo orientação do fabricante em 18 µl de água livre de RNA.

**Amplificação:** Para amplificação do RNA foi utilizado o Kit Arcturus Ribo Amp HS Plus (Applied Biosystems Life Technologies, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

**Tratamento do RNA com DNase:** Conforme as instruções do protocolo *DNase I - Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 10 µl do RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foi acrescentado 1 µL de tampão de DNase (10X), 1 µL de DNase I Amp Grade (1 U/µL). Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µL de EDTA (25 mM) e 37 µL de água *RNase free* e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I, totalizando 50 µl de solução.

**Reação de Transcrição Reversa (RT):** A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), onde o RNA total tratado com DNase (50µL de solução) foi acrescidos de 10 µl de tampão de transcriptase reversa, 4 µL de dNTPs, 10 µL de *Random Primers*, 5 µL de enzima transcriptase reversa, 5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante *RNase inhibitor* (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O volume final da reação foi de 100 µL. Os produtos da reação de RT foram armazenados a - 20°C e utilizados nas reações de qPCR.

**Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR):** O PCR em tempo real foi realizado com o *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 1 µL do produto da RT, 12,5 µL de *Power SYBR® Green Mix*, 1 µL primers “sense” e 1 µL “anti-sense” e água-DEPC suficiente para um volume final de 25 µL de solução. Os genes analisados foram BAX, pró-Apoptótico, e Bcl2, antiapoptótico, Aquaporina 3 (AQP3), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase α1 e β1, LIF e LIFr. Os primers (tabela 1) foram desenhados no software *Primer Express®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a partir de sequências publicadas no Ensembl ([http://www.ensembl.org/Canis\\_familiaris/info/index](http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/info/index)), e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições de termociclagem da reação de qPCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para o gene constitutivo. Foram testados os genes de referência: GAPDH, 18S, HPRT de acordo com metodologia descrita por Vandesompele et al. (2002).

**Análise dos dados:** As variáveis dependentes oriundas do qPCR foram avaliadas quanto à normalidade e quando necessário aplicada a transformação logarítmica. Posteriormente as variáveis foram submetidas à ANOVA seguido do teste de Tukey pelo PROC GLM do SAS 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Foi adotado o nível de 5% de significância. A expressão do gene alvo foi normalizada pelo gene 18S e a

quantidade relativa de mRNA foi determinada pelo método  $\Delta\Delta\text{ct}$  corrigido pela eficiência de amplificação utilizando a equação Pfaf<sub>l</sub>.

Tabela 1: Sequência dos *primers* específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em embriões caninos.

| <i>Genes</i>    | <i>Sequência (5' – 3')</i>                                   |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|
| Bax             | F: TTGCTTCAGGGTTTCATCC<br>R: CTCACGGGGAGAGTCTGTGT            |
| Bcl 2           | F: GGATGCCTTTGTGGAAGTGT<br>R: GTGGCAGGCCTACTGACTTC           |
| AQP 3           | F: GTGGTTCTGTGAAGGAGATGAG<br>R: CAGCTGGTACTTGTTGGTAGAG       |
| ATP1 $\beta$ 1  | F: AGGCTTACCCAGTGATGAAATAC<br>R: CTCCACGTTCCCAATTCTATCC      |
| ATP1 $\alpha$ 1 | F: GTGGTTCTGTGAAGGAGATGAG<br>R: CAGCTGGTACTTGTTGGTAGAG       |
| LIF             | F: CAGCGCCAATGCCCTCTTTATTCT<br>R: AATGGTGGGAAGTCTGTCACGTTG   |
| HPRT            | F: TGGAGATGACCTCTCAACTTTAACTG<br>R: TTGGATTATACTGCGCGACCAAGG |
| GADPH           | F: GGAGAAAGCTGCCAAATATG<br>R: ACCAGGAAATGAGCTTGACA           |
| 18S             | F: TCAACTTTCGATGGTAGTGGCCGT<br>R: TCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGT   |

## Resultados

Os resultados da identificação e da expressão gênica dos genes candidatos, relacionados a apoptose (BAX e Bcl2), transporte de água e solutos (AQP3), falhas na formação e reexpansão da blastocle ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase  $\alpha$ 1 e  $\beta$ 1) e implantação embrionária (LIF, LIFr) estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Valores das médias e erro padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes candidatos em blastocistos caninos frescos, congelados/descongelados e vitrificados/aquecidos e após o cultivo *in vitro* de 24 horas.

| Genes candidatos                                  | n  | Controle               |                        | Congelado              |                        | Vitrificado            |                          |
|---------------------------------------------------|----|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
|                                                   |    | 0h                     | 24h                    | 0h                     | 24h                    | 0h                     | 24h                      |
| Bax                                               | 5  | 0,39±0,2 <sup>a</sup>  | 470,2±470 <sup>a</sup> | 0,79±0,58 <sup>a</sup> | 3±1,7 <sup>a</sup>     | 62,4±53 <sup>a</sup>   | 17678±14470 <sup>a</sup> |
| Bcl2                                              | 4  | 0,20±0,19 <sup>a</sup> | 0,14±0,13 <sup>a</sup> | 0,01±0,01 <sup>a</sup> | 0,1±0,8 <sup>a</sup>   | 1,57±1,49 <sup>a</sup> | 102±51,3 <sup>a</sup>    |
| AQP3                                              | 6  | 0,65±0,25 <sup>a</sup> | 226,1±215 <sup>a</sup> | 0,30±0,19 <sup>a</sup> | 8,4±8,02 <sup>a</sup>  | 2374±2352 <sup>a</sup> | 1085±609 <sup>a</sup>    |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase $\alpha$ 1 | 6  | 3,87±3,02 <sup>a</sup> | 22±21 <sup>a</sup>     | 5,85±5,74 <sup>a</sup> | 0,03±0,03 <sup>a</sup> | 6,29±4,31 <sup>a</sup> | 4567±4528 <sup>a</sup>   |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase $\beta$ 1  | 5  | 3,85±2 <sup>a</sup>    | 8,72±2,9 <sup>a</sup>  | 0,20±0,18 <sup>a</sup> | 91,2±61,3 <sup>a</sup> | 1398±1390 <sup>a</sup> | 6948±4894 <sup>a</sup>   |
| LIF                                               | -- | --                     | --                     | --                     | --                     | --                     | --                       |
| LIFr                                              | 4  | 0,25±0,19 <sup>a</sup> | 334,5±330 <sup>a</sup> | 2,06±1,13 <sup>a</sup> | 38,9±35 <sup>a</sup>   | 4431±3427 <sup>a</sup> | 37150±24000 <sup>a</sup> |

Valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

## Discussão

A criopreservação de embriões caninos foi descrita anteriormente por Kim et al. (2002) e Guaitolini et al. (2012). Ambos os autores utilizaram a congelação lenta como método de criopreservação e o glicerol 1,0M como crioprotetor. Já Abe et al. (2011) utilizaram o *cryotop* para a vitrificação de embriões caninos. Neste estudo as metodologias utilizadas foram a congelação lenta e a vitrificação já descritas para a criopreservação de embriões caninos, entretanto, nenhum dos autores descritos anteriormente identificaram e quantificaram a expressão gênica de embriões antes e depois da criopreservação.

