



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

**CULTIVO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*:  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**GRAZIELI MARINHEIRO MACHADO**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**

**ABRIL DE 2012**



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

**CULTIVO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*:  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**ALUNO (A): Grazieli Marinheiro Machado**

**ORIENTADOR (A): Carolina Madeira Lucci**

**CO-ORIENTADOR (A): Margot Alves Nunes Dode**

**TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO:66D/2012**

**BRASÍLIA/DF  
ABRIL DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MACHADO, G.M. **Cultivo pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*: aspectos morfológicos e moleculares.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012,145 p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

MACHADO, Grazieli, Marinheiro. **Cultivo pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*: aspectos morfológicos e moleculares.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 145p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Expressão gênica. 2. Sistema PHD. 3. Transferência múltipla.
4. Túneis de agarose. I. Lucci, C.M. II. Doutora.

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

**CULTIVO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*:  
ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

**GRAZIELI MARINHEIRO MACHADO**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutorado (UnB) (ORIENTADORA) CPF:  
490.390.241-20, e-mail: cmlucci@unb.br**

---

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Doutorado (Embrapa/Recursos Genéticos e  
Biotecnologia) (EXAMINADOR INTENRO) CPF: 517.692.476-53, e-mail:  
mfranco@cenargen.embrapa.br**

---

**ALINE PIC-TAYLOR, Doutorado, (UnB) (EXAMINADOR EXTERNO) CPF:  
165.117.658-22, e-mail: alinepic@unb.br**

---

**ROSÂNGELA VIEIRA DE ANDRADE Doutorado, (UCB) (EXAMINADOR  
EXTERNO) CPF: 927.143.666-00, e-mail: rosangelavand@gmail.com**

---

**ROBERTO SARTORI FILHO, Doutorado, (Esalq-USP) (EXAMINADOR EXTERNO)  
CPF: 135.202.598-18. e-mail: robertosartori@usp.br**

**BRASÍLIA/DF, 09 de ABRIL de 2012**

Dedico este trabalho aos meus Pais, Reginaldo Alves Machado e Maria Aparecida Marinheiro Machado, aos meus irmãos Rodrigo Marinheiro Machado e Luciana Marinheiro Machado; e ao meu companheiro Augusto Moscardini e ao meu filho Lucca Machado Moscardini que sempre acreditaram e me apoiaram em mais uma etapa conquistada.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, **Lucca Machado Moscardini**, pela compreensão dos muitos momentos de ausência.

Aos meus pais, **Reginaldo Alves Machado e Maria Aparecida Marinheiro Machado**, e irmãos, **Rodrigo Marinheiro Machado e Luciana Marinheiro Machado**, que sempre me incentivaram a busca das minhas metas.

Ao meu companheiro, **Augusto Moscardini**, pelo incentivo. Obrigado por me ensinar que nunca devemos desistir dos sonhos.

À minha co-orientadora, **Dra. Margot Alves Nunes Dode**, uma grande pesquisadora, pela amizade, disposição de ajudar, pelos grandes ensinamentos e o sempre apoio durante a realização do projeto.

À minha orientadora, **Carolina Madeira Lucci**, uma excelente profissional, pela amizade, pelos conselhos e pelos os grandes ensinamentos, que me motivaram a fazer pesquisa, foi minha primeira orientadora.

Aos pesquisadores, **Dr. Eduardo Melo, Dr. Maurício Machaim Franco, Dr. Roberto Sartori Filho e Dr. Rodolfo Rumpf** pela contribuição no aperfeiçoamento dos ensinamentos.

Aos graduandos e pós-graduandos pela disposição a ajudar e colaborar nos experimentos.

Aos amigos e à excelente equipe de trabalho que participaram efetivamente do trabalho, sem eles com certeza esses experimentos não se realizariam: **Ester Caixeta, Allice Ferreira, Monique Guardieiro, Michele Bastos, José Carvalho, Tiago Diesel, Ivo Pivato, Andrei Fidelis, José Felipe Spricigo**.

Aos **funcionários e estagiários** da Fazenda Sucupira e do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sem os quais não seria possível o dia a dia.

Ao apoio financeiro da **Embrapa/Cenargen, CAPES e Cnpq**.

## ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIACÕES	xxi
LISTA DE SÍMBOLOS	
CAPÍTULO 1	01
1. INTRODUÇÃO	02
2. OBJETIVOS	04
3. HIPÓTESE	05
4. JUSTIFICATIVA	06
5. REVISÃO DE LITERATURA	07
5.1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRÉ-ECLOSÃO (DIA 0 – DIA 8) <i>IN VIVO</i>	07
5.2. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PÓS-ECLOSÃO (DIA 9 – DIA 21) <i>IN VIVO</i>	09
5.3. RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO E IMPLANTAÇÃO	11
5.4. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	13
5.5. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES PÓS-ECLOSÃO (DIA 9 – DIA 15)	16
5.6. DIFERENÇA ENTRE EMBRIÕES PRODUZIDO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	18
5.7. EXPRESSÃO DE GENES EM EMBRIÕES	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> : EFEITA DA PREPARAÇÃO DO TÚNEL E SEXO	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> (PIV) DE EMBRIÕES	44
2.1.1. RECUPERAÇÃO DOS OVÓCITOS	44
2.1.2. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV) DE OVÓCTIOS	45
2.1.3. FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	45
2.1.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV) DE EMBRIÕES	45
2.2. SISTEMA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO (PHD) <i>IN VITRO</i>	46
2.3. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO DOS EMBRIÕES PÓS-ECLOSÃO	49
2.4. EXTRAÇÃO DE DNA E RNA	49

2.5. DETERMINAÇÃO DO SEXO	50
2.6. EXPRESSÃO GÊNICA	51
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3. RESULTADOS	54
4. DISCUSSÃO	60
5. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	65
CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> ATÉ O DIA 14: MORFOLOGIA, SEXO E EXPRESSÃO GÊNICA	70
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	75
2.2. PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> DE EMBRIÕES	76
2.3. SISTEMA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO (PHD) <i>IN VITRO</i>	77
2.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES PÓS-ECLOSÃO	78
2.5. DETERMINAÇÃO DO SEXO	78
2.6. EXTRAÇÃO DE DNA, RNA E SÍNTESE DE cDNA	79
2.7. PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	79
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
2.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	82
3. RESULTADOS	84
4. DISCUSSÃO	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> EM DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO	100
RESUMO	101
ABSTRACT	102
1. INTRODUÇÃO	104
2. MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	107
2.2. PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> DE EMBRIÕES	108
2.3. COLETA DE EMBRIÕES D14 DAS RECEPTORAS	109
2.4. SISTEMA DE DESENVOLVIMENTO PÓS-ECLOSÃO (PHD) <i>IN VITRO</i>	110
2.5. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA: MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA	111
2.6. DETERMINAÇÃO DO SEXO	111
2.7. EXTRAÇÃO DE DNA, RNA E SÍNTESE DE cDNA	112
2.8. PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	113



2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	115
2.10. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	115
3. RESULTADOS	117
4. DISCUSSÃO	128
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
CONCLUSÃO FINAL	143
CONSIDERAÇÕES FINAIS	144

## RESUMO

### **CULTIVO PÓS-ECLOSÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*: ASPECTOS MORFOLÓGICOS E MOLECULARES**

Grazieli Marinheiro Machado<sup>1</sup>, Carolina Madeira Lucci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Médica Veterinária, Mestre, Brasília-DF, Brasil,. <sup>2</sup>Médica Veterinária, Doutora, Brasília-DF, Brasil.

A avaliação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) no estágio pós-eclosão é uma importante ferramenta para verificar a qualidade de embriões PIV. É justamente nessa fase, em que ocorre a maior perda embrionária. Para avaliar os embriões nesse estágio, esse trabalho propõe a utilização do sistema de cultivo pós-eclosão (PHD). Esse sistema é um método alternativo que pode auxiliar na avaliação do potencial de desenvolvimento dos embriões sem a necessidade de transferi-los para receptoras. Mas, para utilizar esse sistema na rotina é necessário verificar sua eficiência. Portanto, esse trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade do sistema PHD através de avaliações morfológicas e moleculares de embriões produzidos nesse sistema. Esse trabalho foi composto de três estudos. O primeiro visou validar o sistema PHD no laboratório e verificar o melhor protocolo para realizar esse sistema. Para isso, túneis de agarose foram construídos com água Milli-Q ou com solução fosfato salina (PBS) foram utilizados para o desenvolvimento dos embriões PIV. O segundo trabalho, após a escolha do melhor protocolo, objetivou avaliar o comportamento de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* de D7 cultivados no sistema PHD até D14. E finalmente, o último trabalho, verificou a eficiência do sistema PHD para o cultivo de embriões PIV até D14 comparado à transferência múltipla para o útero de receptoras. Durante o período de cultivo, os embriões foram mensurados e avaliados quanto à qualidade morfológica do trofoblasto e botão embrionário. Além disso, o perfil molecular foi avaliado pela

quantificação da expressão de genes relacionado com qualidade do embrião, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *G6PD*, *PGK-1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *CD9*, *HSF-1*, *MNSOD*, *HSP70*, *IFNT*, nos embriões de D7 e D14. Quanto ao primeiro trabalho observou-se que o melhor protocolo para o sistema PHD foi quando se utilizou a água Milli-Q para a construção dos túneis, pois nesse os embriões tiveram um maior crescimento durante o cultivo. No segundo, trabalho verificou-se que apesar da baixa taxa de crescimento os embriões *in vivo* tiveram desenvolvimento semelhante no sistema PHD do que os *in vitro*. E quando se comparou os embriões totalmente *in vitro* com os totalmente *in vivo*, verificou-se que os *in vitro* eram menores, mas a maioria da expressão dos genes foi semelhante entre os grupos (*SLC2A3*, *PGK-1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *CD9*, *HSF-1*, *MNSO*, *IFNT*). E, no último trabalho, o principal resultado foi que os embriões *in vitro* cultivados até D14 no útero de receptoras foram semelhantes ao grupo controle (totalmente *in vivo*), mas esses dois tipos de embriões foram diferentes dos cultivados no sistema PHD, principalmente, em relação à porcentagem de embriões crescidos/recuperados, ao tamanho e a expressão gênica. Porém, verificou-se a possibilidade de embriões PIV se desenvolverem nos túneis de agarose. Concluiu-se que o sistema PHD ainda não está apto para se utilizado na rotina, principalmente, devido à baixa porcentagem de embriões que se desenvolvem. Portanto, investimentos em métodos para que ele se torne menos seletivo e dê condições para o desenvolvimento de embriões de boa qualidade que se desenvolveria normalmente em ambiente uterino seriam de grande valia.

**Palavras-chaves:** expressão gênica, sistema PHD, transferência múltipla, gel de agarose

**POST-HATCHING CULTURE OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS:  
MORPHOLOGIC AND MOLECULAR ASPECTS**

**ABSTRACT**

The evaluation of *in vitro*-produced embryos (IVP) in the post hatching stage is an important tool to verify the quality of IVP embryos, as is in this phase that most embryonic loss occurs. In the order to evaluate the embryos at this developmental stage, the present study proposes the use of the post-hatching development (PHD) system. This system is an alternative method which may help to evaluate the developmental potential of embryos without transferring them to a recipient's uterus. However, to use this system routinely in the laboratory, it is necessary to verify its efficiency. Therefore, this study aimed to evaluate the viability of the PHD system using morphological and molecular evaluations of embryos produced in this system. This study was conducted in three different studies. The first was designed to validate the PHD system in the laboratory and to determine the best testing protocol. Agarose tunnels were subsequently constructed either with Milli-Q water or with phosphate buffer saline (PBS) and IVP embryo development was evaluated. Secondly, after selecting the best protocol, we aimed to evaluate the behavior of *in vivo* and *in vitro* embryos in the PHD system from Day (D)7 through D14. Finally, in the third study, we verified the efficiency of the PHD system and multiple transfer protocol for culture IVP embryos until D14. During the culture period, embryos were measured and evaluated for morphological quality of the embryonic trophoblast and embryonic disc. The molecular profile was determined by quantification of the expression of genes related to embryo quality, such as *SLC2A1*, *SLC2A3*, *G6PD*, *PGK-1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *CD9*, *HSF-1*, *MNSOD*, *HSP70*, *IFNT*, in D7 and D14 embryos, using qPCR. In the first study, we concluded that the best protocol was when agarose tunnels were constructed with Milli-Q water, as embryos demonstrated a greater increase in size. In the second study, we found *in vivo* embryos presented a lower development rate in the PHD system, when compared morphologically to the *in vitro* embryos. On comparison of the completely *in vitro* embryos with completely *in vivo* embryos, it was found that *in vitro* embryos were smaller than the *in vivo* embryos, but most of the genes had similar expression between the groups (*SLC2A3*, *PGK-1*, *KRT8*, *PLAC 8*,

*CD9, HSF-1, MNSOD, IFNT*). In the last study, we concluded that IVP embryos cultured until D14 in a recipients uterus were similar to control group (completely *in vivo*), and both were different from embryos cultured in the PHD system. Although the PHD system is inefficient we demonstrated that it can be used to develop IVP embryos. It was concluded that the PHD system is not yet able to be routinely used, especially due to the low percentage of embryos that develop in it. Therefore, an investment into this method, it can become less selective and provide conditions for the develop of good quality embryos that would normally development in uterine conditions, would be of great value.

**Keywords:** agarose tunnels, gene expression, multiple transfers, PHD system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
<p><b>Figura 2.1</b> Etapas de construção dos túneis com gel de agarose <i>low-melting-point</i> para o cultivo de embriões <i>in vitro</i> até dia 14 de desenvolvimento. A – Disposição dos pentes construídos com capilares de vidro em placas de petri 60x15mm e introdução da agarose diluída. B – Polimerização da agarose formando o gel. C – Retirada dos pentes para formação dos túneis. D – Corte no meio do gel para formar a entrada dos túneis onde serão inseridos os embriões D11. E – Duas partes do conjunto de túneis após a retirada da região do meio. F – Cada parte com 8 túneis separadas por placa e imersa em meio SOF PHD.</p>	47
<p><b>Figura 2.2</b> Manipulação dos embriões para serem introduzidos nos túneis e embriões cultivados do sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) até D15. A – Mensuração e avaliação dos embriões do D9. B – Introdução de embriões D11 para o interior dos túneis com a ponta de uma pipeta Pasteur arredondada. C – Disposição dos embriões D11 nos túneis de gel de agarose. D – Alongamento dos embriões no D15 no sistema PHD.</p>	48
<p><b>Figura 2.3</b> A amplificação dos produtos do PCR em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando teve aplicação dos dois <i>primers</i> o embrião foi considerado macho (seta), enquanto a detecção de um <i>primer</i> foi um embrião fêmea.</p>	51
<p><b>Figura 2.4</b> Fórmula de Pfaffl (2001) modificada para correção da eficiência de amplificação dos genes.</p>	53
<p><b>Figura 2.5</b> Porcentagem de embriões alongados, regredidos e degenerados durante o sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) que foram observados entre o D11 e D15 de desenvolvimento.</p>	55
<p><b>Figura 2.6</b> Abundância relativa de RNAm dos genes (<i>G6PD</i>, <i>SLCS2A1</i>, <i>PLAC8</i>, <i>SLC2A3</i>, <i>IFNT</i>, <i>HSF1</i>, <i>KRT8</i>, <i>PGK1</i>) determinados pela método de qPCR de embriões bovinos cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose diluído em água Milli Q (AMQ) e solução de fosfato salina (PBS) no dia 15 de desenvolvimento em que foram formados 7 pools com 3 em cada. Os dados são referentes à média <math>\pm</math> EP que foram normalizados com a média dos genes <i>PPIA</i>, <i>GAPDH</i> e <i>H2A</i>, com resultados expressos em relação à amostra controle</p>	58

utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001).