De acordo com Fuller (2003) é importante investigar detalhadamente os efeitos genéticos resultantes da criopreservação, tanto em curto como em longo prazo, principalmente em gametas e embriões são criopreservados como forma de tratamentos de infertilidade ou para a formação de bancos de germoplasma para espécies em vias de extinção.

Os genes selecionados nesse estudo foram aqueles já identificados em outras espécies e que se relacionam com a qualidade e a possibilidade de desenvolvimento embrionário. A identificação e a expressão semelhantes dos genes candidatos nos embriões controle, congelados/descongelados e vitrificados/aquecidos permitiram aferir

a qualidade dos embriões após as metodologias utilizadas. Da mesma maneira se poderia comparar os métodos de criopreservação caso os resultados se apresentassem diferentes.

De acordo com os resultados obtidos o gene BAX foi identificado nos três grupos estudados e não houve diferença estatística na expressão deste gene entre os grupos e momentos. O mesmo resultado foi observado por Turathum et al. (2010) quando avaliaram esse mesmo gene em oócitos caninos submetidos a vitrificação. Provavelmente a criopreservação não interfira na expressão deste gene, o que seria benéfico, por não estimular a apoptose em células embrionárias.

A expressão do gene Bcl2 não diferiu estatisticamente entre os grupos e momentos, entretanto houve uma maior expressão no grupo vitrificado no momento 24h. A maior expressão do gene anti-apoptótico, Bcl2, no grupo Vi24, pode indicar que estes embriões tenham desencadeado um mecanismo de preservação celular, impedindo a liberação do citocromo c da mitocôndria (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN 2001).

Em relação a expressão de aquaporina 3 (AQP3) não houve diferença entre os grupos e momentos. Kuzmany et al. (2011) também não observaram diferença na expressão de AQP3 em embriões bovinos antes e após a congelação lenta. Já Camargo et al. (2005) observaram que embriões bovinos produzidos *in vivo*, com maior resistência a criopreservação, apresentaram maior expressão de AQP3. Os canais de AQP3 desempenham um papel ativo na manutenção do equilíbrio da pressão osmótica durante o processo de congelação e descongelação, evitando os danos osmóticos (NONG et al., 2013). Os embriões utilizados neste experimento foram obtidos *in vivo* e teoricamente seriam mais resistentes a criopreservação conforme resultados obtidos em outras espécies, talvez essa situação possa explicar os resultados semelhantes entre os grupos. Estudos com embriões caninos produzidos *in vitro* devem ser realizados e comparações entre os grupos devem resultar em resultados diferentes.

Uma expressão menor do gene AQP3 provavelmente altera a permeabilidade da membrana celular aos crioprotetores e conseqüentemente a criotolerância dos embriões (EDASHIGE et al., 2007). Os resultados deste estudo, ao contrário, demonstraram que os procedimentos adotados não alteraram a permeabilidade das membranas celulares mantendo a osmolaridade das células embrionárias. Em outro trabalho realizado em nosso laboratório objetivando a avaliação ultraestrutural de blastocistos caninos criopreservados pelas mesmas técnicas foi verificada ruptura das membranas celulares

fazendo crer que a manipulação embrionária foi extremamente danosa aos embriões polemizando os resultados encontrados (GUAITOLINI et al., 2014, dados não publicados).

Os genes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  foram expressos nos blastocistos caninos frescos, congelados e vitrificados. Não houve diferença estatística na expressão dos genes porém, a expressão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\beta 1$  foi maior no grupo vitrificado. Esses resultados provavelmente indicam problemas na fase de amplificação dos genes já que o esperado era maior expressão no grupo controle. Quando se comparam os grupos Co e Cg observa-se uma queda na expressão desses genes no grupo Cg, sugerindo um efeito negativo da congelação sobre a expressão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\beta 1$ .

As subunidades  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  foram identificadas em blastocistos de equinos e coelhos (GARDINER et al., 1990; WAELCHLI et al., 1997) e detectadas em vários estágios embrionários em ratos (WATSON e BARCROFT, 2001). A subunidade  $\alpha 1$  é expressa a partir do estágio de duas células até blastocisto (LATHAM et al., 1999). Já a  $\beta 1$  apenas em blastocistos. A expressão da subunidade  $\beta 1$  relaciona-se com a implantação e o início da formação da blastocle. Camargo et al. (2005) não observaram diferença na expressão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases  $\alpha 1$  em embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados/aquecidos e cultivados por 72 horas quando comparados a embriões frescos submetidos ao mesmo tempo de cultivo.

Neste estudo não foi detectado mRNA de LIF em blastocistos caninos. O mesmo resultado foi observado por Derussi (2012) em estudo anterior em nosso laboratório também com blastocistos caninos frescos, mas Schafer-Somi et al. (2008) detectaram mRNA para LIF em embriões caninos pré-implantação. Segundo Lei et al., (2004) a expressão deste gene pode estar relacionado ao estímulo materno.

A expressão de LIFr, entretanto, foi evidenciada nos embriões caninos e não diferiu estatisticamente entre os grupos estudados. O LIFr foi detectado em embriões de camundongos (NICHOLS et al., 1996), bovinos (ECKERT e NIEMANN, 1998) e humanos (CHEN et al., 1999). Na mulher sua presença nas células do trofoblasto é importante para o crescimento, diferenciação e sobrevivência embrionária (KWAK-KIM et al., 2005). A importância do LIFr para o desenvolvimento embrionário foi demonstrado em ratos e sua inativação leva a mortalidade embrionária (WARE et al., 1995). O LIFr tem participação na interação materno fetal em coelhos sendo detectados tanto no útero no período pré-implantação como em blastocistos (LEI et al., 2004).

O relevante e que deve ser mencionado é a identificação do LIFr nos embriões

caninos mas não do LIF. Acredita-se que a presença do receptor reforça ou no mínimo supõe a identificação da proteína. Provavelmente problemas relacionados a coleta e/ou a manipulação embrionária respondem pela ausência ou não identificação do LIF. O trabalho desenvolvido por Derussi (2012) utilizou a mesma metodologia utilizada nesse estudo e talvez adaptações devam ser realizadas para a identificação desse gene.

Por outro lado o fato das cadelas não apresentarem mecanismos de reconhecimento materno da gestação como evidenciado em outras espécies, possa estar relacionado a não identificação desse gene nos blastocistos. Essa hipótese entretanto é prematura e necessita de maiores estudos para comprovação.

Os embriões do grupo vitrificado nos momentos 0 e 24h apresentaram uma expressão muito alta de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase  $\beta 1$  e LIFr. Esses resultados devem ser avaliados com cautela, pois podem ter sido influenciados pelo processo de amplificação do RNA. A amplificação do RNA é necessária para avaliação do perfil de expressão gênica em amostras pequenas. De acordo com Diboun et al. (2006) as técnicas de amplificação são reprodutíveis, mas podem distorcer a verdadeira concentração dos genes alvos. No entanto, as consequências de tais distorções sobre a capacidade de detectar variação biológica na expressão não foram exploradas para definir a verdadeira utilidade e limitações de tais técnicas de amplificação.

Os resultados obtidos não permitem comparar com segurança as duas metodologias de criopreservação consideradas. A super expressão dos genes evidenciada no grupo dos embriões vitrificados é artificial e não permite comparações. Outros trabalhos enfatizando a metodologia de amplificação de RNA em embriões caninos devem ser realizados. Todos os genes selecionados, com exceção do LIF, foram identificados em blastocistos caninos obtidos *in vivo* e também naqueles submetidos a criopreservação.

## Referências

- ABE, Y.; SUWA, Y.; TOMOYOSHI, A.; UETA Y. Y.; KOBAYASHI, N.; OHSHIMA, N.; SHIRASUNA, S.; ABDEL-GHANI, M. A.; OI, M.; KOBAYASHI, Y.; MIYOSHI, M.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 363-368, 2011.
- BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. **Development and Biology**, v. 256, p. 342-354, 2003.
- CAMARGO, L.S.A.; POWELL, A.M.; do VALE FILHO, V.R.; WALL, R.J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by *in vitro* fertilization or somatic cell nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.487-496, 2005.
- CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1049-1056, 2010.
- CHEN, H.F.; SHEW, J.Y.; HO, H.N.; HSU, W.L.; YANG, Y.S. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 713–719, 1999.
- DERUSSI, A.A.P. Expressão gênica, caracterização eletroforética e análise ultraestrutural de embriões e tecido materno de cadelas gestantes e não gestantes. **Tese (doutorado)** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 132, 2012.
- DIBOUN, I.; WERNISCH, L.; ORENGO, C.A.; KOLTZENBURG, M. Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1-14, 2006.
- DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T.

Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Supl 1), p. 171-190, 2006.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 957–965, 1998.

EDASHIGE, K.; KASAI, M. The movimento of water and cryoptotectans in mammalian oocytes and embryos and its relevance to cryopreservation. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 24, p. 18-22, 2007.

EDASHIGE, K.; OHTA, S.; TANAKA, M.; KUWANO, T.; VALDEZ JR, D.M.; HARA, T.; JIN, B.; S. TAKAHASHI, S.; SEKI, S.; KOSHIMOTO, C.; KASAI, M. The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 365-375, 2007.

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

FULLER, B.J. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. **CryoLetters**, v. 24, p.95-102, 2003.

GARDINER, C.S.; GROBNER, M.A.; MENINO JR., A.R. Sodium/potassium adenosine triphosphatase  $\alpha$ -subunit and  $\alpha$ -subunit mRNA levels in early rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 539–544, 1990.

GUAITOLINI, C.R.F.; TAFFAREL, M.O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, M. J.; FREITAS, P.M.C.; LOPES, M.D.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; OLIVEIRA, C.A.; LUZ, M.R. Post-thaw viability of in vivo-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. **Theriogenology**, v. 78, p. 576–582, 2012.

KIM, Y.J.; KIM, B.J.; YOU, I.J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. **The Korean Society of Veterinary Clinics**, v. 19, p. 73-79, 2002.

KOJIMA, K.; KANZAKI, H.; IWAI, M.; HATAYAMA, H.; FUJIMOTO, M.;

NARUKAWA, S.; HIGUCHI, T.; KANEKO, Y.; MORI, T.; JUJITA, J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. **Human Reproduction**, v. 10, p. 1907–1911, 1995.

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

KWAK-KIM, J.Y.; GILMAN-SACHS, A.; KIM, C.E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 88, p. 64–79, 2005.

LATHAM, K.E.; KUTYNA, K.; WANG, Q. Genetic variation in trophectoderm function in parthenogenetic mouse embryos. **Developmental Genetics**, v. 24, p. 329–335, 1999.

LEE, H.S.; YIN, X.J.; KONG, I.K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology**, v. 66, p. 1468-1470, 2006.

LEI, T.; YANG, T.; XIA, M.; GAN, L.; CHEN, X.D.; YUAN, J.; ZHU, Y. Stage-specific expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 13-18, 2004.

LUZ, M.R.; HOLANDA, C.C.; PEREIRA, J.J.; FREITAS, P.M.C.; SALGADO, A.E.P.; GIANNOTTI, J.G.; OLIVEIRA, S.B.; TEIXEIRA, N.S.; GUAITOLINI, C.R.F. High embryonic recovery rates with in vivo and ex vivo techniques in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 724–727, 2010.

NICHOLS, J.; DAVIDSON, D.; TAGA, T.; YOSHIDA, K.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early

mouse embryogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 57, p. 123–131, 1996.

NICOLA, E. S.; DESCHAMPS, J. C.; JÚNIOR, M. M.; SOBRINHO, J. B. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v.29, p.111-115, 1999.

NONG, Y.; LIU, F.; CHEN, Y.; WANG, F. The expression and distribution of aquaporin 3 in mouse embryos before and after vitrification. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 601-606, 2013.

SCHÄFER-SOMI, S.; BECERIKLISOY H.B.; BUDIK, S.; KANCA, H.; AKSOY, O.A.; POLAT, B.; CETIN, Y.; AY, S.S.; ASLAN, S. Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: implications for an active role of the embryo before and during invasion. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 656-663, 2008.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.401-405, 2001.

TURATHUM, B.; SAIKHUN, K.; SANGSUWAN, P.; KITIYANANT, Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, p. 1-9, 2010.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p. 1-12, 2002.

WAELECHLI, R.O.; MACPHEE, D.J.; KIDDER, G.M.; BETTERIDGE, K.J. Evidence for the presence of sodium- and potassium dependent adenosine triphosphatase  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunit isoforms and their probable role in blastocyst expansion in the preattachment horse conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 630–640, 1997.

WARE, C.B.; HOROWITZ, M.C.; RENSHAW, B.R.; HUNT, J.S.; LIGGITT, D.; KOBLAR, S.A.; GLINIAK, B.C.; MCKENNA, H.J.; PAPAYNNOPOULOU, T.; THOMA, B.; CHENG, L.; DONOVAN, P.J.; PESCHON, J.J.; BARTLETT, P.F.; WILLIS, C.R.; WRIGHT, B.D.; CARPENTER, M.K.; DAVIDSON, B.L.; GEARING, D.P. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitor factor gene causes placental, skeletal, neutral and metabolic defects and results in perinatal death. **Development**, v.121, p. 1283–1299, 1995.

WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 583-592, 2004.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125–126, 1971.

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

## *Considerações Finais*

## 6. Considerações Finais

Destaca-se a importância da criopreservação embrionária como ferramenta na formação de “zoológicos congelados”, auxiliando na preservação de animais em extinção. Há necessidade de esclarecimentos sobre a grande quantidade de lipídios intracitoplasmática observados nos embriões caninos e se essa particularidade está ou não envolvida na criotolerância dos embriões.

Com os resultados observados podemos observar:

- o A avaliação da viabilidade embrionária não deve ser realizada apenas por uma variável. Falha na reexpansão da blastocle durante o cultivo *in vitro* pode ser um indicativo da degeneração embrionária;
- o Embriões caninos vitrificados / aquecidos mantém as características ultraestruturais;
- o Com execução do LIF todos os outros genes candidatos foram expressos em embriões caninos;
- o Mais estudos relacionados a amplificação de RNA em embriões caninos devem ser realizados.

## *Referências*

## Referências

ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, v. 57, p. 1273-1283, 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.