- Figura 2.7** Abundância relativa de RNAm dos genes (*G6PD*, *SLCS2A1*, *PLAC8*, *SLC2A3*, *IFNT*, *HSF1*, *KRT8*, *PGK1*) determinados pela método de qPCR de embriões bovinos machos e fêmeas no dia 15 de desenvolvimento cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose em que foram formados 4 pools com 3 embriões machos e 3 pools com 3 embriões fêmeas. Os dados são referentes à média  $\pm$  EP que foram normalizados com a média dos genes *PPIA*, *GAPDH* e *H2A*, com resultados expressos em relação à amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001). 59
- Figura 3.1** A- embriões bovinos D14 produzidos totalmente *in vitro* no gel de agarose do sistema de cultivo *in vitro* pós-eclosão sem colabamento. B – embriões bovinos D14 produzidos totalmente *in vivo* colabados após a coleta do útero das doadoras. Embriões com ampla variação de tamanho. 86
- Figura 3.2** Abundância relativa de RNAm dos genes (*PGK1*, *HSP70*, *HSF1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *SLC2A3*, *CD 9*, *SLC2A1*, *IFNT*, *MnSOD*) determinados pelo método de qPCR em embriões bovinos produzidos totalmente *in vivo*, obtidos das coletas de doadoras e totalmente *in vitro* cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose diluído em água Milli-Q no D14 de desenvolvimento. Para a determinação da expressão dos genes foram formados quatro pools com três embriões D14 de cada grupo. Os dados são referentes à média  $\pm$  EP que foram normalizados com o gene constitutivo *PPIA*, com resultados expressos em relação à amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001). 88
- Figura 4.1.** Distribuição do estágio de desenvolvimento embrionário no dia da coleta de embriões *in vivo* da doadora após o protocolo de superestimulação no dia 7,5 de desenvolvimento e (*in vivo* D7,5) e de embriões produzidos *in vitro* que estavam no dia 7 de desenvolvimento (*in vitro* D7). Bi – blastocisto inicial, Bl – blastocisto, Bx – blastocisto expandido.\* Diferença estatística entre os grupo,  $P < 0,05$ . 118
- Figura 4.2** Fotografia representativa do disco embrionário de bovinos avaliados em estereomicroscópio: (A) Na seta observa-se o possível disco embrionário que se assemelha a um aglomerado de células, que foi considerado com disco embrionário íntegro de embrião D14 produzido *in vitro* até D7 e no sistema de cultivo *post-hatching development* – PHD até D14; (B) Seta indica disco embrionário íntegro de embrião D7 *in vivo* cultivados no útero de receptoras até D14; (C) Seta indica disco embrionário íntegro de embrião D7 120

produzido *in vitro* até D7 e cultivados no útero de receptoras até D14.

- Figura 4.3** Embrião bovino do dia 14 de desenvolvimento (D14). Fotomicrografia em microscopia de luz de embrião D14 coletado do útero de receptoras oriundos de embriões D7 produzido *in vivo* (A) e produzidos *in vitro* (B). Epiblasto (E), trofoblasto (T) e hipoblasto (H). Fotomicrografia em microscopia eletrônica de transmissão do embrião D14 coletado do útero de receptoras oriundos de embriões D7 produzido *in vivo* (C,E), e produzidos *in vitro* (D, F). Regiões entre o trofoblasto e hipoblasto. M = mitocôndrias, L=vesículas de lípidios, Nu = nucléolo, asterisco = lâmina basal, seta = projeções do hipoblasto para o trofoblasto. 122
- Figura 4.4** Abundância relativa de RNAm dos genes *SLC2A1*, *SLC2A3*, *MnSOD*, *HSP70*, *IFNT*, *PLAC8*, *CD9* e *KRT8* que foram determinados por qPCR em embriões D7 bovinos produzidos *in vivo* (vivo) e *in vitro* (vitro). A análise da expressão gênica foi realizada com pools constituídos de 18 embriões. Os dados foram normalizados com a fórmula  $\Delta\Delta CT$  (Pfaffl,2001). utilizando gene constitutivo *PPIA* e controle endógeno. 124
- Figura 4.5.** Abundância relativa de RNAm dos genes *SLC2A1*, *SLC2A3*, *MnSOD*, *HSP70*, *IFNT*, *PLAC8*, *CD9* e *KRT8* que foram determinados por qPCR em embriões D14 bovinos. Grupos: “vivo vivo” – embriões do dia 14 de desenvolvimento produzidos até o dia 7 de desenvolvimento no útero de doadoras e transferidos para receptoras sincronizadas e recuperados no dia 14 de desenvolvimento; “vitro vivo” – embriões do dia 14 de desenvolvimento produzidos *in vitro* até o dia 7 de desenvolvimento e transferidos para receptoras sincronizadas e recuperados no dia 14 de desenvolvimento, “vitro vitro” embriões do dia 14 de desenvolvimento produzidos *in vitro* até o dia 7 de desenvolvimento e transferidos para o sistema de cultivo *in vitro* pós-eclosão e recuperados no dia 14 de desenvolvimento. A análise da expressão gênica foi realizada com 4 pools constituídos 3 embriões para cada grupo. Os dados foram normalizados com a fórmula  $\Delta\Delta CT$  (Pfaffl,2001) utilizando gene constitutivo *PPIA* e controle endógeno. 126



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 2.1</b> Sequências de <i>primers</i> utilizados para determinação do sexo em embriões (F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i> ) e tamanhos em pares de base (pb), dos fragmentos amplificados.	50
<b>Tabela 2.2</b> Informação dos <i>primers</i> específicos utilizados para amplificação de fragmentos de genes no PCR tempo real (qPCR).	52
<b>Tabela 2.3</b> Média do tamanho (mm) dos embriões bovinos alongados (média $\pm$ EP) nos dia (D) 11, D12,5, D14 e D15 de cultivo no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli-Q (AMQ) e solução fosfato salina (PBS).	55
<b>Tabela 2.4</b> Média do tamanho (mm) dos embriões bovinos alongados (média $\pm$ EP) nos dia (D) 11, D12,5, D14 e D15 de cultivo no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli- Q (AMQ) e solução fosfato salina (PBS).	56
<b>Tabela 2.5</b> Média do tamanho (mm) dos embriões machos e fêmeas (média $\pm$ EP) cultivados no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli-Q (AMQ) e solução de fosfatos salina (PBS) nos dias (D) 11, D12.5, D14 e D15 de cultivo.	57
<b>Tabela 3.1</b> Informações específicas dos fragmentos utilizados para amplificação dos genes na análise de PCR tempo real (qPCR).	81
<b>Tabela 3.2</b> Porcentagem de embriões D7 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> que se desenvolveram nos sistema de cultivo pós-eclosão até o D14 de desenvolvimento.	84
<b>Tabela 3.3</b> Média de tamanhos (mm) de embriões <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> até D14 de desenvolvimento no sistema PHD.	85
<b>Tabela 3.4</b> Média do tamanho (mm) de embriões macho/fêmeas de D14 de desenvolvimento totalmente <i>in vivo</i> coletados de doadoras e totalmente <i>in vitro</i> produzidos no sistema PHD.	86
<b>Tabela 4.1</b> As sequências, as concentrações dos <i>primers</i> , e os números de acessos do <i>GenBank</i> , tamanho dos amplicons e as temperatura	114

de anelamento de cada gene utilizado para expressão gênica no PCR tempo real (qPCR).

<b>Tabela 4.2</b> Média do tamanho do trofoblasto, porcentagem de embriões D14 com disco embrionário (DE) e diâmetro do DE nos três tipos de embriões D14: embriões <i>in vivo</i> D7 no útero de receptoras, embriões <i>in vitro</i> D7 no útero de receptoras e <i>in vitro</i> D7 no sistema PHD.	119
---	-----

**LISTA DE ABREVIACOES**

AMQ	Água Milli-Q
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bx	Blastocisto expandido
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
COC	Complexos <i>cumulus</i> ovócito
DE	Disco embrionário
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
HECM	<i>hamster embryo culture médium</i>
IA	inseminação artificial
i.m	intra-muscular
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
PBS	Solução fosfato salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHD	Desenvolvimento pós-eclosão
PGE	prostagladina E
PGF	prostagladina F
PHE	penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PPP	via das pentoses
PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinilpirrolidona
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> em tempo real
RA	Reação acróssomica
RNA	Ácido ribonucléico

RT	Transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
SOF	<i>synthetic oviductal fluid</i>
SRY	gene Y específico
TCM	<i>Tissue culture medium</i>
VG	Vesícula germinativa
ZP2	glicoproteína da zona pelúcida 2 de ovócito
ZP3	glicoproteína da zona pelúcida 2 de ovócito

**LISTA DE SÍMBOLOS**

<i>ALOX15</i>	<i>arachidonate 15-lipoxygenase</i>
<i>AKR1B1</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member B1</i>
<i>BMP15</i>	<i>bone morphogenetic protein 15</i>
<i>CD9</i>	<i>tetraspanin</i>
<i>CDX2</i>	<i>caudal type homeobox 2</i>
<i>COX-2</i>	<i>cyclooxygenase-2</i>
<i>EEF1A2</i>	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2</i>
<i>EGF</i>	<i>epidermal growth factor</i>
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>G6PD</i>	<i>glucose 6 phosphate dehydrogenase</i>
<i>H2A</i>	<i>histone 2 A</i>
<i>HSF1</i>	<i>heat shock transcription factors 1</i>
<i>HSPs</i>	<i>heat shock proteins</i>
<i>HSP70</i>	<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>
<i>IFNT</i>	<i>interferon-tau</i>
<i>NADPH</i>	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
<i>IGF</i>	<i>insulin-like growth factor</i>
<i>KRT8</i>	<i>keratin proteins 8</i>
<i>IL-4</i>	<i>interleucina 4</i>
<i>MnSOD</i>	<i>manganese superoxide dismutase</i>
<i>MSX1</i>	<i>homeobox, msh-like 1</i>
<i>OCLN</i>	<i>occludin</i>
<i>PLAC 8</i>	<i>placenta-specific 8</i>
<i>PGK1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
<i>PPIA</i>	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
<i>PTTG1</i>	<i>pituitary tumor-transforming 1</i>
<i>SLC2A1</i>	<i>solute carrier family 2 member 1</i>
<i>SLC2A3</i>	<i>solute carrier family 2 member 3</i>

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões de mamíferos domésticos é uma biotécnica utilizada como alternativa para acelerar a multiplicação de animais geneticamente superiores. Com a PIV, é possível obter um bezerro por semana, enquanto que com a monta natural ou inseminação artificial, uma vaca produziria, somente, um bezerro/ano. Essa técnica além de estar sendo incorporada nos programas de melhoramento animal, tem causado um grande impacto na pecuária brasileira, que atualmente possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, ultrapassando 200 milhões de cabeça (IBGE, 2005). Esse efeito pode ser observado pela posição de destaque que o país ocupa hoje quanto a utilização dessa biotécnica, sendo responsável por 86,6% dos embriões PIV produzidos no mundo (Viana, 2009).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto e continua em torno de 40% (Lonergan & Fair, 2008; Pontes et al., 2009). Portanto, nos protocolos atuais da PIV, as porcentagens e, principalmente, a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* ainda são inferiores aos obtidos *in vivo* (Hansen et al., 2010). Além disso, ainda é comum observar que 70 a 80% da perda embrionária de embriões PIV ocorrem nos primeiros 14 dias de gestação (Dunne et al., 2000; Diskin et al., 2006).

Estudos têm mostrado que o cultivo *in vitro* de embrião pode alterar o padrão de expressão de genes que estão envolvidos na formação de junções tipo *gap* das células, na apoptose celular, no estresse oxidativo e no processo de diferenciação celular influenciando o desenvolvimento embrionário (Lonergan et al., 2003a). Vários pesquisadores têm trabalhado na identificação dos genes que são diferentemente expressos em embriões *in vivo* e *in vitro*,

tentando relacioná-los a qualidade embrionária necessária para se obter nascimentos (El-Sayed et al., 2006). Com o conhecimento mais detalhado dos eventos envolvidos durante o desenvolvimento embrionário, principalmente, após a eclosão, propostas de alterações no sistema de cultivo seriam mais viáveis, melhorando a taxa de produção e qualidade dos blastocistos.

Atualmente, muitas pesquisas relacionadas com estudos de cultivo *in vitro* de embrião adotam como critério para validação de protocolos o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Hoje, sabe-se que muitas das alterações observadas nos blastocistos aparecem após esse estágio de desenvolvimento (Clemente et al., 2011). Portanto, como alternativa de avaliação de embriões pós-eclosão sem a necessidade da transferência de embrião para receptoras, o cultivo *in vitro* de embriões pós-eclosão (PHD) pode se tornar uma ferramenta eficaz para avaliação do potencial de desenvolvimento nessa fase (Vejlsted et al. 2006). Ou seja, com essa técnica seria possível avaliar a qualidade de embriões, oriundos de diferentes protocolos não só da PIV, mas de outras técnicas de reprodução assistida, por acompanhar o desenvolvimento por um período mais prolongado. Além disso, o cultivo pós-eclosão de embriões pode contribuir na busca de conhecimentos para as ciências biológicas básicas, investigação da embriotoxicidade de produtos farmacêuticos e pesticidas. Outra aplicação com potencial dessa metodologia é nos estudos relacionados com células troncos. Através da coleta do botão embrionário de embriões pós-eclosão, é possível obter uma gama de células pluri- e totipotentes.

Sendo assim, este trabalho teve o objetivo de estabelecer e caracterizar o desenvolvimento de embriões pós-eclosão produzidos *in vivo* e *in vitro*, visando o uso do sistema PHD como ferramenta para avaliar a qualidade embrionária.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento, características moleculares e morfológicas de embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos ao cultivo pós-eclosão até o dia (D) 14 de desenvolvimento.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Estabelecer a técnica de cultivo PHD em embriões produzidos *in vitro*;
2. Comparar o desenvolvimento pós-eclosão de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* até o dia 14 de desenvolvimento no sistema PHD;
3. Avaliar a expressão dos genes *SLC2A1*, *SLC2A3*, *G6PD*, *PGK-1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *CD9*, *HSF-1*, *MNSOD*, *HSP70*, *IFNT* nos embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* após o cultivo pós-eclosão (D14) no sistema PHD
4. Avaliar características morfológicas e o perfil molecular de embriões D7 e D14 pós-eclosão, cultivados em dois sistemas: sistema PHD e útero de receptoras, por transferência múltipla;

### **3. HIPÓTESE**

O sistema de cultivo pós-eclosão *in vitro* de embriões bovinos pode ser utilizado como ferramenta para avaliar a qualidade de embriões PIV.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Apesar de inúmeras tentativas na pesquisa para melhorar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*, entre elas estudos relacionados com epigenéticas e micro RNAs, e modificações de protocolos, ainda não existem um sistema de PIV que produza embriões *in vitro* com características mais próximas dos *in vivo*. A diferença entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* pode ser constatada por alterações morfológicas e moleculares. Os embriões produzidos *in vitro* possuem uma compactação incompleta no estágio de mórula, uma aparência escura, poucas organelas citoplasmáticas, mitocôndrias mais ovóides com cristas pouco definidas, junções celulares pouco visíveis. Além disso, apresentam um grande acúmulo intracelular de lipídios e presença de vacúolos. Em relação ao perfil da expressão gênica, diversos trabalhos relatam diferenças entre embriões *in vivo* e *in vitro*. Inúmeros estudos utilizam como critério de avaliação a qualidade e taxa de embriões em no dia 7 de desenvolvimento, porém é uma avaliação pouco informativa, já que grandes perdas embrionárias ocorram após sua eclosão. Deste modo, o sistema de cultivo pós-eclosão *in vitro* de embriões PIV torna-se uma ferramenta para avaliar a qualidade desses embriões, em um período mais crítico do seu desenvolvimento, sem a necessidade de transferi-los para vacas receptoras.

O cultivo embrionário *in vitro* pós-eclosão poderia ser utilizado para avaliação do embrião de forma mais acurada e menos onerosa da qualidade não só de embriões PIV submetidos a diferentes tratamentos e manipulações, mas também de embriões produzidos por outras biotécnicas. Além disso, pode contribuir na busca de conhecimentos da biologia nesse período em que ocorrem as maiores perdas embrionárias. Esses conhecimentos poderão ser essenciais para modificação dos protocolos das diversas biotécnicas visando atender as exigências dos embriões, melhorando sua qualidade.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. Desenvolvimento embrionário pré-eclosão (Dia 0 – Dia 8) *in vivo*

O desenvolvimento embrionário inicia após a fecundação, que envolve a fusão de um ovócito maturo e um espermatozóide capacitado. A maturação do ovócito *in vivo* ocorre no interior do folículo durante o processo de foliculogênese e ovogenese. Após a puberdade a fêmea bovina passa a ter um ciclo estral periódico com intervalo médio de 21 dias e caracteriza-se pela formação de duas a cinco ondas foliculares em que, geralmente, um folículo torna-se dominante e chega à ovulação (Swenson & Reece, 1996; Wiltbank et al., 2002; Mollo et al., 2007). Na ovulação, evento que acontece, aproximadamente, 28 horas (24 a 30 h) após o início do estro, a parede folicular se rompe e expulsa o ovócito. Esse ovócito em metáfase II é liberado e capturado pelas fímbrias do tuba uterina e transportado até o local da fecundação (Hafez & Hafez, 2004).