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

ABE, Y.; SUWA, Y.; TOMOYOSHI, A.; UETA Y. Y.; KOBAYASHI, N.; OHSHIMA, N.; SHIRASUNA, S.; ABDEL-GHANI, M. A.; OI, M.; KOBAYASHI, Y.; MIYOSHI, M.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 363-368, 2011.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. In *New Trends in Embryo Transfer*, Ed. A Lauria & F Gandolfi. **Cambridge: Portland Press**, ed. 1, p 255–264. 1992.

BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophoctoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. **Development and Biology**, v. 256, p. 342-354, 2003.

BENGA, G. Water channels proteins (later called aquaporins) and relatives: past, presente, and future. **IUBMB Life**. v. 61, p. 112-133, 2009.

BETTENCOURT, E.M.V.; BETTENCOURT, C.M.; SILVA, J.N.C.E.; FERREIRA, P.; DE MATOS, C.P.; OLIVEIRA, E.; ROMÃO, R.J.; ROCHA, A.; SOUSA, M. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 947–958, 2009.

BETTS, D.H.; BARCROFT, L.C.; WATSON, A.J. Na/K-ATPase mediated  $^{86}\text{Rb}^+$  uptake and asymmetrical trophectoderm localization of  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  Na/K-ATPase isoforms during bovine preattachment development. **Developmental Biology**, v. 197, p. 77–92, 1998.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 615-647, 2003.

CAMARGO, L.S.A.; POWELL, A.M.; do VALE FILHO, V.R.; WALL, R.J. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by *in vitro* fertilization or somatic cell nuclear transfer. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.487-496, 2005.

CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1049-1056, 2010.

CHEN, H.F.; SHEW, J.Y.; HO, H.N.; HSU, W.L.; YANG, Y.S. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 713–719, 1999.

CROWE, J.; CROWE, L.; MOURADIAN, R. Stabilization of biological membranes at low water activities. **Cryobiology**, v. 20, p. 346-356, 1983.

DALCIN, L.; SILVA, R.C.; PAULINI, F.; SILVA, B.D.M.; NEVES, J.P.; LUCCI, C.M. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v. 67, p. 137-145, 2013.

DE LA FUENTE, R.; KING, W.A. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. **Zygote**, v. 5, p.309-320, 1997.

DERUSSI, A.A.P. Expressão gênica, caracterização eletroforética e análise

ultraestrutural de embriões e tecido materno de cadelas gestantes e não gestantes. **Tese (doutorado)** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 132, 2012.

DESAI, N.; GOLDFARB, J. Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst. **Reproductive BioMedicine Online**, v. II, n. 3, p. 349-354, 2005.

DIBOUN, I.; WERNISCH, L.; ORENGO, C.A.; KOLTZENBURG, M. Microarray analysis after RNA amplification can detect pronounced differences in gene expression using limma. **BMC Genomics**, v. 7, p. 1-14, 2006.

DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Supl 1), p. 171-190, 2006.

DOBBS, K.B.; RODRIGUEZ, M.; SUDANO, M.J.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation Bovine embryo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2013.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 285-302, 2002.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 957-965, 1998.

EDASHIGE, K.; KASAI, M. The movimento of water and cryoptotectans in mammalian oocytes and embryos and its relevance to cryopreservation. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 24, p. 18-22, 2007.

EDASHIGE, K.; OHTA, S.; TANAKA, M.; KUWANO, T.; VALDEZ JR, D.M.; HARA, T.; JIN, B.; S. TAKAHASHI, S.; SEKI, S.; KOSHIMOTO, C.; KASAI, M. The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 365-375, 2007.

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

FULLER, B.J. Gene expression in response to low temperatures in mammalian cells: a review of current ideas. **CryoLetters**, v. 24, p.95-102, 2003.

GARDINER, C.S.; GROBNER, M.A.; MENINO JR., A.R. Sodium/potassium adenosine triphosphatase  $\alpha$ -subunit and  $\alpha$ -subunit mRNA levels in early rabbit embryos. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 539–544, 1990.

GUAITOLINI, C.R.F.; TAFFAREL, M.O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, M. J.; FREITAS, P.M.C.; LOPES, M.D.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; OLIVEIRA, C.A.; LUZ, M.R. Post-thaw viability of in vivo-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. **Theriogenology**, v. 78, p. 576–582, 2012.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 919-925, 1997.

HAYASHI, S.; KOBAYASHI, K.; MIZUNO, J.; SAITOH, K.; HIRANO S. Birth of piglets from frozen embryos. **Veterinary Records**, v.125, p. 43-44, 1989.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C. Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 57, p. 111-125, 2001.

JOHNSON, M.H., ZIOMEK, C.A. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry and stability. **Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 303-308, 1981.

KADER, A.; SHARMA, R.K.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Mouse blastocyst previtrification interventions and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 1518-1525, 2010.

KIM, Y.J.; KIM, B.J.; YOU, I.J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. **The**

**Korean Society of Veterinary Clinics**, v. 19, p. 73-79, 2002.

KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P. Comparison of actual vs. synthesized ternary phase diagrams for solutes of cryobiological interest. **Cryobiology**, v. 54, p. 212-222, 2007.

KOJIMA, K.; KANZAKI, H.; IWAI, M.; HATAYAMA, H.; FUJIMOTO, M.; NARUKAWA, S.; HIGUCHI, T.; KANEKO, Y.; MORI, T.; JUJITA, J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. **Human Reproduction**, v. 10, p. 1907–1911, 1995.

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

KWAK-KIM, J.Y.; GILMAN-SACHS, A.; KIM, C.E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 88, p. 64–79, 2005.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Ultrastructural study of pre-implantation dog embryos. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 14, p. 213–217, 1997.

LATHAM, K.E.; KUTYNA, K.; WANG, Q. Genetic variation in trophectoderm function in parthenogenetic mouse embryos. **Developmental Genetics**, v. 24, p. 329–335, 1999.

LEE, H.S.; YIN, X.J.; KONG, I.K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology**, v. 66, p. 1468-1470, 2006.

LEI, T.; YANG, T.; XIA, M.; GAN, L.; CHEN, X.D.; YUAN, J.; ZHU, Y. Stage-specific expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-

implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 13-18, 2004.

LEIBO, S.; McGRATH, J.; CARVALHO, E. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilised mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v.15, p. 257-271, 1978.

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

LEIBO, S.P.; POLLARD, J.W.; MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of “reassembled” *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v 39, p. 265, 1993. (Abstract).

LEIBO, S.P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v. 57, p. 303-326, 2002.

LINDEBERG, H.; JALKANEN, L.; SAVOLAINEN, R. *In vitro* culture of silver fox embryos. **Theriogenology**, v. 40, p. 779-788, 1993.

LINDNER, G.M.; WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-416, 1983.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction and Nutritional Development**, v. 40, p. 505-512, 2000.

LUZ, M.R.; HOLANDA, C.C.; PEREIRA, J.J.; FREITAS, P.M.C.; SALGADO, A.E.P.; GIANNOTTI, J.G.; OLIVEIRA, S.B.; TEIXEIRA, N.S.; GUAITOLINI, C.R.F. High embryonic recovery rates with *in vivo* and *ex vivo* techniques in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 724–727, 2010.

LUZ, M.R.; HOLANDA, C.C.; PEREIRA, J.J.; TEIXEIRA, N.S.; VANTINI, R.; FREITAS, P.M.C.; SALGADO, A.E.P.; OLIVEIRA, S.B.; GUAITOLINI, C.R.F.;

SANTOS, M.C. Survival rate and *in vitro* development of *in vivo* produced and cryopreserved dog embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 208-209, 2011.