Quanto ao gameta masculino, sabe-se que o sêmen pode ser depositado na porção cranial da vagina na monta natural ou após a entrada da cérvix, através da inseminação artificial. Os espermatozóides do ejaculado sofrem modificações funcionais e estruturais no útero para serem capazes de fecundar os ovócitos (Flesch & Gadelha, 2000).

O processo de fecundação do ovócito envolve uma seqüência complexa de eventos. Inicialmente, o espermatozóide precisa de motilidade para se aproximar do ovócito, além de sofrer o processo de capacitação. Somente espermatozóides capacitados se ligam aos receptores da zona pelúcida (ZP3) e desta forma se preparam para a penetração e fusão com a membrana plasmática do ovócito. Posteriormente, à ligação com a ZP3 os espermatozóides sofrem a reação acrôssomica (RA) e se ligam ao receptor ZP2 (Silva, 1998). A penetração do

espermatozóide no ovócito ocorre após ação de enzimas liberadas na RA que digerem a zona pelúcida auxiliada pela sua motilidade. A fusão do espermatozóide com a membrana do ovócito ocorre no espaço perivitelinico e desta forma o espermatozóide é incorporado ao ooplasma (Flesch & Gadella, 2000; Gonçalves et al, 2001). O ovócito ativado pelo espermatozóide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais e síntese protéica (Gonçalves et al., 2001).

Após a penetração espermática, a segunda divisão meiótica se completa e há liberação do segundo corpúsculo polar. Os cromossomos que permanecem são envolvidos por uma membrana nuclear, formando o pró-núcleo feminino. De forma concomitante, a membrana nuclear do espermatozóide se desintegra, a cromatina nuclear descondensa e ocorre a formação de nova membrana nuclear que envolve os cromossomos paternos, formando o pró-núcleo masculino. Os microfilamentos presentes no córtex do ovócito são responsáveis pela migração dos pró-núcleos para o centro do citoplasma do ovócito onde ocorre a singamia e formação de um núcleo diplóide que originará um novo indivíduo, o zigoto (Gonçalves et al., 2001).

Inicia-se, então, o primeiro passo para o desenvolvimento embrionário em que ocorre a divisão por clivagem do ovócito fecundado em várias células menores – blastômeros (Wolpert, 2000). A primeira clivagem (estágio de 2 células) é meridional e separa o zigoto em dois blastômeros iguais, ocorrendo por volta de 24-32 horas em bovinos (Gilbert, 2003; Dode et al., 2006). Na segunda clivagem (1 a 3 dias), um dos dois blastômeros se divide meridionalmente e outro equatorialmente. Este tipo de clivagem é denominado de clivagem rotacional (Hafez & Hafez, 2004; Gilbert, 2003; Ladim-Alvarenga, 2006). Sabe-se que os blastômeros não se dividem todos ao mesmo tempo. Durante as clivagens iniciais (8-16 células), o genoma é ativado, a qual resulta na degradação dos transcritos materno e o conceito inicia a produção de suas próprias proteínas necessárias para o seu desenvolvimento (Gilbert, 2003).

As células do embrião continuam suas divisões, aumentando o número de blastômeros, que ficam unidos por ligação tipo *gap*, onde as células sofrem uma compactação mais intensa (Ladim-Alvarenga, 2006). E então, com 64 células compactas forma-se a mórula

(5 a 6 dias). A mórula consiste em um pequeno grupo de células internas, que originam a massa celular interna (MCI), envolta por um grupo maior de células externas, que formarão a trofoectoderme (Wolpert, 2000) Esta irá formar estruturas extra-embriônicas como a placenta, enquanto o embrião propriamente dito desenvolve-se a partir de um pequeno grupo de células da massa celular interna (Wolpert, 2000). No estágio de mórula compacta há a formação de uma cavidade no embrião conhecida como blastocele, que está repleta de fluido, secretado pelo trofoectoderme (Wolpert, 2000). O aumento dessa cavidade se dá pelo aumento de fluido durante o desenvolvimento do embrião, tornando a zona pelúcida cada vez mais fina, formando o blastocisto expandido. Durante esse período, o papel da zona pelúcida é essencial para evitar a adesão do blastocisto na parede uterina. Por volta dos dias 7 – 8 de desenvolvimento, inicia-se o seu rompimento até a completa eclosão do embrião (Gilbert, 2003; Ladim-Alvarenga, 2006).

O trofoectoderma é constituído por células especializadas, que são achatadas e com numerosas vilosidades, formando a parede do blastocisto em contato com a zona pelúcida. Ele ocupa um terço do volume total do embrião. Em contraste, a massa celular interna é constituída por células esféricas, pequenas, que se dividem rapidamente e são pouco especializadas. A formação distinta do trofoblasto e da MCI é um processo crucial para o desenvolvimento embrionário, visto que darão origem a diferentes regiões do novo organismo ou a um tecido de sustentação (Ladim-Alvarenga, 2006; Gilbert, 2003).

## **5.2. Desenvolvimento embrionário pós-eclosão (Dia 9 – Dia 21) *in vivo***

A eclosão do embrião bovino *in vivo* ocorre entre os dias 9 -12 do desenvolvimento embrionário, em que o embrião ainda na forma esférica escapa da zona pelúcida, apresentando uma massa celular interna compactada. A eclosão se dá pela lise de uma porção da zona pelúcida formando um orifício através do qual o blastocisto se comprime, abandonando-a enquanto se expande. A MCI é delimitada por células cubóides que irão formar o hipoblasto, envolto pelo trofoblasto. Após a formação do hipoblasto, células remanescentes do botão embrionário irão formar o epiblasto, que possui uma organização basal bem definida onde na parte ventral, encontra-se uma camada de células organizadas de forma irregular e na parte dorsal, há uma organização mais regular onde as células estão unidas por *tight junction* (Vejlsted et al. 2006). A região do embrião onde o trofoblasto está

em íntimo contato com a superfície do epiblasto através das ligações de *tight junctions* e desmosomos é denominada de camada de *Rauber* (Maddox-Hyttel et al., 2003). Essa camada se degenera gradualmente expondo o epiblasto na superfície do blastocisto. Quando o epiblasto e hipoblasto subjacente ficam completamente expostos e na forma de um disco espesso bem delimitado em uma área do pólo embrionário denomina-se disco embrionário (Vejlsted et al. 2006). O disco embrionário, então, é composto por duas camadas: o epiblasto, células voltadas para a cavidade amniótica e o hipoblasto, as células direcionadas para a cavidade blastocística (Moore & Persaud, 1995).

Entre 12 e 14 dias do desenvolvimento embrionário, verifica-se o início do alongamento do blastocisto. O disco embrionário encontra-se em um dos pólos do embrião (Betteridge et al., 1980) e apresenta-se espeçado (Maddox-Hyttel et al., 2003). No 14º dia de desenvolvimento, ocorre no embrião bovino à formação de uma linha primitiva, uma linha central e espessa no sentido do pólo posterior para o pólo anterior do disco embrionário, que quando atinge este pólo forma-se o nó primitivo. Esta linha primitiva é resultante do “empilhamento” de células do epiblasto que proliferam e migram para o centro do disco embrionário. A partir dessa linha originam-se as células mesenquimais que formam o tecido conjuntivo frouxo embrionário denominado de mesênquima ou mesoblasto. O mesênquima espalha-se lateralmente e cefalicamente a partir da linha primitiva e uma parte se agrega para formar uma camada entre o epiblasto e hipoblasto, conhecida como mesoderma intra-embrionário. Algumas células da linha primitiva invadem o hipoblasto formando uma camada denominada de endoderma embrionário. As células que permanecem no epiblasto formam o ectoderma embrionário. A formação do mesoderma intra-embrionário converte o disco embrionário bilaminar (epiblasto e hipoblasto) em um disco trilaminar (ectoderma, mesoderma e endoderma). O ectoderma dá origem a epiderme e sistema nervoso. O endoderma forma o revestimento dos tratos digestivos e respiratórios. O mesoderma dá origem aos músculos, tecidos conjuntivos, ossos e vasos sanguíneos (Moore & Persaud, 1995; Maddox-Hyttel et al., 2003).

Logo após o dia 14 de desenvolvimento *in vivo* o embrião passa pela fase de aposição, em que o trofoblasto fica intimamente associado ao epitélio endometrial formando uma união ainda instável. O blastocisto na fase de aposição se assegura através de interdigitações citoplasmáticas de células do trofoectoderma com microvilos epiteliais

uterinos. Por volta do dia 16, o trofoblasto começa se aderir firmemente ao endométrio, portanto uma lavagem uterina provocaria danos estruturais durante a recuperação do embrião. Somente por volta do 21º dia de desenvolvimento embrionário formam-se as interdigitações entre o trofoectoderma e o o epitélio endometrial em que ocorrerá a formação de cotilédones. Nesse período, o trofoblasto constitui-se de células gigantes binucleadas cujas funções são secretar proteínas e hormônios esteróides que regulam a fisiologia materna, além de favorecer o crescimento dos placentomas (Spencer et al., 2004).

### **5.3. Reconhecimento materno da gestação e implantação**

O período de pré-implantação depende de uma série de interações materno-fetais, que levam ao reconhecimento, manutenção da gestação e desenvolvimento embrionário. Para isso, o embrião no início de desenvolvimento e o útero sintetizam uma grande quantidade de substâncias, entre as quais citocinas (interferons, interleucinas), enzimas (proteases), prostaglandinas (PGF, PGE), hormônios (hormônio liberador de corticotrofinas, estrógenos), fatores de crescimento, proteínas de transporte e outros fatores ainda não determinados (Robinson et al., 1999).

A principal substância responsável pelo o reconhecimento materno da gestação em bovinos é o interferon tau (*IFNT*) e foi descoberto pela purificação de proteínas extraídas de trofoblasto ovino. Ele possui uma série de isoformas que são secretadas pelo tecido trofoblástico dos embriões entre os dias 12 e 17 (Farin et al., 1990), quando ocorre o pico de produção no bovino, coincidindo com a fase em que o embrião passa da forma esférica para alongada (Demmers et al., 2001).

O *IFNT* impede a liberação de prostaglandina e a lise do corpo lúteo, mantendo a produção de progesterona adequada para início da gestação. A luteólise que ocorre pela ação da  $PGF_{2\alpha}$  necessita da secreção de ocitocina e sua interação com os receptores, que se encontram, principalmente, nas células epiteliais do endométrio. O *IFNT* modula a secreção uterina de  $PGF_{2\alpha}$  através da inibição da expressão de receptores de ocitocina no endométrio. Em ovinos, os receptores de ocitocina no endométrio não são expressos antes de 10 dias do acasalamento. E após 20 dias da gestação, a concentração de ocitocina no corpo lúteo é muito



baixa. Coincidentemente, o período em que ocorre o aumento da expressão de *IFNT*, é o mesmo de quando a ocitocina é liberada para estimular a secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Demmers et al., 2001; Mann & Lamming, 2001).

Sabe-se também que em ruminantes, o *IFNT* afeta a síntese de outras citocinas, como interleucina 4 (*IL - 4*), que participa de imunomodulações necessárias para impedir a rejeição do concepto e estimular o crescimento do blastocisto. O *IFNT* diminui a concentração endometrial de cicloxigenase 2 (*COX - 2*) que influencia na conversão do ácido araquidônico em  $\text{PGF}_{2\alpha}$  impedindo a síntese de prostaglandinas. Além disso, em bovinos, durante a prenhez, ocorre um aumento na concentração de ácido linoléico nas células do endométrio, que também contribui para inibição da síntese de prostaglandinas (Demmers et al., 2001; Arosh et al., 2004; Lee & Demayo, 2004). Devido ao importante papel do *IFNT* no reconhecimento materno da gestação, a sua produção insuficiente ou não produção promove a perda da gestação (Wolf et al., 2003).

Durante o processo do reconhecimento materno da gestação ocorre a adesão do blastocisto ao endométrio. A invasão endometrial, como acontece nos humanos, não ocorre em ruminantes domésticos. Assim, a implantação do embrião bovino é atingida pela adesão de células mononucleares do trofoblasto ao epitélio endometrial luminal (EL) com a formação de um sincício através da fusão de células binucleadas derivadas do trofoectoderme ao EL. Entre 14 e 16 dias de desenvolvimento embrionário, as células binucleadas se diferenciam e migram para o epitélio endometrial. A adesão endometrial ocorre por volta de 16 dias após a fecundação (Spencer et al., 2004; Lee & Demayo, 2004).

No reconhecimento da gestação, além da interação de fatores químicos materno-fetais, existe um fator físico, que envolve a ocupação pelo embrião do lúmen uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Ou seja, para bloquear efetivamente a luteólise, o embrião deve estar alongado o suficiente para fazer o contato necessário com a superfície do epitélio endometrial. Embriões subdesenvolvidos, e que não realizam esta ocupação devidamente podem ser eliminados (Binelli, 2000). Nos ruminantes, esse contato materno – fetal é realizado por pontos individuais denominados placentomas, local onde ocorre troca de metabólitos e nutrientes entre mãe e feto (De Sousa et al., 2001).

Então, para que o embrião se desenvolva é necessário o reconhecimento materno e sua implantação, sendo que a interligação desses eventos é essencial para o sucesso do estabelecimento da gestação.

#### 5.4. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

A PIV de embriões se refere à combinação de vários processos interdependentes que vão desde a maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos até a produção de embriões para serem transferidos para as receptoras.

No processo de MIV, os ovócitos ainda imaturos retomam a meiose assim que são retirados do ambiente folicular (Bever & Izadyar, 2002; Lonergan et al., 2003a) por serem privados de substâncias inibitórias presentes no líquido folicular (Sirard et al., 2006). *In vivo*, a retomada da meiose ocorre em resposta ao pico pré-ovulatório do LH e se completa no bovino 24 h após, ocorrendo a expulsão do primeiro corpúsculo polar e a retenção do ovócito em MII (van den Hurk & Zhao, 2005). Conseqüentemente, assim que os ovócitos são puncionados do folículo eles precisam ser colocados rapidamente em meio de cultivo adequado. A obtenção de ovócitos imaturos pode ser realizada através da punção de ovários provenientes de abatedouro ou pela aspiração ovariana guiada por ultra-som em animais vivos. Em geral os ovócitos são obtidos de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro. Isso porque está estabelecido que só os ovócitos que atingem o seu crescimento total podem ser competentes. O crescimento do ovócito se completa quando o folículo tem em torno de 2 mm. Ovócitos puncionados de folículos grandes (>6 mm) são mais competentes em relação a ovócitos de folículos pequenos de 3-6 mm e, possuem maior probabilidade de gerar embrião (Lonergan et al., 1994; Lequarre et al., 2005; Caixeta et al., 2009).

O estabelecimento de um meio de maturação eficiente que promova uma correta maturação é um importante fator e, certamente, interfere nas demais etapas da PIV. Para a MIV de ovócito de bovino, normalmente, utiliza-se o meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199) com sais de *Eaerle's*. Alguns grupos de pesquisa têm utilizado *synthetic oviductal fluid* (SOF) que normalmente é utilizado para cultivo de embrião. Lonergan et al. (2004)

verificaram que o SOF é capaz de promover maturação ovocitária na ausência de macromoléculas. Em contrapartida, Russell et al. (2006) mostraram que ovócitos maturados em meio SOF geraram embriões de qualidade inferior do que aqueles maturados em meio TCM-199. Os suplementos do meio de maturação de ovócitos *in vitro* variam entre laboratórios. Esses podem ser constituídos de fonte de energia, glicose e piruvato; fonte protéica, soro fetal bovino e BSA ou macromoléculas sintéticas como álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) (Ali & Sirard, 2002); bicarbonato de sódio; L-glutamina; hormônios LH e FSH, antioxidantes; *epidermal growth factor* (EGF) e *insulin-like growth factor* (IGF) (Gonçalves, et al., 2001; Makarevich & Markkula, 2002; Sirard et al., 2007). Pode-se também acrescentar ao meio de maturação substâncias (roscovitine, butirolactona-I) que retêm a meiose com a função de aumentar o tempo para completar a maturação citoplasmática do ovócito *in vitro*, e conseqüentemente, melhorar sua competência (Rodríguez & Farin, 2004). Além disso, o pH e a osmolaridade do meio, assim como a temperatura do cultivo e a tensão de O<sub>2</sub> também afetam o sucesso da MIV (Nagai, 2001).

Para a fecundação, é realizada a preparação do sêmen, sendo que o procedimento mais utilizado é o gradiente de *Percoll*, composto de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro) coberto com polivinilpirrolidona – PVP (Avery & Greve, 1995), que seleciona os espermatozóides e elimina o crioprotetor. Posteriormente, os espermatozóides são ressuspensos em meio de fecundação (FERT-TALP), composto por sais, em que se adicionam alguns suplementos como o PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina), para aumentar a atividade espermática e facilitar a penetração no ovócito (Gonçalves, 2001). A penicilamina parece estar envolvida com a reação da glutatona redutase, a qual possui uma ação efetiva no mecanismo de defesa da membrana espermática contra o estresse oxidativo. Esse mecanismo aumenta o tempo em que o espermatozóide fica viável na gota de fecundação (Pavlok, 2000). A hipotaurina exerce um papel anti-oxidante evitando que a membrana das células espermáticas sofram injúrias pela peroxidação de lipídios, que são componentes dessa membrana, evitando a redução da viabilidade das células espermáticas (Souza & Ferreira, 2007). A heparina, outra substância acrescentada ao meio de fecundação, estimula a capacitação espermática e a fecundação. A heparina se liga a um determinado tipo de proteína do plasma seminal, “*heparin binding proteins*” (HBP) sintetizadas pelas glândulas acessórias, vesícula seminal, próstata e bulbo uretral. Estas proteínas se aderem à membrana espermática e possuem grande afinidade com a heparina (Bellin et al, 1994). A heparina

ligada acarreta o aumento de cálcio intracelular, e fosforilação de proteínas desencadeando a reação acrossomal (Lane et al., 1999). A albumina sérica bovina (BSA), normalmente presente no meio de fecundação, juntamente com o cálcio e bicarbonato são componentes indispensáveis para ajudar na estimulação do processo de capacitação espermática (Pavlok et al., 2001). O co-cultivo (espermatozóide e ovócitos) é realizado por um período de 12 a 18 horas (Dode et al., 2002), a uma temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Os espermatozoides são adicionados às gotas de fecundação contendo os ovócitos a uma concentração final que pode variar de 1x10<sup>6</sup> a 1x10<sup>7</sup> de espermatozoides/ml de meio.

Para o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões vários meios podem ser utilizados, SOF, meio de cultivo celular (TCM), meio Ham's F – 10, *Garner's G1/G2* e *hamster embryo culture médium* (HECM-6) com acréscimo de proteínas, substrato energéticos, aminoácidos essenciais e não essenciais e myo-inositol. O uso de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo de embrião, como fonte protéica, tem sido considerado como responsável por anormalidades fetais e placentárias, pelo excesso de peso de bezerros (síndrome de bezerros grande) gerando distocias (Hoshi, 2003; Camargo et al., 2010). Conseqüentemente, novas substâncias estão sendo utilizadas com o objetivo de substituí-lo como a albumina sérica bovina (BSA), ou as macromoléculas: como álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP) (Enright et al., 2000). Apesar da presença de SFB no meio SOF promover uma taxa superior de blastocistos (47,5%) em relação aos meios que não utilizam o SFB (28,3%) (Gutiérrez-Adán et al., 2001), ainda não se sabe se a concentração de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas que estão presentes no SFB pode variar entre os lotes e afetar os resultados da PIV. A fonte energética requerida para suprir as necessidades do embrião nas primeiras clivagens até a formação de 16-32 células é o lactato e piruvato (Lane e Garner, 2007). Após a compactação e formação da blastocelule, quando se inicia a diferenciação das células do embrião precisa-se utilizar a glicose como substrato energético (Rieger et al., 1992). Diversos sistemas vêm sendo empregados com o objetivo de mimetizar ao máximo as condições uterinas, melhorando a taxa de PIV de embrião. Thibodeux et al. (1992) realizaram o co-cultivo com células somáticas de trato reprodutivo feminino, tais como células do oviduto, junto a embriões bovinos. As células somáticas produzem fatores embriotróficos e/ou modificando componentes inibitórios para o desenvolvimento embrionário presentes no meio de cultivo (Carolan et al., 1995; Jones et al., 2009). A

composição do meio junto às fontes protéicas já citadas exerce um efeito na morfologia das células do embrião e na expressão de alguns genes (Rief et al., 2002). Tem sido mostrado por vários autores que o cultivo de embriões bovinos em oviduto de ovelhas como sendo um método adequado para o desenvolvimento de embriões do estágio de zigoto a blastocisto. A vantagem desse sistema *in vivo* é a capacidade de produzir grande número de embriões PIV com características semelhantes aos embriões produzidos *in vivo* (Lonergan & Fair, 2008).

### **5.5. Cultivo de embriões pós-eclosão (Dia 9 – Dia 15)**

O desenvolvimento embrionário pós-eclosão *in vitro* é um instrumento de estudo para avaliação do potencial de desenvolvimento de embriões sem a necessidade da transferência de embriões para receptoras (Vejlsted et al., 2006). Essa técnica tem o potencial de permitir a realização de estudos no estágio mais crítico do crescimento do embrião, principalmente, aqueles oriundos da PIV, onde a maior taxa de mortalidade embrionária se concentra nas 2-3 semanas após a fecundação (Farin et al., 2001).

O cultivo *in vitro* temporário de embriões pós-eclosão é descrito nas mais diferentes espécies como primatas (Pope et al., 1982), ratos (Balls & Hellsten, 2002), coelhos (Pitt & Carney, 1999) e hamsters (Wlodarczyk et al., 2001), sendo utilizado para testes de substâncias quanto ao seu efeito teratogênico ou influência genética nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário. Entretanto, neste tipo de estudo, os embriões ou fetos iniciais eram lavados do útero materno no período de interesse e geralmente eram mantidos em meio simples por curto período de tempo. Nenhum destes trabalhos descreve um sistema de cultivo por um período mais prolongado.

O sistema de cultivo *in vitro* pós-eclosão de embriões bovinos teve início há 20 anos. A primeira observação de crescimento de embriões bovinos nesse período foi relatada por Stringfellow & Thomson (1986) – citado por Brandão (2006), sendo discretamente informado por um boletim do Alabama Agricultural Experiment Station. Esses autores coletaram embriões por lavagem uterina e os cultivaram em gel de agarose e observaram o alongamento das estruturas.

Vajta et al. (2004) verificaram o crescimento do embrião no sistema de cultivo tridimensional com gel de agarose até o dia 16 de cultivo, porém não foi observada a formação do disco embrionário. Este sistema foi à primeira versão mais próxima do sistema completo do cultivo *in vitro* pós-eclosão depois do trabalho em 1986. Logo após esse relato, Brandão et al. (2004) mostraram o primeiro modelo de cultivo pós-eclosão que proporcionou um rápido crescimento, associado ao alongamento e diferenciação inicial de embriões bovinos. Esse grupo utilizou um sistema constituído por túneis construídos de gel agarose com um meio de cultivo PHD (SOFacci suplementado com 27,7 mM de glicose e 5% de SFB). Esses pesquisadores observaram que 56-67% dos embriões colocados em cultivo PHD mostraram um crescimento rápido até o dia 13 de cultivo. E através dos embriões fixados no dia 14 de cultivo verificaram por microscopia eletrônica a formação do hipoblasto e do epiblasto, sendo que este havia penetrado o trofoblasto (Camada de Rauber), definindo assim o disco embrionário. E, para verificar a continuação do desenvolvimento dos embriões após o dia 14, alguns deles foram mantidos em cultivo até o dia 15, onde foi observado o crescimento apenas de embriões de boa qualidade. Quanto ao sexo, a porcentagem de machos que cresceram no sistema PHD foi maior ( $p < 0,001$ ) no grupo de embriões qualidade I (97%;  $n=38$ ), mas similar em relação as fêmeas nos embriões de qualidade II (43%;  $n = 21$ ) e qualidade III (57%;  $n=6$ ) dos embriões (Brandão et al., 2004).

De acordo com as observações de Brandão et al. (2004) o sucesso do desenvolvimento de embriões cultivados *in vitro* depende basicamente de quatro fatores críticos: os embriões têm que estar eclodidos da zona pelúcida no dia 8 de cultivo, têm que ser embriões de boa qualidade morfológica, há necessidade de um meio adequado de cultivo pós-eclosão e finalmente os embriões devem estar alojados em uma estrutura tridimensional. À medida que o embrião se desenvolve, ele têm a necessidade de moléculas com elevada energia como a glicose (Lane e Garner, 2007). Portanto, para a continuação do desenvolvimento embrionário pós-eclosão *in vitro* é essencial a adição de componentes energéticos já que meios como TCM – 199 e o fluido oviduto sintético (SOF) têm baixas concentrações de açúcares.

Ultimamente, como alternativa de se obter conhecimentos do embrião bovino no estágio pós-eclosão, muitos estudos têm utilizado o modelo de transferência múltipla, em que o cultivo pós-eclosão acontece *in vivo*, para avaliar a morfologia embrionária e o perfil

molecular do embrião produzido *in vitro* (Clemente et al., 2009; Rodríguez-Alvarez et al., 2010; Clemente et al., 2011). Estudos que avaliaram embriões pós-eclodidos bovinos *in vivo* e *in vitro* mostram que normalmente há uma grande variação no tamanho dos embriões coletados (Bertolini et al., 2002; Maddox-Hyttel et al., 2003; Clemente et al., 2009). Provavelmente, isso ocorre, pois o endométrio uterino reage diferentemente quando em contato com embriões oriundos de clonagem, PIV e inseminação artificial (IA) (Mansouti-Attia et al., 2009) comprometendo o desenvolvimento embrionário. Além disso, uma maior diferença na expressão gênica desses embriões aparece após o 13º dia do desenvolvimento (Clemente et al., 2011). Além da alteração do embrião, Mansouti-Attia et al. (2009) encontraram modificações na expressão de vários genes envolvidos com a produção de ATP no endométrio que recebeu o embrião clone, além da super-expressão de genes relacionados com transporte de glicose, incluindo do SLC2A1. Portanto, o estudo do embrião após a eclosão é essencial para predizer a qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Pois, dessa forma pode-se acompanhar o alongamento do embrião, que é um parâmetro melhor do que a simples taxa de blastocisto.

### **5.6. Diferença entre o embrião produzido *in vitro* e o *in vivo***

As biotecnologias da reprodução, em especial, a PIV de embriões têm contribuído para acelerar o melhoramento genético, além de aumentar anualmente a produção de animais geneticamente superiores. Entretanto, esse sistema artificial de produção de embriões ainda não os produz com qualidade semelhante aos obtidos de forma natural (Farin et al., 1999). Além disso, a taxa de blastocisto ainda é considerada baixa e muito variável entre laboratórios, 30–50 % dos ovócitos maduros inseminados *in vitro* alcançam o estágio de blastocisto (Farin et al., 2001, Pontes et al., 2009).

A fonte de proteína utilizada no meio de cultivo de embriões *in vitro* como o SFB e BSA têm produzido embriões morfologicamente diferentes dos *in vivo* (Keskintepe et al. 1995). Porém, a produção *in vitro* de embriões em meio sem SFB resulta em uma menor taxa de blastocisto quando comparado ao cultivo onde se adiciona o soro (Pinyopummintr & Bavister, 1991). Apesar da adição de soro ao meio de cultivo *in vitro* melhorar o desenvolvimento embrionário de bovinos (Van Langendonck et al., 1997), os embriões apresentam uma compactação incompleta na MCI no estágio de mórula e uma aparência

escura quando comparado com embriões formados *in vivo* e cultivados em meio sem soro (Farin et al., 2004). Observa-se também que embriões produzidos *in vitro* na presença de SFB possuem poucas organelas citoplasmáticas, as mitocôndrias são ovais com cristas pouco definidas e as junções celulares não são claramente visíveis (Ott et al., 2002).

Sirard & Lambert (1985) acredita que independente da utilização do soro em meio de cultivo *in vitro* para embriões, eles continuam sendo morfológicamente diferentes daqueles produzidos *in vivo*. Entre as diferenças pode-se mencionar que embriões PIV possuem um grande acúmulo intracelular de lipídios, presença de vacúolos, decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparado com embriões *in vivo* (Farin et al., 2004; Crosier et al., 2000; Crosier et al., 2001). Acredita-se que o acúmulo de lipídios em embriões PIV pode ser resultado da influência do meio ou do metabolismo ineficiente dos lipídios pelas mitocôndrias embrionárias (Farin et al., 2001). Essa diferença de densidade mitocondrial, entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, faz com o embrião oriundo da PIV fique em desvantagem quanto a sua qualidade (Farin et al., 2004). Pois, as mitocôndrias são estruturas essenciais para o desenvolvimento embrionário, influenciando inclusive no sucesso da gestação.

Outras diferenças morfológicas importantes do embrião produzido *in vitro* são relatadas. Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* tanto em estágio de mórula quanto no estágio de blastocisto possuem a proporção citoplasma:núcleo maior do que embriões *in vivo* (Crosier et al., 2000; Crosier et al., 2001). Além disso, blastocistos produzidos *in vitro* possuem células totais e células da massa celular interna em menor quantidade (Iwasaki et al., 1990), e um maior número de células picnóticas quando comparados a embriões *in vivo*. Comparado com embriões produzidos *in vivo*, blastocistos de PIV têm número reduzido de microvilosidades na membrana apical de células trofoblásticas, ocorrendo diminuição da capacidade de absorção de nutrientes pelo embrião (Crosier et al., 2001).

Embriões bovinos produzidos *in vitro* possuem também alterações genéticas como alta frequência de mixoploidia e poliploidia em relação a embriões *in vivo*. A ocorrência de embriões mixoplóides nos dias 7 e 8 pós-inseminação podem ocorrer tanto em embriões *in vivo* quanto *in vitro*, porém uma maior frequência foi observada em embriões produzidos *in vitro* (25% vs 72%, respectivamente), mas esse fenômeno parece não influenciar na taxa de



preñez. Já os embriões poliplóides, muito comuns na PIV, se desenvolvem somente até o dia 2 e 3 pós-inseminação, influenciando no sucesso da preñez (Viuff et al., 2000; Viuff et al., 2001).

Além das alterações embrionárias, é comum observar anormalidades fetais e em bezerro oriundos da PIV. Apesar da diminuição dessas alterações devido ao avanço da técnica nos últimos anos, ainda ocorre o nascimento de animais com peso acima da média, aumentado casos de distocias, viabilidade e mortalidade perinatal (Kruip & Den Dass, 1997; Farin et al., 2006; Camargo et al., 2010). Os bezerros podem apresentar deformidades músculo-esquelética, além de a vaca gestante ter maior probabilidade de desenvolver hidroalantóide e outras deficiências placentárias (Farin et al., 2004). A mortalidade prematura ocorre nas primeiras 2-3 semanas de gestação, comprometendo 58% das preñezes oriundas de embriões PIV (Kruip & Den Dass, 1997; Dunne et al., 2000). Portanto, o ambiente extra-uterino durante os 7 dias da PIV possuem diversos fatores que podem comprometer a qualidade dos ovócitos e o fenótipo do embrião (Farin et al., 2001) e conseqüentemente o desenvolvimento fetal e placentário no bovino. Entre esses fatores inclui a composição do meio, a tensão de O<sub>2</sub> (Rho et al., 2007; Corrêa et al, 2008), fonte energética (Lane e Garner, 2007), macromoléculas e aminoácidos (Garner, 2008).

A aproximação do ambiente *in vitro* com o fisiológico tem como objetivo melhorar a taxa de produção *in vitro* de embriões. Muitos estudos comparando embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* têm sido realizados para elucidar os motivos que geram as alterações morfológicas e moleculares entre esses embriões.

### **5.7. Expressão de gênica em embriões**

Além da avaliação morfológica do embrião para determinar sua qualidade, a análise de expressão de genes têm sido uma ferramenta importante para qualificar os embriões em diferentes estágios de desenvolvimento (Pomar et al., 2005). Os níveis de RNA mensageiro (RNAm) podem diferir de acordo com a fase do embrião cultivado *in vitro* e com o tipo de suplementos utilizados (Farin et al., 2004). O conhecimento do perfil dos genes que são expressos no período pré-implantação permite a elucidação dos mecanismos moleculares

que controlam a sobrevivência embrionária inicial e, desta forma, a utilização dessa técnica contribui para melhorar a baixa taxa de produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (El-Sayed et al., 2006). Enriquecendo ainda mais os estudos das vias que regulam o crescimento e desenvolvimento do conceito no ambiente uterino, tem-se observado significantes progressos e avanços com uso do transcriptoma, que identificam um maior número de genes que são diferencialmente expressos em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (El-Sayed et al., 2006; Mamo et al., 2011; Clemente et al., 2011). É importante relevar se embrião produzido *in vivo* é oriundo pelo protocolo de superestimulação ou pela ovulação sem o uso de hormônios, pois esta estimulação pode alterar o padrão da expressão gênica dos embriões *in vivo* (Mundim et al., 2009) fazendo que para determinado perfil de genes a expressão fique semelhante aos embriões PIV.