MACPHEE, D.J.; BARR, K.J.; WATSON, A.J.; KIDDER, G.M. Role of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase in trophoctoderm differentiation and cavitation. **Trophoblast Research**, v. 11, p. 87-99, 1998.

MACPHEE, D.J.; JONES, D.H.; BARR, K.J.; BETTS, D.H.; WATSON, A.J.; KIDDER, G.M. Differential involvement of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase isozymes in preimplantation development of the mouse. **Developmental Biology**, v. 222, p. 486-498, 2000.

MATTOS, R.F.M. Resposta Ovariana, qualidade embrionária e retorno à atividade reprodutiva natural em felinos domésticos (*Felis catus*) submetidos a diferentes tratamentos hormonais para indução do estro e ovulação. 146p. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

MELLO, M.R.B.; QUEIROZ, V.S.; LIMA, A.S.; TAVARES, L.M.T.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.O.; WHEELER, M.B.; VISINTIN, J.A. Criopreservação de mórulas de camundongos por diferentes métodos: lento, vitrificação e rápido. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 160-164, 2001.

NICHOLS, J.; DAVIDSON, D.; TAGA, T.; YOSHIDA, K.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 57, p. 123–131, 1996.

NICOLA, E. S.; DESCHAMPS, J. C.; JÚNIOR, M. M.; SOBRINHO, J. B. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v.29, p.111-115, 1999.

NONG, Y.; LIU, F.; CHEN, Y.; WANG, F. The expression. and distribution of aquaporin 3 in mouse embryos before and after vitrification. **Journal of Assisted**

**Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 601-606, 2013.

OFFENBERG, H.; BARCROFT, L.C.; CAVENEY, A.; VIUFF, D.; THOMSEN, P.D.; WATSON, A.J. mRNAs encoding aquaporins are present during murine preimplantation development. **Molecular Reproduction Development**. v. 57, p. 323-330, 2000.

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

PANTANO, T.; MELLO, M.R.B.; GARCIA, J.F.; HO, L.L.; VISINTIN, J.A. Efeitos do crioprotetor e da temperatura de imersão em nitrogênio líquido sobre o desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de mórulas de camundongos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, 2000.

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

PLANO DE AÇÃO - PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE MAMÍFEROS CARNÍVOROS DO BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. São Paulo: Ibama, 2004.

PRYOR, J.H.; LOONEY, C.R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D.C.; LONG, C.R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.

PYLES, E.S.C.S. Vitrificação de ovócitos bovinos: efeito do método e do estágio de maturação sobre o desenvolvimento embrionário. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 99, 2002.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; FILHO, A.S.S.; ANDRADE, J. C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Varela – São Paulo, p. 127- 178, 2002.

RIGGS, R.; MAYER, J.; DOWLING-LACEY, D.; CHI, T.F.; JONES, E.; OEHNINGER, S. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 109–115, 2010.

ROMEK, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWIEZ, E.; SMORAG, Z. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 24-32, 2008.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 141, p. 1-19, 2011.

SCHÄFER-SOMI, S.; BECERIKLISOY H.B.; BUDIK, S.; KANCA, H.; AKSOY, O.A.; POLAT, B.; CETIN, Y.; AY, S.S.; ASLAN, S. Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: implications for an active role of the embryo before and during invasion. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 656-663, 2008.

SCHIEWE, M. C.; RALL, W. F.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. **Theriogenology**, v.36, p.279-293, 1991.

SEKI, S.; MAZUR, P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 59, p. 75–82, 2009.

SHU, Y.; WATT, J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. **Fertility and Sterility**, v.91, n.2, p. 401-406, 2009.

SKIDMORE, J.A.; SCHOEVEERS, E.; STOUT, T.A.E. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus*

*dromedarius*) embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 196-204, 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.2-22, 2007.

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

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3 ed. Illinois: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões 1999.

SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A.; FERREIRA, C.R.; PASCHOAL, D.M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1-11, 2012.

TOMINAGA K.; SHIMIZU M.; OOHAMA S.; IZAIKE Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different development stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1669-1680, 2000.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.401-405, 2001.

TURATHUM, B.; SAIKHUN, K.; SANGSUWAN, P.; KITTYANANT, Y. Effects of vitrification on nuclear maturation, ultrastructural changes and gene expression of canine oocytes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, p. 1-9, 2010.

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. **CryoLetters**, v. 18, p.191-195, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p. 1-12, 2002.

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

VIANA, S. W. Expressão gênica em embriões de *Bos taurus* e *Bos indicus* produzidos *in vivo* e *in vitro*. 2009. 88p. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

VISINTIN, J.A.; GARCIA, J.F.; PANTANO, T.; D'ÁVILA ASSUMPÇÃO, M.E.O. Criopreservação de mórulas de camundongos em glicerol, sacarose e geléia real. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, 2000.

VOET, D.; VOET, J. Metabolismo do glicogênio. In:\_\_\_\_\_. Bioquímica. Artmed – São Paulo. 3 ed. p. 626-656, 2006.

WAEELCHLI, R.O.; MACPHEE, D.J.; KIDDER, G.M.; BETTERIDGE, K.J. Evidence for the presence of sodium- and potassium dependent adenosine triphosphatase  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunit isoforms and their probable role in blastocyst expansion in the preattachment horse conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 630–640, 1997.

WARE, C.B.; HOROWITZ, M.C.; RENSHAW, B.R.; HUNT, J.S.; LIGGITT, D.; KOBLAR, S.A.; GLINIAK, B.C.; MCKENNA, H.J.; PAPAYNNOPOULOU, T.; THOMA, B.; CHENG, L.; DONOVAN, P.J.; PESCHON, J.J.; BARTLETT, P.F.; WILLIS, C.R.; WRIGHT, B.D.; CARPENTER, M.K.; DAVIDSON, B.L.; GEARING, D.P. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitor factor gene causes placental, skeletal, neutral and metabolic defects and results in perinatal death. **Development**, v.121, p. 1283–1299, 1995.

WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 583-592, 2004.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125–126, 1971.

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

WILDT, D.E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 20, p. 391-395, 1989.

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

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

YAMANAKA, Y.; RALSTON, A.; STEPHENSON, R.; ROSSANT, J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. **Development Dynamics**, v. 235, p. 2301-2314, 2006.