Após a fecundação, até o estágio de 8 – 16 células em bovino, a síntese de proteínas embrionárias é dependente do RNAm materno, estocados pelo ovócito durante a ovogênese. Com a ativação do genoma embrionário, o próprio embrião controla e regula a síntese de suas proteínas. Portanto, qualquer modificação no ambiente de cultivo *in vitro* pode influenciar a expressão de determinados genes afetando a qualidade embrionária no período pré-implantação e o desenvolvimento fetal (Lonergan et al., 2003b; Sargirkaya et al., 2006).

A avaliação da expressão de genes relacionados à comunicação materna fetal, como IFNT, pode auxiliar no processo de seleção de embriões de boa qualidade e que serão transferidos para receptoras, aumentando consequentemente a taxa de prenhez (Wolf et al., 2003). Já se observou que em embriões PIV a expressão de *IFNT* inicia-se em embriões de 8 (Lonergan et al., 2003b) a 16 células (Yao et al., 2009). Contudo, sua expressão aumenta em torno de 12 a 16 dias de gestação (Demmers et al. 2001; Mamo et al., 2011). Além disso, Stojkovic et al. (1999) verificaram que a área do trofoblasto e a produção de IFNT foi maior em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* em relação aos embriões clones. Essa diferença na produção de IFNT pode ser uma das razões da baixa taxa de prenhez que ocorre após a transferência de embriões originados da transferência nuclear. Lonergan et al. (2003b) observam um aumento da expressão de *IFNT* no grupo de embriões cultivados *in vitro* na ausência de soro fetal bovino, o que os autores relacionaram com a boa qualidade desses embriões. A expressão do *IFNT* parece ser geneticamente programada independentemente da

origem do embrião, produzido *in vitro* ou *in vivo*, portanto, parece que o ambiente uterino não influencia na sua expressão e sim no controle de produção (Neira et al., 2007). O meio do cultivo *in vitro* e a velocidade de formação do embrião também podem afetar a expressão e secreção de *IFNT* (Demmers et al., 2001).

Um estudo realizado por El – Sayed et al. (2006) avaliou uma relação de genes entre embriões D7 produzidos *in vivo* e *in vitro* que resultaram em prenhez. Eles verificaram que a expressão gênica na biópsia de embriões do grupo que resultou no nascimento de bezerro mostrou um enriquecimento de genes relacionados com a implantação (*COX2* e *CDX2*), com o metabolismo de carboidrato (*ALOX15*), com o fator de crescimento (*BMP15*) e com a formação da placenta (*PLAC8*). Já as biópsias de embriões do grupo que resultou em reabsorção no início da gestação, apresentaram níveis elevados de genes envolvidos na fosforilação de proteínas (*KRT8*), na membrana plasmática (*OCLN*) e no metabolismo de glicose (*PGK-1* e *AKR1B1*). E na biópsia de embriões oriundos de insucesso na gestação observou-se aumento na expressão de genes envolvidos com as citocinas inflamatórias (*TNF*), proteína ligante de aminoácidos (*EEF1A1*), fatores de transcrição (*MSX1*, *PTTG1*), metabolismo de glicose (*PGK-1* e *AKR1B1*) e um gene responsável pela inibição da implantação (*CD9*).

A avaliação do estresse oxidativo e térmico também podem indicar se o ambiente extra-uterino está afetando a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Essa avaliação pode ser realizada, através da expressão dos genes *HSP70* (*Heat shock protein*), proteína de estresse provocado por variação de temperatura, *MnSOD* (*mitochondrial activity and detoxification of reactive oxygen*) e *SOX*, genes relacionados com estresse oxidativo. A expressão do *MnSOD* está elevada em embriões *in vivo* em relação aos embriões PIV (Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2003b) e, principalmente, se esses forem cultivados em alta tensão quando comparados aos de baixa tensão (Corrêa et al., 2008). Além disso, a expressão de *MnSOD* também se mostrou aumentada quando o soro fetal estava presente no meio de cultivo (Rizos et al., 2003). Quanto à ativação da *HSP70*, sabe-se que não está relacionada só com a variação de temperatura, mas também com estresse celular provocado por produção de peróxido de hidrogênio, infecção e inflamações (Paula-Lopes and Hansen, 2002; Ahn and Thieli, 2003). Pode acontecer do gene *HSF1*, principal fator de transcrição e que controla rapidamente o gene *HSP* (Xiao et al., 1999), ser ativado sob estresse osmótico e

consequentemente induzir a expressão do gene *HSP70* (Fiorenza et al., 2004). A manipulação, o sexo dos embriões e o ambiente de cultivo podem alterar a atividade transcricional das *HSPs* (Lazzari et al., 2002; Morton et al., 2007).

O estudo do metabolismo energético de embriões pré-implantação é um instrumento que pode ser utilizado para prever a sua viabilidade (Ongeri & Krisher, 2001). O padrão de expressão de transportadores de glicose durante o período pré-implantação de embriões tem sido estudado em diversas espécies (Augustin et al., 2001). Conforme o blastocisto se desenvolve ele requer como fonte de energia, a glicose que é internalizada por transportadores de glicose (SLC) (Augustin et al., 2001; Pantaleon et al., 2001). O transporte de glicose é realizado pela membrana plasmática e mediado por dois mecanismos: o primeiro é ativo e dependente de sódio e, o segundo é passivo em que o transporte da glicose é mediado por SLCs (Augustin et al., 2001; Wood & Trayhurn, 2003). Em células de mamíferos e embriões, os principais carreadores de glicose são o SLC2A1, SLC2A2 e SLC2A3, que são algumas das 9 isoformas da SLC (Augustin et al., 2001; Harvey et al., 2004). A disposição basolateral da *SLC2A1* no trofoectoderma e na massa celular interna é coerente com a função no fluxo de glicose maternal através das células do trofoectoderma (Pantaleon et al., 2001). Já a *SLC2A3* é a maior rota de entrada de glicose para o interior do blastocisto (Pantaleon et al., 1997). Em embriões PIV bovino, já foi observado a expressão de *SLC2A1* e *SLC2A3* tanto em blastocistos expandidos como em embriões no dia 14 e dia 16 desenvolvimento (Augustin et al., 2001; Bertolini et al., 2002). Sendo que diferentes sistemas de cultivo embrionário e o sexo do embrião podem influenciar o padrão de expressão da *SLC*. A expressão da *SLC2A1* aumentou em blastocisto bovino cultivado a 2% de O<sub>2</sub> em relação aqueles cultivados a 7% e 20% de O<sub>2</sub> (Harvey et al., 2004). Em embriões *in vivo*, a abundância relativa de *SLC2A1* foi maior do que nos embriões PIV em D7 (Balasubramanian et al., 2007). Abundância relativa de *SLC2A3* foi superior em embriões machos D7 em relação aos embriões fêmeas quando se utilizou sêmen sexado (Morton et al., 2007). Porém, em embriões D8, a abundância relativa desse transcrito foi semelhante em embriões oriundos ou não de sêmen sexado (Morton et al., 2007).

Além disso, o sistema de cultivo *in vitro* de embriões pode estar causando um desequilíbrio da expressão de genes relacionados ao cromossomo X. Durante as primeiras clivagens, os embriões fêmeas carregam dois cromossomos X em que estão ativos duas vezes

mais enzimas ligadas ao cromossomo X em relação aos embriões machos, que possui somente um cromossomo X (Epstein et al., 1978). Então, a compensação de dosagem que é realizada através da proteína *X-inactive specific transcript (Xist)* (Wrenzycki et al., 2002; De La Fuente et al., 1999) em que ocorre a inativação de determinadas regiões de um dos cromossomos X durante o desenvolvimento embrionário (Jegalian & Page, 1998). De La Fuente et al. (1999) verificaram que 77.7% dos embriões eclodidos fêmeas produzidos *in vitro* tinham um cromossomo X inativo. Isso pode estar relacionado com o desenvolvimento acelerado de embriões machos em relação a embriões fêmeas produzidos *in vitro* (Gutiérrez-Adán et al., 2000). Os genes *G6PD* e *PGK-1* são exemplos de genes ligados ao cromossomo X, e a expressão igualitária em embriões machos e fêmeas dependem da inativação de um cromossomo X (Wrenzycki et al., 2002; De La Fuente et al., 1999). O gene *G6PD* é um potencial indicador de atividade da via pentose fosfato (PPP), que produz *NADPH*, o qual participa da via glicolítica e ribose-5-fosfato, que será utilizado para biosíntese de nucleotídeo (Balasubramanian et al., 2007; Zheng et al., 2007). A maior expressão de *G6PD* foi encontrada nas mórulas e blastocistos em embriões PIV cultivados sob alta e baixa tensão de O<sub>2</sub> em relação aqueles produzidos *in vivo* (Balasubramanian et al., 2007). Os embriões de 4 células, mórulas D6 e blastocisto em D7 cultivados em SOF apresentaram maior expressão de *G6PD* em relação aqueles cultivados *in vivo* em oviduto de ovelha (Lonergan et al., 2003b). Ferreira et al. (2010) mostraram que o cromossomo X paterno está inativado no estágio de mórula de bovino produzidas *in vitro*. Em outros estudos o gene *G6PD* foi mais expresso em embriões fêmeas em relação aos embriões machos no dia 7 após a fecundação *in vitro*, indicando que em embriões fêmeas os dois cromossomos estão ativos (Gutierrez-Adán et al., 2000), porém nenhuma diferença entre embriões machos e fêmeas produzidos *in vivo* foi observada (Wrenzycki et al., 2002). A abundância relativa do *G6PD* foi superior em embriões fêmeas D8 quando se utilizou sêmen sexado em relação aos embriões machos (Morton et al., 2007). A expressão do gene *PGK-1*, outro gene ligado ao cromossomo X, nos embriões PIV no estágio de mórula, foi similar aos *in vivo*, porém os blastocistos PIV mostraram maior abundância relativa em relação aos embriões *in vivo*, aos paternogênético e aos clones (Wrenzycki et al., 2002).

Nos embriões em estágio pós-eclosão é importante verificar genes relacionados à implantação (*KRT8*) e placentação (*PLAC 8*). O *KRT8* tem um papel importante na formação do blastocisto e sua subsequente implantação, pois é responsável pela formação do

citoesqueleto no trofoectoderma. A expressão desse gene apresentou altos níveis na fase de blastocisto bovino estando com baixa expressão no embriões com 2 células e mórula (El-Halawany et al., 2004). A expressão desse gene também foi verificada em embriões PIV no dia 14 de desenvolvimento, sendo relatada uma superexpressão desse gene em embriões fêmeas (Machado et al., 2011). A proteína *KRT8* é crítica para o desenvolvimento de embriões pós-eclosão (Maddox-Hyttel et al. 2003) e sua deficiência está associada com a morte de embriões de camundongo (Jaquemar et al. 2003). Baixa expressão desse gene foi relatada em embriões oriundos de transferência nuclear quando comparado com embriões PIV (Pfister-Genskow et al. 2005). Em contraste, Somers et al. (2006) não verificaram diferença na expressão desse gene em nenhum desses embriões. O gene *PLAC8* ainda não tem sua função bem estabelecida, mas sabe-se que sua expressão está relacionada unicamente com a placenta (Galaviz-Hernandez et al. 2003; Klein et al. 2006). Uma alta expressão desse gene foi relatada em blastocisto que tiveram sucesso na prenhez quando comparado com àqueles que foram reabsorvidos (El-Sayed et al. 2006) e no endométrio de vacas prenhes em relação as não prenhes (Klein et al. 2006).

As condições e meios utilizados na produção *in vitro* de embriões pode influenciar a expressão de RNAm prejudicando a qualidade embrionária e o desenvolvimento fetal. Muitos pesquisadores têm observado que a alteração na expressão de genes está diretamente relacionada com o bom desenvolvimento dos embriões culminando em gestações e nascimento de animais saudáveis.

## 6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AHN, S.G & THIELE, D.J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. **Genes Development** v.17, p.516–528, 2003.
- ALEXOPOULOS, N.I.; & FRENCH, A.J. The prevalence of embryonic remnants following the recovery of post-hatching bovine embryos produced *in vitro* or by somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.43-53, 2009.
- ALI, A. & SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. **Biology of Reproduction**, v.66, p.901-905, 2002.
- AROSSH, J. A.; BANU, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAIN, P.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of interferon -  $\tau$  on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E<sub>2</sub>. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5280 – 5293, 2004.
- AUGUSTIN, R., POCAR, P., NAVARRETE-SANTOS, A., WRENZYCKI, C., GANDOLFI, F., NIEMANN, H., FISCHER, B. *Glucose transporter expression is developmentally regulated in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.60,p.370-376, 2001.
- AVERY, B. & GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995.
- BALASUBRAMANIAN, S., SON, W.J., MOHANA KUMAR, B., OCK, S.A., YOO, J.G., IM, G.S., CHOE, S.Y., RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.265-275, 2007.

- BALLS, M. & HELLSTEN, E. Statement on the scientific validity of post-implantation rat whole-embryo culture assay – an *in vitro* test for embryotoxicity. **Alternative Laboratory Animal**, v. 30, p. 271 – 273, 2002.
- BARRETO, R.S.N.; BRESSAN, F.F.; OLIVEIRA, L.J.; PEREIRA, F.T.V.; PERECIN, F.; AMBROSIO, C.E.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A. Gene expression in placentation on farm animals: An overview of gene function during development. **Theriogenology**, v.107, p.589–597, 2011.
- BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91 – 148, 1995. Citado por Brandão, 2006.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. **Journal Animal Science**, v.72, p.2.441-2.448, 1994.
- BERTOLINI, M; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B. Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular and Reproduction Development**, v. 63, p. 318 – 328, 2002.
- BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; RANDALL, G. C. B.; MITCHELL, D. Collection, description and transfer embryos from cattle 10-16 days after oestrus. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 59, p. 205 – 216, 1980.
- BEVERS, M.M. & IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.197, p.173-178, 2002.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. **Simpósio sobre o Controle Farmacológico do Ciclo Estral de Ruminantes**. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, 2000.
- BRANDÃO, D. O.; HYTTTEL, P.; LOVENDAHL, P.; RUMPF, R.; STRINGFELLOW, D.; CALLESEN, H. Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2048 – 2055, 2004.
- BRANDÃO, D. O. **Produção *in vitro* de embriões: cultivo de embriões pós-eclosão e criopreservação de meios prontos para uso**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, Brasília.
- CAIXETA, E.S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M.M.; JÚNIOR BURATINI, J.; DODE, M.A.N. Effect of follicle size on RNAm expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.655-664, 2009.



- CAMARGO, L.S.A.; FREITAS, C.; de SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H.M. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro* produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryo. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p.10-15, 2010.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.
- CLEMENTE, M.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; O'GAROA, P.; MEHTA, J.P.; FORDE, N.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P., RIZOS, D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 285-295, 2011.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.132-142, 2008.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1459 – 1465, 2000.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375 – 1385, 2001.
- De LA FUENTE, R., HAHNEL, A., BASRUR, P.K., KING, W.A.X inactive-specific transcript (*Xist*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**,v.60, p.769-775, 1999.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 41 – 49, 2001.
- De SOUSA, P. A.; KING, T.; HARKNESS, L.; YOUNG, L. E.; WALKER, S. K.; WILMUT, I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 23 – 30, 2001.
- DISKIN, M.G.& MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p.260–267, 2008.
- DISKIN, M.G., MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.297–311, 2006.

- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNNADES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, p.15-23, 2002.
- DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L. ; SIRARD, M. . Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 288-297, 2006.
- DUNNE, L.D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p.39 – 44, 2000.
- EPSTEIN CJ, SMITH S, TRAVIS AND TUCKER G. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. **Nature**, v. 274, p. 500-502, 1978.
- EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TEFAYE, D. Large – scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiology Genomics**, v. 28, p. 84 – 96, 2006.
- ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, p. 659 – 673, 2000.
- FARIN, C. E.; IMAKAWA, T. R.; HANSEN, T. R.; MCDONNELL, J. J.; MURPHY, C. N.; FARIN, P. W.; ROBERTS, R. M. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of Reproduction**, v. 53, p.210 – 218, 1990.
- FARIN, P.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Effect if *in vitro* culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. **Theriogenology**, v. 51, p.238, 1999.
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* system on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151 – 170, 2001.
- FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 53 – 62, 2004.
- FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O.; CARVALHO, J.O.; RUMPF R.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Allele-specific expression of the MAOA gene and X chromosome inactivation in *in vitro* produced bovine embryos. **Molecular and Reproduction and Development**, v.77, p.615–621, 2010.

- FERNANDEZ-TRESGUERREZ, B.; CAÑON, S.; RAYON, T.; PERNAUTE, B.; CRESPO, M.; TORROJA, C.; MANZANARES, M. Evolution of the mammalian embryonic pluripotency gene regulatory network. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.19955-19960, 2010.
- FIORENZA, M.T.; BEVILACQUA, A.; CANTERINI, S.; TORCIA, S.; PONTECORVIM & MANGIA, F. Early transcriptional activation of the hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1606–1613, 2004.
- FLESCHE, F.M. & GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.197-235, 2000.
- GARNER, D.K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristic. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p.9–18, 2008.
- GILBERT, S. F. Early development of vertebrates: Fish, birds, and mammals. In: GILBERTS, S. F. **Developmental Biology**. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc, 7 ed. p. 345 – 388, 2003.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L.F.S. In: Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 1 ed, p.195-226, 2001.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., OTER, M., MARTÍNEZ-MADRID, B., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female *in vitro*-produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.146–151, 2000.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A., LONERGAN, P., RIZOS, D., WARD, F.A., BOLAND, M.P., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117–1125, 2001.
- HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. Foliculogênese, Maturação Ovocitária e Ovulação. In: HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 7 ed. 2004, p. 69 – 82.
- HANSEN, P.J.; BLOCK, J.; LOUREIRO, B.; BONILLA, L.; HENDRICKS, K.E.M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.59-66, 2010.

- HARVEY, A.J., KIND, K.L., PANTALEON, M., ARMSTRONG, D.T., THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1108–1119, 2004.
- HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.1291–1301, 2003.
- IBGE, 2005. Disponível em: [www.ibge.org.br](http://www.ibge.org.br). Acesso em: 30 de maio de 2006.
- IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and porportion of inner cell mass of bovine blatocysts fertilized *in vivo* and *in vitro*. **Journal Reproduction Fertilty**, v. 90, n. 1, p.279 – 284, 1990. Abstract.
- JEGALIAN, K & PAGE, D.C. A proposed path by which genes common to mammalian X and Y chromosomes evolve to become X inactivated. **Nature**, v.394, p.776 – 780, 1998.
- JONES, G.M.; FIGUEIREDO, F.; OSIANLIS, T.; POPE, A.K.; ROMBAUTS, L.; STEEVES, T.E.; THOUAS, G.; TROUNSON, A.O. **Embryo culture, assessments, selection and transfer. Embryo Selection and criteria**, p.177-209, ascesso: <http://www.who.int/reproductive-health/infertility/20.pdf>, em 17/03/2009.
- KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 147–168, 2007.
- KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C. A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 1410 – 1417, 1995.
- KRUIP, A. M. & den DASS, J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: effectes on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43 – 52, 1997.
- LADIM-ALVARENGA, F. C. Fecundação e clivagem. In: PRESTES, N. C. & LADIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A, 2006, p. 1 – 21.
- LANE, M. E.; THÉRIEN, I.; MOREU, R.; MANJUNATH, P. Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. **Biology of Reproduction**, v.60, p.169-175, 1999.
- LANE, M.; GARNER, D.K. Embryo culture medium: which the best? **Best Pratical Research Clinic, Obstetric and Gynaeclogy**, v.21, p. 83–100, 2007.

- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 767 – 775, 2002.
- LEE, K. Y.; DeMAYO, F. J. Animal models of implantation. **Reproduction**, v. 128, p. 679 – 695, 2004.
- LEQUARRE, A.S.; VIGNERON, C.; RIBAUCCOUR, F.; HOLM, P.; DONNAY, I.; DALBIÈS-TRAN, R.; CALLESEN, H.; MERMILLOD, P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristic and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, p. 841-859, 2005.
- LONERGAN, P.& FAIR, T. *In vitro* produced embryos – Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p. 17–22, 2008.
- LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR,T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality : effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction of Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003a.
- LONERGAN, P.; PEDERSEN, H.G.; RIZOS, D.; GREVE, T.; THOMSEN, P.D.; FAIR, T. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocyst. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1096-1100, 2004.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.; de la FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of Messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424 – 1431, 2003b.
- MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v.23, p.1–12, 2011.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607 – 623, 2003.

- MAMO, S.; MEHTA, J.P.; McGETTIGAN, P.; FAIR, T.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; LONERGAN, P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptus associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. **Biology of Reproduction**, v.85, p.1143–1151, 2011.
- MANN, G. E. & LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175 – 180, 2001.
- MAKAREVICH, A.V.& MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factors I during *in vitro* maturation and culture. **Biology of Reproduction**, v.66, p.386-392, 2002.
- MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; MATTOS, M. C. C.; LOPES, Jr. G; CARRIJO, L. H. D.; SARTORI, R. Função ovariana em novilhas nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.958, 2007.
- MOORE, K. L. & PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 291 p.
- MORTON, K.M., HERRMANN, D., SIEG, B., STRUCKMANN, C., MAXWELL, W.M.C., RAHT, D., EVANS, G., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. Altered RNAm expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.931–940, 2007.
- MUNDIM, T.C.D.; RAMOS, A.F.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; MELO, E.O.; GOMES, L.F.S.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1398 – 1407, 2009.
- NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.
- NEIRA, J.A.; TAINTURIER, D.; L'HARIDON, R.M.; MARTAL, J. Comparative IFN- $\tau$  secretion after hatching by bovine blastocysts derived *ex vivo* and completed produced *in vivo*. **Reproduction of Domestic Animal**, v.42, p.68-75, 2007.
- OTT, M.; SCHERNTHANER, W.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Effects of bovine serum albumin and estrous cows on development and ultrastructure of *in vitro*-produced porcine embryos. **Anatomy Histological Embriology**, v. 31, p.151 – 157, 2002.

- ONGERI, E.M. & KRISHER, R.L. Glucose and pyruvate metabolism and preimplantation goat blastocyst following *in vitro* fertilization and pathernogenetic activation. **Cloning Stem Cells**v.3,p.115–123, 2001.
- PAN, G.; THOMSON, J. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. **Cell Research**, v.17, p. 42–49, 2007.
- PATALEON, M., HARVEY, M.B., PASCOE, W.S., JAMES, D.E., KAYE, P.L. Glucose transports GLUT 3: Ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**.v.94,p.3795–3800, 1997.
- PATALEON, M., RYAN, J.P., GIL, M., KAYE, P.L. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocyte and preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1247–1254, 2001.
- PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantaion bovine emryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, 1169–1177, 2002.
- PAVLOCK, A. D-penicilamine and granulosa cells can effectively extend the fertilitie life span of bovine frozen-thawed spermatozoa *in vitro*: effect of fertilization and polyspermy. **Theriogenology**, v.53, p.1135-1146, 2000.
- PAVLOK, A. The effect of various capacitation active compounds and capacitation time on the *in vitro* fertility and protein tyrosine phosphorylation profiles of bovine sperm. **Zygote**, v.9, p.25-38, 2001.
- PINYOPUMMINTR, T. & BAVISTER, B. D. *In vitro*-matured/*in vitro*-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 736 – 742, 1991.
- PITT, J. A. & CARNEY, E. W. Evaluation of various toxicants in rabbit whole embryo culture using a new morphologically based evaluation system. **Teratology**, v. 59, p. 102 – 109, 1999.
- POMAR, F. J. R.; TEERDS, K. J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B.; ROELEN, B. A. J. Difference in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. **Theriogenology**, v. 63, p. 2254 – 2268, 2005.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparasion of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriolenology**, 71, 690 – 697, 2009).

- POPE, L.; POPE, V. Z.; BECK, L. R. Development of Babbon pre-implantation embryos to post-implantation stages *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 915 – 923, 1982.
- RHO, G. J.; KIM, D. S.; SON, W. J.; CHO, S. R.; KIM, J. G.; CHOE, S. Y. Influence of *in vitro* oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. **Molecular Reproduction Development**, v. 74, p. 486 – 496, 2007.
- RIEF, S.; SINOWATZ, F.; STOJKOVIC, M.; EINSPANIER, R.; WOLF, E.; PRELLE, K. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 543 – 556, 2002.
- RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.585-505, 1992.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GÁRCIA, R.; PINTADO, B.; FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential Messenger RNA expresión between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589 – 243, 2003.
- RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; de la FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 236–595, 2002.
- ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. **Journal of Reproduction**, v. 160, p. 21 – 33, 1999.
- RODRIGUEZ, K.F.& FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.55-67, 2004.
- RUSSELL, D.F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1255-1270, 2006.
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, p.895-904.



- SILVA, A.E.D.F.; **Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros**. Brasília: Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 37p. Documentos, nº35.
- SIRARD, M. A. & LAMBERT, R. D. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 487 – 494, 1985.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.
- SIRARD, M.A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v.68S, p.S71-S-76, 2007.
- SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGARDT, R. C. Implantation mechanisms: insights from sheep. **Reproduction**, v. 128, p. 657 – 668, 2004.
- SOUZA, J.D.S. & FERREIRA, W.M. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal – meios de defesa contra os radicais livres. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.4, n.3, p.456-461, 2007.
- STOJKOVIC, M.; BUTTNER, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; RIEDL, J.; REICHENBACH, H. D.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of *in vivo* derived, *in vitro* produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 151 – 162, 1999.
- STRINGFELLOW, D. A. & THOMPSON, M. S. Maintenance and development of bovine embryos *in vitro*. **Alabama Agricultural Experiment Station: Highlights of Agricultural Research**, v. 33, p.11, 1986. Citado por Brandão, 2006.
- SWEENSON, M. J. & REECE, W. O. Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos. In: STABENFELDT, G. H. & EDVIST, L. E. **Processos Reprodutivos na Fêmea**, 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 615-644.
- THIBODEAUX, J. K.; MÉNÉZO, Y.; ROUSSEL, J. D.; HANSEL, W.; GOODEAUX, L. L.; THOMPSON, D. L. Jr.; GODKE, R. A. Coculture of *in vitro* fertilized bovine embryos with oviductal epithelial cells originating from different stages of the estrous cycle. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 1448 – 1455, 1992.
- VAJTA, G.; ALEXOPOULOS, N.; CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts *in vitro* in a three-dimensional gel system. **Theriogenology**, v. 7, p. 1253 – 1263, 2004.

- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, 2005, p.1717-1751.
- VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Journal Reproduction Fertility**, v. 109, p. 87 – 93, 1997. Abstract.
- VEJLSTED, M.; DU, Y.; VAJTA, G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of porcine and bovine embryo – defining criteria for expected development in vivo and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 65, p.153-156, 2006.
- VIANA, J. H. M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. **O Embrião, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, n. 42, 2009.
- VIUFF, D.; GREVE, T.; AVERY, B.; HYTTEL, P.; BROCKHOFF, P. B.; THOMSEN, P. D. Chromosome aberrations in *in vitro*-produced bovine embryos at days 2 – 5 post-insemination. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1143 – 1148, 2000.
- VIUFF, D.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J.; BIBBY, Bo. M.; GREVE, T.; HYTTEL, P.; THOMSEN, P. D. Chromosomal abnormalities and development kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 204 – 208, 2001.
- WOLDARECZYK, B.; BIERNACKI, B.; MINTA, M.; ZMUDZKI, J. Postimplantation whole embryo culture assay for hamsters: an alternative to rat and mouse. **Scient World Journal**, v. 1, p. 227 – 234, 2001.
- WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, A.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKING, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p. 276 – 289, 2003.
- WOLPERT, L.; BROCKERS, J.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYROWITZ, E. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**, Porto Alegre: Artmed editor, 484p, 2000.
- WOOD, I.S.& TRAYHURN, P. (Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v.89, 3-9, 2003.
- WRENZYCKI, C., LUCAS-HAHN, A., HERRMANN, D., LEMME, E., KORSawe, K., NIEMANN, H. *In vitro* production and nuclear transfer affect dosage compensation of the

- x-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.66, p.127–134, 2002.
- WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21 – 52, 2002.
- XIAO, X.Z.; ZUO, X.X.; DAVIS, A.A.; McMILLAN, D.R.; CURRY, B.B.; RICHARDSON, J.A.; BENJAMIN, I.J. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory response in mice. **The EMBO Journal**, v.18, p.5943-5952, 1999.
- YAO, N.; WAN, P-C.; HAO, Z-D.; GAO, F-F.; YANG, L.; CUI, M-S.; WU, Y.; LIU, J-H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S-M. Expression of interferon-tau RNAm in bovine embryos derived from different procedures. **Reproduction of Domestic Animal**, v.44, p.132-139, 2009.
- ZHENG, P., VASSENA, R., LATHAM, K.E. Effects of *in vitro* oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Human Reproduction**, v.13, p.361–371, 2007.

## **CAPÍTULO 2**

Publicado: *Zygote*, v.20, p.123 – 134, 2012, doi:10.1017/S0967199411000086

## **Desenvolvimento pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*: efeito da preparação do túnel e sexo**

Grazieli Marinheiro Machado<sup>2,3</sup>, Ester Siqueira Caixeta<sup>2,3</sup>, Carolina Madeira Lucci<sup>3</sup>, Rodolfo Rumpf<sup>2,3</sup>, Maurício Machaim Franco<sup>2,3</sup> e Margot Alves Nunes Dode<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Autor correspondente, <sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia; e <sup>3</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasil

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi comparar características morfológicas, cinética de desenvolvimento e expressão gênica de embriões produzidos *in vitro* (PIV) machos e fêmeas que foram cultivados até o dia (D)15 (fecundação = D0), utilizando tampão fosfato salina (PBS) e água Milli-Q (AMQ) para diluir o gel de agarose usado para construção dos túneis. No D11, os embriões (n=286) foram colocados em túneis de gel de agarose diluído em PBS e AMQ. Os embriões foram avaliados quanto à morfologia e ao tamanho no D11; D12.5; D14 e D15. Posteriormente, os embriões foram sexados e utilizados para análise da expressão gênica (*G6PD*, *GLUT1*, *GLUT3*, *PGK1*, *PLAC8*, *KRT8*, *HSF1* e *IFNT*). A porcentagem de embriões alongados no D15 foi maior ( $p < 0,05$ ) no gel de PBS (54%) do que no de AMQ (42%). Porém, os embriões produzidos em AMQ eram maiores ( $p < 0,05$ ) e apresentaram menor expressão de *GLUT1* ( $p = 0,08$ ) do que aqueles produzidos no PBS. Foi observada uma maior proporção de embriões D15 machos do que fêmeas em ambos os tratamentos AMQ (65% vs. 35%;  $p < 0,05$ ) e PBS (67% vs. 33%;  $p < 0,05$ ); entretanto o tamanho dos embriões não foi diferente entre os sexos. Além disso, as fêmeas no D15 apresentaram uma maior expressão de *G6PD* ( $p = 0,05$ ) e *KRT8* ( $p = 0,03$ ) do que os machos. Em conclusão, o diluente utilizado para construção dos túneis afetou o desenvolvimento pós-eclosão de embriões bovinos, e o uso de AMQ proporcionou uma melhor qualidade embrionária. Embriões machos e fêmeas cultivados do D11 ao D15, tanto no gel diluído com AMQ e com PBS, demonstraram desenvolvimento semelhante, mas diferenças na expressão de genes.