ZANDER-FOX, D.; LANE, M.; HAMILTONA, H. Slow freezing and vitrification of mouse morula and early blastocysts. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 1091-1098, 2013.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

*Anexos*

## Anexos

### Manual Kit de Extração RNeasy Micro Kit

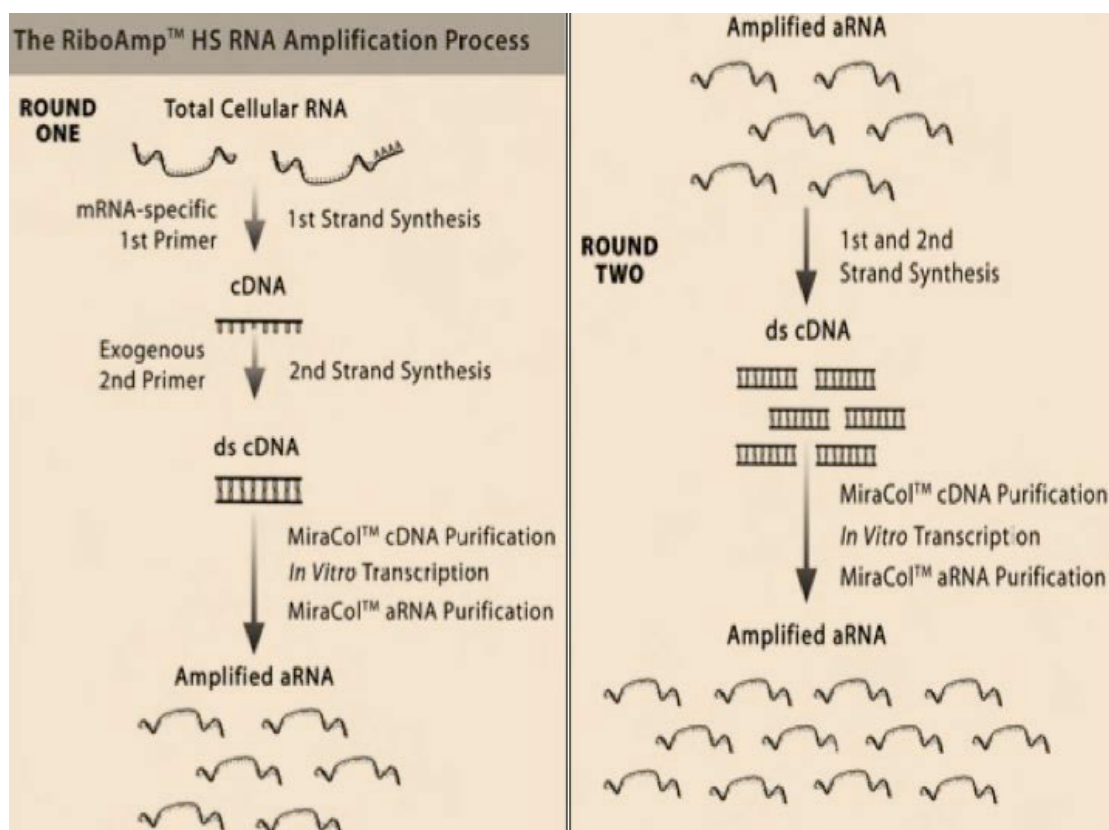
1. Adicionar 350µL do tampão RLT + 3,5 µL de β-mercaptoetanol a amostra e colocar no vórtex por 1 minuto;
2. Adicionar 350µL de álcool 70%, homogeneizar com a pipeta;
3. Transferir o conteúdo para a RNeasy MinElute e centrifugar por 15 segundos a 10000xg, desprezar o conteúdo do tubo coletor;
4. Adicionar 350µL do *buffer* RW1 para a RNeasy MinElute e centrifugar por 15 segundos a 10000xg, desprezar o conteúdo do tubo coletor;
5. Adicionar 500µL de álcool 80% para a RNeasy MinElute e centrifugar por 15 segundos a 10000xg, desprezar o conteúdo do tubo coletor;
6. Passar a coluna RNeasy MinElute para tubos de 1,5mL RNase-free, e deixá-las abertas por 5 minutos para que sequem a membrana;
7. Adicionar 30µL de H<sub>2</sub>O RNase-free direto na membrana no centro da coluna e centrifugar por 5 minutos a 10000xg.
8. Armazenar as amostras em freezer -80°C.

### Manual Kit de Amplificação RiboAmp HS Plus

O Kit utiliza duas etapas e cinco passos para o processo de amplificação linear da fração do mRNA do total do RNA celular.

1. 1ª reação de síntese e incorporação ao cDNA da sequência promotora T7;
2. 2ª reação de síntese utilizando primers exógenos produzindo a dupla fita de cDNA;
3. Purificação do cDNA utilizando a coluna de purificação MiraCol;
4. Transcrição in vitro (IVT) utilizando a RNA polimerase T7 gerando o RNA antisense (aRNA);
5. Isolamento do aRNA com a coluna de purificação MiraCol.

Esquema do processo de amplificação:



### Protocolo de Amplificação RiboAmp HS Plus

#### 1 – 1ª Etapa – RiboAmp HS Plus

##### 1.1. Primeiro passo: 1ª etapa de síntese do cDNA

1. Adicionar de 10-11  $\mu\text{L}$  da amostra de RNA em um microtubo RNase-free de 0,5 ou 0,2 mL e colocar no gelo a 4-8°C;
2. Homogeneizar bem e centrifugar (mini spin) o Primer 1 (cinza 1);
3. Adicionar 1,0  $\mu\text{L}$  do Primer 1, homogeneizar bem e centrifugar (mini spin);
4. Incubar por 05 minutos a 65°C. Em seguida resfriar a 4-8°C por pelo menos 1 minuto;
5. Preparar o MIX conforme a tabela abaixo e adicione 9,0  $\mu\text{L}$  do mix as amostras;

| Mix da primeira etapa de síntese |                               |             | 6 reações Master Mix com 10% de sobra ( $\mu\text{L}$ ) |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|
| Componentes                      | Volume - $\mu\text{L}$ (+10%) | Tubo        |                                                         |
| Enhancer                         | 2 (2,2)                       | Amarelo – E | 13,2                                                    |

|                                                 |         |              |      |
|-------------------------------------------------|---------|--------------|------|
| 1st Strand Master Mix                           | 5 (5,5) | Vermelho – 1 | 33,0 |
| 1st Strand Enzyme Mix                           | 1 (1,1) | Vermelho – 2 | 6,6  |
| Superscript III Enzyme<br>(Não incluída no Kit) | 1 (1,1) |              | 6,6  |
| Total por amostra                               | 9 (9,9) |              | 59,4 |

6. Após adicionar o mix incubar por 01 hora a 42°C e resfriar as amostras a 4-8°C por pelo menos 1 minuto;
7. Adicionar 2,0 µL Nuclease Mix (dourado) a amostra, homogeneizar bem e centrifugar (mini spin);
8. Incubar a amostra por 30 minutos a 37°C e posteriormente por 05 minutos 95°C.
9. Resfriar as amostras a 4-8°C por pelo menos 01 minuto.

**IMPORTANTE: Neste passo o protocolo pode ser interrompido de forma segura. Se interrompido as amostras devem ser estocadas em freezer - 20°C, overnight.**

#### 1.2. Segundo passo: 2ª etapa de síntese do cDNA

1. Colocar as amostras no gelo (4-8°C), deixar descongelar se estiver congelado;
2. Homogeneizar bem e centrifugar (mini spin) o Primer 2 (cinza 2);
3. Adicionar 1,0 µL do Primer 2, homogeneizar bem e centrifugar (mini spin);
4. Incubar as amostras por 02 minutos a 95°C, em seguida resfriar a 4-8°C por pelo menos 02 minutos;
5. Preparar o MIX de acordo com a tabela abaixo e adicionar 30 µL do mix as amostras;

| Mix da segunda etapa de síntese |                       |       | 6 reações Master Mix com<br>10% de sobra (µL) |
|---------------------------------|-----------------------|-------|-----------------------------------------------|
| Componentes                     | Volume - µL<br>(+10%) | Tubo  |                                               |
| 2nd Strand Master Mix           | 29 (31,9)             | Verde | 191,4                                         |
| 2nd Strand Enzyme Mix           | 1 (1,1)               | Verde | 6,6                                           |
| Total por amostra               | 30 (33,0)             |       | 198,0                                         |

6. Incubar as amostras por:
  - 10 minutos a 25°C;
  - 30 minutos a 37°C;

- 05 minutos a 70°C;
- Resfriar a 4-8°C até estar pronto para continuar (não ultrapassar 30 minutos).

### 1.3. Terceiro passo: Purificação do cDNA

1. Adicione 250 µL do DNA Binding Buffer (DB) a coluna de purificação. Deixar por 05 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 01 minuto a 16000 x g;
2. Adicionar 200 µL do DNA Binding Buffer (DB) a amostra, homogeneizar e transferir todo o conteúdo para a coluna de purificação;
3. Centrifugar por 02 minutos a 100 x g e imediatamente após por 01 minuto a 10000 x g;
4. Adicionar 250 µL do DNA Wash Buffer (DW) a coluna de purificação e centrifugar por 03 minutos a 16000 x g;
5. Descartar o tubo coletor da coluna e acondiciona-la em um micro tubo, RNA free, de 1,5 mL.
6. Adicionar 11 µL do DNA Elution Buffer (DE) ao centro da coluna de purificação, sem tocá-la, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;
7. Centrifugar por 01 minuto a 1000 x g e depois por 01 minuto a 16000 x g. Descartar a coluna de purificação e guardar a solução de cDNA.

**IMPORTANTE: Neste passo o protocolo pode ser interrompido de forma segura. Se interrompido as amostras devem ser estocadas em freezer - 20°C, overnight.**

### 1.4. Quarto passo: Transcrição in vitro

1. Preparar o MIX de acordo com a tabela abaixo e acrescentar 12 µL as amostras

| Mix da transcrição in vitro |                       |             | 6 reações Master Mix com 10% de sobra (µL) |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|--------------------------------------------|
| Componentes                 | Volume - µL<br>(+10%) | Tubo        |                                            |
| IVT Buffer                  | 2 (2,2)               | Azul – 1    | 13,2                                       |
| IVT Master Mix              | 6 (6,6)               | Azul – 2    | 39,6                                       |
| IVT Enzyne MIX              | 2 (2,2)               | Azul – 3    | 13,2                                       |
| Enhancer                    | 2 (2,2)               | Amarelo - E | 13,2                                       |
| Total por amostra           | 12 (13,2)             |             | 79,2                                       |

2. Incubar as amostras por 06 horas a 42°C e resfria-las a 4-8°C;
3. Acrescentar 1 µL da DNase Mix (azul 4) e incubar por 15 minutos a 37°C. Resfriar as amostras a 4-8°C.
4. Iniciar imediatamente a purificação do aRNA.

#### 1.5. Quinto Passo: Purificação do aRNA

1. Adicione 250 µL do RNA Binding Buffer (RB) a coluna de purificação. Deixar por 05 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 01 minuto a 16000 x g;
2. Adicionar 120 µL do RNA Binding Buffer (RB) a amostra, homogeneizar e transferir todo o conteúdo para a coluna de purificação;
3. Centrifugar por 02 minutos a 100 x g e imediatamente após por 01 minuto a 10.000 x g;
4. Acrescentar 200 µL do RNA Wash Buffer (RW) a coluna de purificação e centrifugar por 01 minutos a 10000 x g
5. Adicionar 200 µL do RNA Wash Buffer (RW) a coluna de purificação e centrifugar por 03 minutos a 16000 x g;
6. Descartar o tubo coletor da coluna e acondiciona-la em um micro tubo, RNA free, de 1,5 mL.
7. Adicionar 12 µL do RNA Elution Buffer (RE) ao centro da coluna de purificação, sem tocá-la, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;
8. Centrifugar por 01 minuto a 1000 x g e depois por 01 minuto a 16000 x g. Descartar a coluna de purificação e guardar a solução de cDNA.
9. Iniciar imediatamente a Segundo Passo ou armazenar o aRNA purificado a -70°C, overnight.

## 2 – 2ª Etapa – RiboAmp HS Plus

### 2.1. Primeiro passo: 1ª etapa de síntese do cDNA

1. Homogeneizar bem e centrifugar (mini spin) o Primer 2 (cinza 2);
2. Adicionar 1,0 µL do Primer 2 as amostras obtidas na primeira etapa, homogeneizar bem e centrifugar (mini spin);
3. Incubar por 05 minutos a 65°C. Em seguida resfriar a 4-8°C por pelo menos 1 minuto;
4. Preparar o MIX conforme a tabela abaixo e adicione 9,0 µL do mix as amostras;

| Mix da primeira etapa de síntese |                    |      | 6 reações Master Mix com 10% de sobra (µL) |
|----------------------------------|--------------------|------|--------------------------------------------|
| Componentes                      | Volume - µL (+10%) | Tubo |                                            |

|                                                 |         |              |      |
|-------------------------------------------------|---------|--------------|------|
| Enhancer                                        | 2 (2,2) | Amarelo – E  | 13,2 |
| 1st Strand Master Mix                           | 5 (5,5) | Vermelho – 1 | 33,0 |
| 1st Strand Enzyme Mix                           | 1 (1,1) | Vermelho – 2 | 6,6  |
| Superscript III Enzyme<br>(Não incluída no Kit) | 1 (1,1) |              | 6,6  |
| Total por amostra                               | 9 (9,9) |              | 59,4 |

5. Após adicionar o mix incubar por 10 minutos a 25°C e posteriormente por 1 hora a 37°C;
6. Resfriar as amostras a 4-8°C por pelo menos 01 minuto.

**IMPORTANTE: Neste passo o protocolo pode ser interrompido de forma segura. Se interrompido as amostras devem ser estocadas em freezer - 20°C, overnight.**

## 2.2. Segundo passo: 2ª etapa de síntese do cDNA

1. Colocar as amostras no gelo (4-8°C), deixar descongelar se estiver congelado;
2. Homogeneizar bem e centrifugar (mini spin) o Primer 3 (cinza 3);
3. Adicionar 1,0 µL do Primer 3, homogeneizar bem e centrifugar (mini spin);
4. Incubar as amostras por 05 minutos a 95°C, em seguida resfriar a 4-8°C por pelo menos 01 minutos;
5. Preparar o MIX de acordo com a tabela abaixo e adicionar 30 µL do mix as amostras;

| Mix da segunda etapa de síntese |                    |       | 6 reações Master Mix com 10% de sobra (µL) |
|---------------------------------|--------------------|-------|--------------------------------------------|
| Componentes                     | Volume - µL (+10%) | Tubo  |                                            |
| 2nd Strand Master Mix           | 29 (31,9)          | Verde | 191,4                                      |
| 2nd Strand Enzyme Mix           | 1 (1,1)            | Verde | 6,6                                        |
| Total por amostra               | 30 (33,0)          |       | 198,0                                      |

7. Incubar as amostras por:
  - 30 minutos a 37°C;
  - 05 minutos a 70°C;
  - Resfriar a 4-8°C até estar pronto para continuar (não ultrapassar 30 minutos).