**Palavras-chaves:** bovino, cultivo embrionário, expressão gênica, gel de agarose e sexagem

## Abstract

The objective of the present study was to compare morphological characteristics, kinetics of development, and gene expression of male and female IVP embryos, cultured until D15 (fertilization = D0), using either phosphate buffer saline (PBS) or Milli-Q water (MQW) to dilute the agarose gel used for tunnel construction. On D11, embryos (n=286) were placed in agarose gel tunnels diluted in PBS and MQW. Embryos were evaluated for morphology and embryo size was recorded on D11, D12.5, D14, and D15. Then, embryos were sexed and used for gene expression analyses (*G6PD*, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *PGK1*, *PLAC8*, *KRT8*, *HSF1*, *IFNT*). Percentage of embryos elongated up to D15 of development was higher ( $P<0.05$ ) in the PBS (54%) than in the MQW (42%) gel. However, embryos produced in MQW were bigger ( $P<0.05$ ) and had a lower expression of *SLC2A1* ( $P=0.08$ ) than those cultured in PBS. There was a higher proportion of male than female embryos at D15 in both treatments, MQW (65 vs 35%,  $P<0.05$ ) and PBS (67 vs 33%,  $P<0.05$ ); however, embryo size was not significantly different between gender. Moreover, D15 female embryos had greater expression of *G6PD* ( $P=0.05$ ) and *KRT8* ( $P=0.03$ ) than male embryos. In conclusion, the diluent used to tunnel construction affected embryo development in the PHD system, and the use of MQW was the most indicated to evaluate embryo quality. Male and female embryos cultured from D11 to D15, either in an MQW or PBS agarose gel, had similar development, but different gene expression

**Keywords:** agarose gel, cattle, sexing, gene expression, embryo culture

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos consideráveis progressos alcançados nos últimos anos na tecnologia de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, sua eficiência ainda é baixa, com taxas de produção de blastocisto e de prenhez em torno de 40% (van Wagendonk-de Leeuw, 2006; Schmidt, 2007; Lonergan & Fair, 2008). Inúmeros estudos têm sido realizados visando melhorar a qualidade do embrião, avaliando diferentes fatores que podem influenciar no sucesso do desenvolvimento *in vitro* (Carolan et al., 1996; Hendricksen et al., 2000; Fukui et al., 2000; Khurana & Niemann, 2000a; de Oliveira et al., 2005; Corrêa et al., 2008). A maioria desses estudos utiliza como método de avaliação a taxa e a qualidade dos blastocistos no dia (D) 7 ou D8 de desenvolvimento, ou, mais raramente, a taxa de prenhez após a transferência de embriões D7 para receptoras. Entretanto, é bem conhecido que a avaliação morfológica não é um método ideal para estimar a capacidade do embrião para iniciar uma gestação. E, infelizmente, o uso da taxa de prenhez para avaliar a qualidade embrionária é muito onerosa para ser utilizada de forma rotineira. Portanto, o desenvolvimento de novos métodos de avaliação do potencial de desenvolvimento de embriões PIV, além da morfologia de embriões D7 e D8, seria muito útil para todos que trabalham nessa área.

Desta forma, o sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) de embriões bovinos surge como um procedimento alternativo que poderia potencialmente permitir o uso de uma ferramenta mais precisa para estimar o potencial de desenvolvimento dos embriões sem a necessidade de transferi-los para receptoras (Brandão et al., 2004; Vajta et al., 2004; Vejlsted et al., 2006). Com essa tecnologia, seria possível avaliar de forma mais acurada a qualidade de embriões produzidos não só por diferentes técnicas de reprodução assistida, mas também, aqueles submetidos a diferentes tratamentos e manipulações. Além do mais, o sistema PHD poderia contribuir para estudos na ciência básica ou na investigação de embriotoxicidade de

produtos utilizados em cultivo *in vitro*, tais como farmacêuticos, pesticidas, e outros químicos (Brandão et al., 2004).

Embora, o sistema de cultivo PHD de embriões bovinos seja um método interessante com grande potencial para ser utilizado como ferramenta em diferentes técnicas de reprodução assistida, poucos estudos têm sido realizados para melhor caracterizar, avaliar e otimizar o seu uso como um parâmetro de avaliação. Portanto, mais estudos necessitam ser realizados para determinar características básicas tais como o ambiente físico, químico e hormonal adequados que o embrião requer para se desenvolver *in vitro* por um período mais prolongado. Contudo, antes de se investir em pesquisas para desenvolver e estabelecer novos meios e/ou diferentes métodos de cultivo, uma melhor caracterização do sistema já estabelecido é necessária para que esse possa ser utilizado como ponto de partida para os próximos estudos.

Uma das etapas mais importantes do sistema PHD é a preparação dos túneis, onde os embriões ficam alojados durante o cultivo. Os túneis são preparados com gel de agarose, que consiste de uma rede de polissacarídeos compactos e que formam poros permitindo a passagem de solutos (Reece, 1996; Narayanan et al., 2006), de tal forma que os componentes do meio de cultivo possam entrar em contato com o embrião dentro do túnel. Entretanto, não se conhece se qualquer modificação do sistema, como por exemplo, os diluentes utilizados no preparo dos túneis de gel de agarose, podem prejudicar a cinética de desenvolvimento embrionário e o perfil molecular dos embriões cultivados por um longo período. Da mesma forma, também não se sabe se embriões com sexo diferentes apresentarão comportamentos distintos, caso ocorra modificações nesse sistema de cultivo.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do diluente utilizado na preparação de túneis de agarose e do sexo sobre as características morfológicas, cinética de desenvolvimento e expressão gênica de embriões cultivados até D15 no sistema PHD.



## 2. MATERIAL E METÓDOS

### 2.1. Produção *in vitro* (PIV) de embriões

Ao menos quando indicado, os químicos utilizados para produção dos meios da PIV foram adquiridos da *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

#### 2.1.1. Recuperação dos ovócitos

Os ovários foram coletados de vacas mestiças em abatedouro localizados a uma distância média de 40 Km do laboratório no município de Luziânia-GO e no Gama-DF. Logo após o abate, os ovários foram colocados em solução salina 0,9% (NaCl) aquecida (35-36°C), suplementada com estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100 µg/ml). Os ovócitos foram recuperados, aproximadamente, 3 h após a coleta dos ovários.

No laboratório, folículos de 3-8 mm foram puncionados com auxílio de escalpe de 19G, acoplado a um tubo de 15 ml, ligados ao sistema de vácuo com pressão regulada para obter um fluxo médio de 15 ml/min. Os tubos permaneceram em banho-maria (36°C) por aproximadamente 5 minutos até a formação do *pellet* que foi retirado com uma pipeta de *Pasteur* e colocado em uma placa de petri 100 X 20 mm contendo meio TCM 199 com sais de *Hank's* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Invitrogen*) e 250 mg/mL de sulfato de amicacina. Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram selecionados com auxílio de um estereomicroscópio (*Stemi SV – 6 – ZEISS*). Apenas ovócitos de qualidade I e II foram utilizados no experimento (Caixeta & Dode, 2008). O tempo entre o início da aspiração ao início da maturação foi de 60 minutos, no máximo.

### 2.1.2. Maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos

Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 20 a 35 para uma gota de 200 µl de meio de maturação – TCM 199 sais de *Earl's (Invitrogen)* suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (*Invitrogen*), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina), 250 mg/mL de sulfato de amicacina – em placa de petri 60 x 15 mm onde as gotas foram cobertas com óleo de silicone. Posteriormente, os ovócitos foram incubados por 22 – 24 horas a 39° C a 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima.

### 2.1.3. Fecundação *in vitro* (FIV)

Para a fecundação *in vitro* (FIV) foram descongeladas palhetas de sêmen bovino, em que as células espermáticas foram selecionadas pelo gradiente de *Percoll* (400 µ de *Percoll* 90% e 400 µ de *Percoll* 45% a 5000g/5min) (Machado et al., 2009). Os ovócitos foram colocados em meio de fecundação e co-incubados com espermatozóides à concentração final de 1x10<sup>6</sup> espermatozóides/mL por 20 h em estufa a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima. O meio de fecundação consistiu de TALP (Parrish et al., 1995) suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina.

### 2.1.4. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões

Para o cultivo *in vitro* (CIV), os embriões foram co-cultivados com células do cumulus utilizando meio fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (*Invitrogen*) (Holm et al, 1999). Os embriões foram avaliados no Dia (D) 2 para determinação da taxa de clivagem, e no D6 e D7 para taxa de blastocisto.

## 2.2. Sistema de desenvolvimento pós-eclosão (PHD) *in vitro*

O sistema de desenvolvimento pós-eclosão *in vitro* (PHD) consistiu na construção de túneis de gel de agarose coberto com meio de cultivo conforme descrito por Brandão et al. (2004). Esses túneis foram construídos (Figura 2.1) após a dissolução da agarose *low-melting-point* (Invitrogen) em dois diluentes diferentes na concentração final de 2,4%. No tratamento 1, a agarose foi diluída em solução de PBS, e no tratamento 2, ela foi diluída em água Milli Q (AMQ). Em ambos os tratamentos, 10% de SFB foram adicionados após a dissolução da agarose. Os túneis foram preparados pelo menos um dia antes de serem utilizados. As placas com os túneis imersos em meio PHD (Brandão et al., 2004) foram mantidos em incubadoras a 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e ante de sua utilização o meio SOF PHD foi substituído por outro.

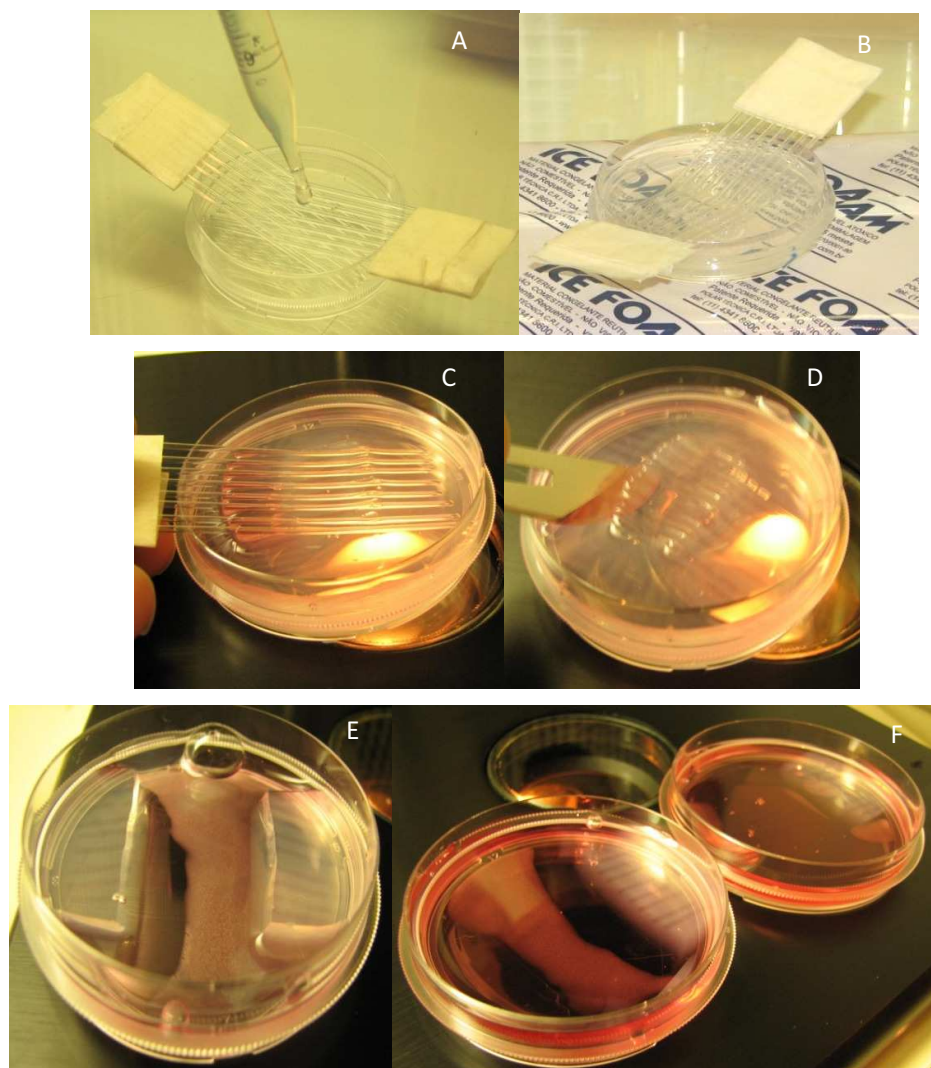


Figura 2.1. Etapas de construção dos túneis com gel de agarose *low-melting-point* para o cultivo de embriões *in vitro* até dia 14 de desenvolvimento. A – Disposição dos pentes construídos com capilares de vidro em placas de petri 60x15mm e introdução da agarose diluída. B – Polimerização da agarose formando o gel. C – Retirada dos pentes para formação dos túneis. D – Corte no meio do gel para formar a entrada dos túneis onde serão inseridos os embriões D11. E – Duas partes do conjunto de túneis após a retirada da região do meio. F – Cada parte com 8 túneis separadas por placa e imersa em meio SOF PHD.

Para o cultivo dos embriões no sistema PHD, inicialmente, os embriões degenerados após a avaliação no D8 foram retirados da gota de cultivo embrionário. No D9, os embriões foram novamente avaliados e permaneceram na gota somente aqueles que sofreram eclosão (Figura 2.2 A). Nesse dia, logo após a retirada dos embriões não eclodidos, foi acrescido à gota 200  $\mu$ l do meio PHD, de forma que o volume final da gota foi de 400  $\mu$ l (1:1 de SOF e SOF PHD).

No D11, os embriões eclodidos foram avaliados e aqueles com sinais de degeneração visível e com diâmetros inferiores a 0,5 mm foram descartados. Os embriões  $\geq$  0,5 mm com trofoblastos claros e células da massa celular interna compacta foram transferidos da gota de cultivo para a placa com os túneis de gel de agarose (Figura 2.2 B e 2.2 C). Eles foram colocados no interior dos túneis com auxílio de uma pipeta Pasteur com a ponta arredondada onde permaneceram até o D15 de cultivo (Figura 2D). O cultivo foi realizado em incubadoras a 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar.

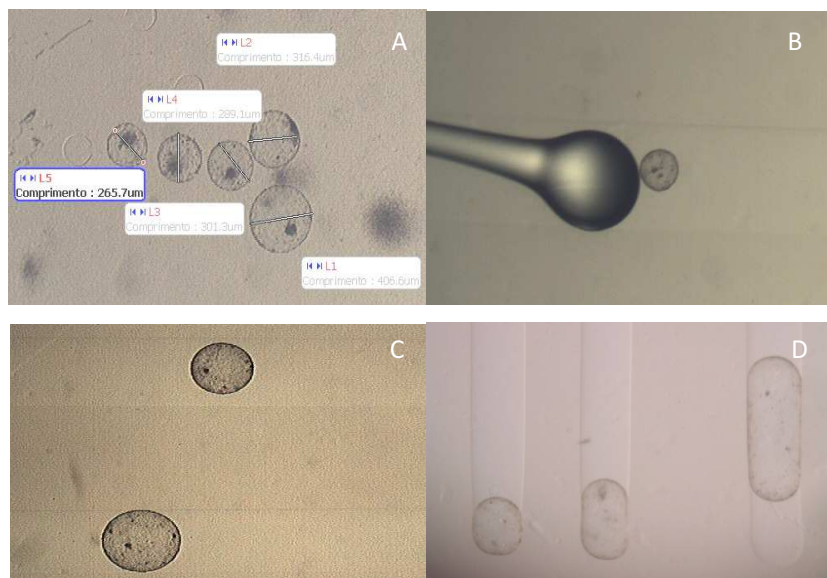


Figura 2.2. Manipulação dos embriões para serem introduzidos nos túneis e embriões cultivados do sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) até D15. A – Mensuração e avaliação dos embriões do D9. B – Introdução de embriões D11 para o interior dos túneis com a ponta de uma pipeta Pasteur arredondada. C – Disposição dos embriões D11 nos túneis de gel de agarose. D – Alongamento dos embriões no D15 no sistema PHD.

### 2.3. Avaliação morfológica e cinética de desenvolvimento dos embriões pós-eclosão

As avaliações da morfologia e do desenvolvimento embrionário dos embriões *in vitro* cultivados no sistema PHD foram realizadas nos dias 11, 12.5, 14 e 15 de cultivo. Durante essas avaliações foram feitas mensurações individuais dos embriões com o auxílio de uma ocular graduada acoplada ao programa *Motic Images Plus 2.0*. Foram observadas as seguintes características: 1) embriões com sinais de degeneração e que reduziram de tamanho durante os períodos observados; 2) embriões que alongaram e reduziram de tamanho no dia posterior; e 3) embriões que mantinham um crescimento progressivo durante os dias avaliados. No D15, os embriões que apresentaram crescimento progressivo e alongado foram removidos do túnel de gel de agarose com auxílio de um pipetador de 1000  $\mu$ L. Eles foram armazenados em microtubos (0,2  $\mu$ L) na solução de *Trizol Reagent (Invitrogen)* e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento para determinação do sexo e expressão gênica.

### 2.4. Extração de DNA, RNA e síntese de cDNA

Embriões alongados no D15 que foram armazenados individualmente foram utilizados para a extração de RNA total e DNA genômico utilizando a técnica do *Trizol Reagent (Invitrogen)*. O DNA foi utilizado para determinação do sexo do embrião pela técnica de PCR e o RNA total utilizado para determinação da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR). Em cada tubo contendo um embrião adicionaram-se 50  $\mu$ l de *Trizol Reagent (Invitrogen)* e 12,5  $\mu$ g de glicogênio. Então, o DNA genômico e o RNA total foram extraídos de acordo as recomendações do fabricante, com pequenas modificações.