### 2.3. Terceiro passo: Purificação do cDNA

1. Adicione 250  $\mu\text{L}$  do DNA Binding Buffer (DB) a coluna de purificação. Deixar por 05 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 01 minuto a 16000 x g;
2. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  do DNA Binding Buffer (DB) a amostra, homogeneizar e transferir todo o conteúdo para a coluna de purificação;
3. Centrifugar por 02 minutos a 100 x g e imediatamente após por 01 minuto a 10000 x g;
4. Adicionar 250  $\mu\text{L}$  do DNA Wash Buffer (DW) a coluna de purificação e centrifugar por 03 minutos a 16000 x g;
5. Descartar o tubo coletor da coluna e acondiciona-la em um micro tubo, RNA free, de 1,5 mL.
6. Adicionar 11  $\mu\text{L}$  do DNA Elution Buffer (DE) ao centro da coluna de purificação, sem tocá-la, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;
7. Centrifugar por 01 minuto a 1000 x g e depois por 01 minuto a 16000 x g. Descartar a coluna de purificação e guardar a solução de cDNA.

**IMPORTANTE: Neste passo o protocolo pode ser interrompido de forma segura. Se interrompido as amostras devem ser estocadas em freezer - 20°C, overnight.**

### 2.4. Quarto passo: Transcrição in vitro

1. Preparar o MIX de acordo com a tabela abaixo e acrescentar 12  $\mu\text{L}$  as amostras

| Mix da transcrição in vitro |                                  |                | 6 reações Master Mix com 10% de<br>sobra ( $\mu\text{L}$ ) |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------|
| Componentes                 | Volume - $\mu\text{L}$<br>(+10%) | Tubo           |                                                            |
| IVT Buffer                  | 2 (2,2)                          | Azul – 1       | 13,2                                                       |
| IVT Master Mix              | 6 (6,6)                          | Azul – 2       | 39,6                                                       |
| IVT Enzyne<br>MIX           | 2 (2,2)                          | Azul – 3       | 13,2                                                       |
| Enhancer                    | 2 (2,2)                          | Amarelo -<br>E | 13,2                                                       |
| Total por<br>amostra        | 12 (13,2)                        |                | 79,2                                                       |

2. Incubar as amostras por 06 horas a 42°C e resfria-las a 4-8°C;
3. Acrescentar 1  $\mu\text{L}$  da DNase Mix (azul 4) e incubar por 15 minutos a 37°C. Resfriar as amostras a 4-8°C;

4. Iniciar imediatamente a purificação do aRNA.

## 2.5. Quinto Passo: Purificação do aRNA

1. Adicione 250  $\mu$ L do RNA Binding Buffer (RB) a coluna de purificação. Deixar por 05 minutos a temperatura ambiente e centrifugar por 01 minuto a 16000 x g;
2. Adicionar 120  $\mu$ L do RNA Binding Buffer (RB) a amostra, homogeneizar e transferir todo o conteúdo para a coluna de purificação;
3. Centrifugar por 02 minutos a 100 x g e imediatamente após por 01 minuto a 10000 x g;
4. Acrescentar 200  $\mu$ L do RNA Wash Buffer (RW) a coluna de purificação e centrifugar por 01 minutos a 10000 x g
5. Adicionar 200  $\mu$ L do RNA Wash Buffer (RW) a coluna de purificação e centrifugar por 03 minutos a 16000 x g;
6. Descartar o tubo coletor da coluna e acondiciona-la em um micro tubo, RNA free, de 1,5 mL.
7. Adicionar 30  $\mu$ L do RNA Elution Buffer (RE) ao centro da coluna de purificação, sem tocá-la, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente;
8. Centrifugar por 01 minuto a 1000 x g e depois por 01 minuto a 16000 x g. Descartar a coluna de purificação e guardar a solução de cDNA.

## Normas para publicação no periódico *Theriogenology*

### Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

### Aims and Scope

*Theriogenology* is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

## **Types of Articles**

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

## **Page charges**

This journal has no page charges.

## **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

## **Human and animal rights**

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

## **Conflict of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are

not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

## **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

## **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more

information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2,500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

**Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

**Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

**Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

**Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Article structure**

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses

(where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

## **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the

references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### **Image manipulation**

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance

are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

## **Electronic artwork**

### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Text graphics**

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase

letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

## **References**

### **Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### **Reference style**

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

**Examples:**

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

### **Journal Abbreviation Source**

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot

be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Additional Style Notes**

#### **Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions**

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

#### **Use the following expressions**

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant

- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

### **Standard definitions**

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

### **Abbreviations**

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends,

without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

|               |       |                |       |      |
|---------------|-------|----------------|-------|------|
| AI            | ANOVA | ADP            | ATP   | BSA  |
| cAMP          | CL    | DEAE-cellulose | DMSO  | DNA  |
| eCG           | EDTA  | EGF            | ELISA | FSH  |
| GH            | GnRH  | hCG            | HEPE  | ShMG |
| IVC           | IVF   | IVM            | LH    | MOET |
| MSH           | mRNA  | NAD            | NADH  | PBS  |
| PGF2 $\alpha$ | PGFM  | PIPES          | PRID  | PRL  |
| RIA           | RNA   | SDS-PAGE       | SCNT  | TRH  |
| TRIS          | tRNA  | TSH            |       |      |

### Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g – gram

ga - gauge of hypodermic needle

h – hour

kg – kilogram

L – liter

mL – milliliter

$\mu$ L – microliter

m – meter

min – minute

mo – month

s – second

v:v - volume ratio

wk – week

wt/vol - weight per volume

y - year

### Routes of treatment

id – intradermal

m - intramuscular

iu – intrauterine

iv – intravenous

sc – subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P – probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r<sup>2</sup> - coefficient of regression

### **Additional information**

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the *CBE Manual* or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document,

particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

## **Normas para publicação no periódico *Reproduction in Domestic Animals***

### **1. General**

*Reproduction in Domestic Animals* is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. Reproduction in Domestic Animals is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that Reproduction in Domestic Animals only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the

authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at [www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

English Language Editing Service: Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

## 2. Manuscript submission

The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include all authors with their affiliation and valid email addresses.

Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.

### 2.1. Licence to publish

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license

agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 2.2. Authorship and Acknowledgements

**Authorship:** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

*Reproduction in Domestic Animals* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.

**Acknowledgements:** Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors must acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

**Conflict of interest:** A subheading "Conflict of interest statement" must be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

**Funding sources:** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

**Use of non-commercially available instrumentation, substances, antibodies or assays:** When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

### 3. Manuscript Requirements

#### 3.1. *Format*

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and

with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word),.doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you

convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

### 3.2. *Length*

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

### 3.3. *Units, abbreviations and nomenclature*

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®. When non-commercially available substances or reagents are used, the following text must be provided: “[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]”

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on

the Nomenclature of Viruses.

### 3.4. Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the [Colour Work Agreement Form](#). Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI)

John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor at [rda@wiley.com](mailto:rda@wiley.com).

Tables should be created using the table function.

### 3.5. *References*

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr 102, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A 35, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

### 3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

### 4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them electronically to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as e-annotated proofs. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

*Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.*

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

### 5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price.

### Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

## 6. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

Wiley Blackwell's Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

*Reproduction in Domestic Animals* is covered by Wiley Online Library's Early View online service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Last update: May 2013