Para a expressão gênica o RNA total de cada embrião foi agrupado para formação de três a quatro *pools* compostos de três embriões distribuídos de acordo com sexo e tamanho. Os *pools* foram tratados com 1 U DNase I (*Invitrogen*) e imediatamente foi realizado a transcrição reversa (RT) com SuperScript III (200 U/ $\mu$ l; *Invitrogen*) e *primers* oligo (dT<sub>12-18</sub>) (*Invitrogen*). A reação de RT foi realizada a  $42^{\circ}\text{C}$  por 52 minutos, com uma incubação final a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para inativação da enzima, em um termociclador PTC-100 (*MJ Research, Watertown, MA*).

## 2.5. Determinação do sexo

A determinação do sexo foi realizada com o DNA extraído após protocolo de *Trizol Reagent (Invitrogen)*. Para o PCR, utilizaram-se dois pares de *primers* diferentes. O primeiro par de *primers* era específico para região do cromossomo Y, enquanto o segundo foi específico para um gene autossômico bovino (Tabela 2.1).

O DNA genômico de um macho e uma fêmea bovinos foi utilizado como amostras controles para os cromossomo X e Y. O PCR foi realizado pela adição de mix PCR contendo 20 nM de cada par dos *primers*, 200 µM de dNTP,, tampão PCR 1X e 1U Taq Polimerase Platimun (*Invitrogen*) em cada amostra, com volume final de 30 µL. O programa do PCR utilizado consistiu de 40 ciclos de 94°C por 20s, 57°C por 30s e 72°C por 30s, seguido pela extensão final de 72°C por 10 min. A sexagem foi realizada em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando dois *amplicons* foram detectados o embrião foi considerado macho, enquanto a detecção de apenas um *amplicon* foi fêmea (Figura 2.3).

Tabela 2.1. Sequências de *primers* utilizados para determinação do sexo em embriões (F: *forward*; R: *reverse*) e tamanhos em pares de base (pb), dos fragmentos amplificados.

Gene	Sequência de <i>primers</i>	Tamanho do fragmento	Reference
F bSRY	5'-CCTCCCCTTCAAACGCCCGGAATCATT -3'	210 pb	Bondioli et al. 1989
R bSRY	5'-GGCCATAGTCAGGATCTT-3'		
F Autossômico	5'-CCCATCACCATCTTCCAGG-3'	280 pb	Ellis et al. 1988
R Autossômico	5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'		

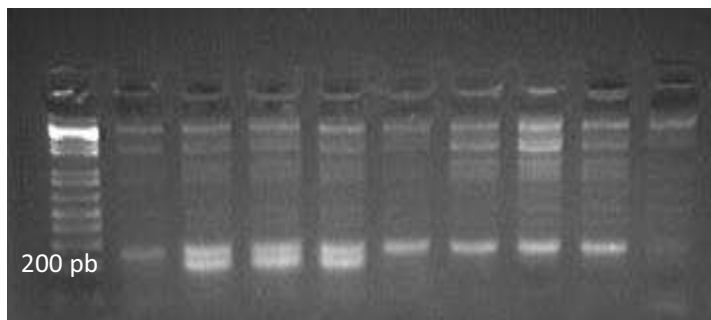


Figura 2.3. A amplificação dos produtos do PCR em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando teve aplicação dos dois *primers* o embrião foi considerado macho (seta), enquanto a detecção de um *primer* foi um embrião fêmea.

## 2.6. Expressão gênica

A abundância relativa dos genes foi determinada pela técnica de qPCR em que se utilizou o “kit” de amplificação *Power Syber Green Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). As reações de amplificação consistiram de um volume final de 25  $\mu$ l e as condições foram: 10 min. a 95°C seguidos de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 15 s e a temperatura de anelamento de acordo com os *primers* utilizado (Tabela 2.2), seguido de curva de dissociação padrão. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente. As reações para determinar a eficiência de amplificação de cada *primer* que foi superior a > 90%, foi determinada pela curva padrão.

Para determinar qual o gene constitutivo deveria ser usado para normalização o programa *gNorm* (Microsoft) foi utilizado (Vandesompele et al., 2002). Apesar dos resultados indicarem que a *peptidylprolyl isomerase A* (*PPIA*) foi o controle endógeno mais estável do que o *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) e a histona (*H2A*), a média dos três foi utilizada para normalização.



Tabela 2.2. Informação dos *primers* específicos utilizados para amplificação dos genes no PCR tempo real (qPCR).

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento	Concentração do primer	Número de acesso do GenBank/referência
<i>PPIA</i>	F 5'GCCATGGAGCGCTTTGG 3' R 5'CCACAGTCAGCAATGGTGATCT 3'	65 pb	60 °C	300 nM	BC-105173
<i>GAPDH</i>	F 5'GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA 3' R 5'CCCTCCACGATGCCAAAGT 3'	119 pb	62 °C	150nM	XM_001252511
<i>H2A</i>	F 5'GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG 3' R 5'TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC 3'	104 pb	60 °C	350nM	XM_003582302
<i>KRT8</i>	F 5'TGTGAAGAAGATTGAGACCCGCGA 3' R 5'AAACCTCAGGTCTCCTGTGCAGAT 3'	160 pb	60 °C	300nM	X12877/El-Sayed et al., 2006
<i>PLAC8</i>	F 5'GACTGGCAGACTGGCATCTT 3' R 5'CTCATGGCGACACTTGATCC 3'	140 pb	60 °C	300nM	NM_016619/El-Sayed et al., 2006
<i>HSF1</i>	F 5'AAGCACAGCAACATGGCTAGCTTC 3' R 5'AGTGGACACACTGGTCACTTTCCT 3'	189 pb	60 °C	300nM	EU914814.1
<i>PGK1</i>	F 5'TGCAGCTGAATTGCCAAGATGTCG 3' R 5'TTGATGCTTGGAACAGCAGCCTTG 3'	161 pb	60 °C	300nM	BT02160.1
<i>SLC2A1</i>	F 5'CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC 3' R 5'CAAAATAGCGACACGACAGT 3'	258 pb	59 °C	300nM	BT029806
<i>SLC2A3</i>	F 5'ACTCTTCACCTGATTGGCCTTGGA 3' R 5'GGCCAATTTCAAAGAAGGCCACGA 3'	145 pb	62 °C	300nM	NM_174603.3
<i>IFNT</i>	F 5'GCAGATGGTGATTGCAGCCATGAA 3' R 5'CTTTGGCGCTCAGCTTCTTCACA 3'	194 pb	60 °C	150nM	AF238612
<i>G6PD</i>	F 5'GTTCTTCAACCCCGAGGAGTC 3' R 5'ATGTGGTGGAGCAGTGGAGTG 3'	183 pb	60 °C	350nM	NM_001244135.1

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão da média dos genes constitutivos. A expressão relativa de cada gene alvo nos embriões dos diferentes grupos foi calculada utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita (Figura 2.4) por Pfaffl (2001).

$$\text{Razão} = \frac{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}{(E_{\text{alvo}})} \div \frac{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}{(E_{\text{ref}})}$$

Figura 2.4. Fórmula de Pfaffl (2001) modificada para correção da eficiência de amplificação dos genes.

## 2.7. Análise estatística

A porcentagem de embriões alongados nos túneis construídos utilizando solução de PBS e AMQ e a proporção de embriões alongados machos e fêmeas foi avaliada pelo teste  $\chi^2$ . Os dados do tamanho dos embriões entre o D11 e D15 não tiveram distribuição normal mesmo após a transformação logarítmica e raiz quadrada e, portanto, foram avaliados pelo teste de *Mann-Whitney*. Os resultados da expressão gênica foram analisados utilizando o test t ou teste de *Mann-Whitney* para aqueles que apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa Prophet Program, versão 5.0, 1997. O valor de significância está foi inserido no resultado.

### 3. RESULTADOS

Um total de 2.993 ovócitos foi utilizado para produção de embriões *in vitro*. A taxa de blastocisto foi avaliada em D7 (37%, 1.077/2.933) e D8 (41%, 1.216/2.933) pós-inseminação (pi). A taxa de eclosão foi avaliada no D9 (72%, 873/1.216) e os embriões foram mensurados no D11. Os embriões que apresentaram diâmetros  $\geq 0,5$  mm (39,5%; 345/837) foram aleatoriamente distribuídos entre os dois tratamentos e foram cultivados *in vitro* até D15. Dos 345 embriões no D11 com tamanho mínimo necessário para continuar seu crescimento *in vitro* no sistema PHD, 286 (84%) foram colocados com sucesso no interior dos túneis. Desses, 154 (54%) e 132 (46%) embriões foram colocados nos túneis em que a agarose foi dissolvida em AMQ e PBS, respectivamente. A diferença entre o número de embriões avaliados no D11 e os que foram colocados nos túneis foi devido às anormalidades morfológicas de alguns embriões (trofoblasto escuros e massa celular indefinida), e o colapso de alguns embriões que ocorreu quando foram removidos da gota de cultura e introduzidos nos túneis.

O comportamento geral dos embriões cultivados nos dois tipos de sistema PHD está representado na Figura 2.5. A porcentagem de embriões alongados no D15 foi maior no PBS do que na AMQ (P=0,05). Todavia, a porcentagem de embriões que cresceram, mas regrediram em D15, e aqueles que degeneraram foram semelhantes para os dois tipos de gel.

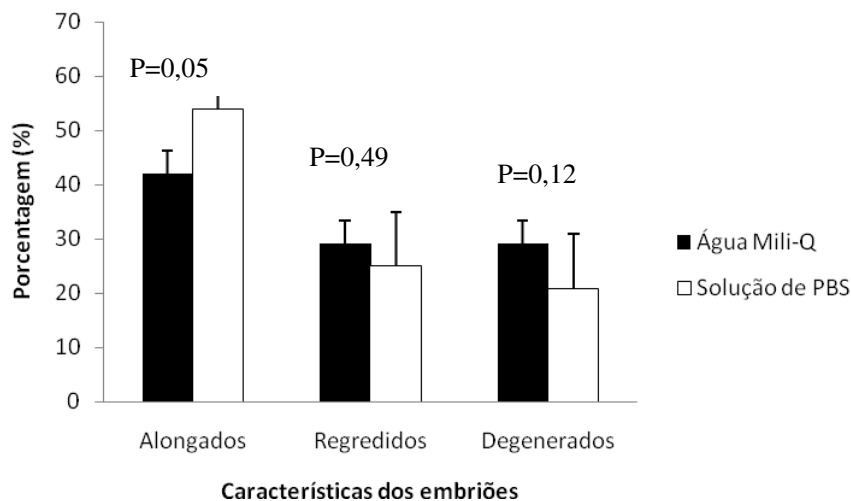


Figura 2.5. Porcentagem de embriões alongados, regredidos e degenerados durante o sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) que foram observados entre o D11 e D15 de desenvolvimento.

Apesar disso, o desenvolvimento embrionário foi maior nos embriões produzidos em túneis com gel de agarose diluído em AMQ quando comparado com o PBS (Tabela 2.3). Isso foi observado não somente com os tamanhos dos embriões em D15, mas em todo o crescimento durante o cultivo, o qual foi calculado pela subtração do tamanho final (D15) e do comprimento inicial (D11) de cada embrião.

Tabela 2.3. Média do tamanho (mm) dos embriões bovinos alongados (média  $\pm$  EP) nos dia (D) 11, D12,5, D14 e D15 de cultivo no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli-Q (AMQ) e solução fosfato salina (PBS).

Diluentes da agarose	N	Média do tamanho dos embriões (mm)				
		D 11	D 12.5	D 14	D15	*D15– D11
PBS	132	0,70 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03	1,74 $\pm$ 0,10	2,37 $\pm$ 0,13	1,36 $\pm$ 0,13
AMQ	154	0,70 $\pm$ 0,02	1,05 $\pm$ 0,05	2,53 $\pm$ 0,23	3,03 $\pm$ 0,23	1,76 $\pm$ 0,38
		P=0,55	P=0,10	P=0,27	P=0,08	P=0,06

\*Diferenças entre o comprimento final do embrião em D15 e o tamanho inicial em D11.

Para avaliar se o tamanho inicial do embrião em D11 afetou seu desenvolvimento nos diferentes tratamentos do sistema PHD, os embriões foram separados e,

dois grupos de acordo com seu tamanho em D11 (Tabela 2.4). Quando o desenvolvimento dos embriões de uma mesma categoria de tamanho foi comparado entre os dois tipos de gel, foi observado que os embriões menores tiveram padrão similar de desenvolvimento em ambos os tratamentos. Porém, o grupo com embriões maiores apresentaram um maior crescimento quando cultivados em AMQ quando comparado com PBS.

Tabela 2.4. Média do tamanho (mm) dos embriões bovinos alongados (média  $\pm$  EP) nos dia (D) 11, D12,5, D14 e D15 de cultivo no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli-Q (AMQ) e solução fosfato salina (PBS).

Diluentes de agarose	da N	Categoria de tamanho	Média dos tamanhos dos embriões (mm)				
			D 11	D 12,5	D 14	D15	*D15 – D11
PBS	33	0,5 – 0,69 mm	0,59 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,12	2,48 $\pm$ 0,16	1,89 $\pm$ 0,16
AMQ	35	0,5 – 0,69 mm	0,59 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,06	1,73 $\pm$ 0,16	2,52 $\pm$ 0,23	1,93 $\pm$ 0,23
			P=0,91	P=0,96	P=0,36	P=0,56	P=0,55
PBS	38	0,7 – 1 mm	0,79 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03	1,76 $\pm$ 0,15	2,29 $\pm$ 0,21	1,50 $\pm$ 0,21
AMQ	30	0,7 – 1 mm	0,82 $\pm$ 0,23	1,22 $\pm$ 0,08	2,53 $\pm$ 0,23	3,62 $\pm$ 0,39	2,80 $\pm$ 0,38
			P=0,75	P=0,002	P=0,01	P=0,001	P=0,001

\*Diferenças entre o comprimento final do embrião em D15 e o tamanho inicial em D11.

Com relação à avaliação dos sexos, observou-se uma maior proporção ( $P < 0,05$ ) de embriões machos do que de embriões fêmeas no D15 de desenvolvimento nos dois tipos de gel, PBS (67% machos,  $n=39/58$  e 33% fêmeas,  $n=19/58$ ) e AMQ (65% machos,  $n=39/60$  e 35% fêmeas,  $n=21/60$ ). Embora uma maior proporção de machos tenha se desenvolvido no sistema PHD, a morfologia, tamanho final e padrão de alongamento dos embriões nesse sistema de cultivo não foram afetados pelo sexo (Tabela 2.5). Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos quando o sexo foi considerado.

Tabela 2.5. Média do tamanho (mm) dos embriões machos e fêmeas (média  $\pm$  EP) cultivados no sistema pós-eclosão (PHD) utilizando gel de agarose diluído em água Milli-Q (AMQ) e solução de fosfatos salina (PBS) nos dias (D) 11, D12.5, D14 e D15 de cultivo.

Diluentes da agarose	Sexo	Média dos tamanhos dos embriões (mm)				
		D 11	D 12,5	D 14	D15	*D15- D11
PBS	Macho (39/58)	0,69 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,05	1,74 $\pm$ 0,15	2,42 $\pm$ 0,21	1,73 $\pm$ 0,20
PBS	Fêmea (19/58)	0,67 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,04	1,45 $\pm$ 0,15	1,99 $\pm$ 0,17	1,33 $\pm$ 0,16
		P=0,80	P=0,61	P=0,26	P=0,39	P=0,46
AMQ	Macho (39/60)	0,70 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,07	2,00 $\pm$ 0,19	2,95 $\pm$ 0,31	2,24 $\pm$ 0,29
AMQ	Fêmea (21/60)	0,67 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,09	1,92 $\pm$ 0,25	2,75 $\pm$ 0,37	2,08 $\pm$ 0,36
		P=0,56	P=0,49	P=0,66	P=0,73	P=0,76

\*Diferenças entre o comprimento final do embrião em D15 e o inicial em D11.

Para avaliar o efeito dos diluentes utilizados para dissolver a agarose na qualidade dos embriões foi realizado um perfil molecular, em que a expressão de oito genes foi analisada (Figura 2.6). Somente o gene *SLC2A1* apresentou com menos expressão (P=0,08) em embriões D15 cultivados em túneis preparados com AMQ quando comparado com aqueles cultivados em túneis preparados com PBS.

A expressão desses mesmos genes foi comparada entre embriões machos e fêmeas independente do tratamento utilizado. Nesta análise foi observado que a abundância relativa dos genes *G6PD* (P=0,05) e *KRT8* (P=0,03) foi maior em embriões fêmeas do que nos machos no D15 (Figura 2.7).

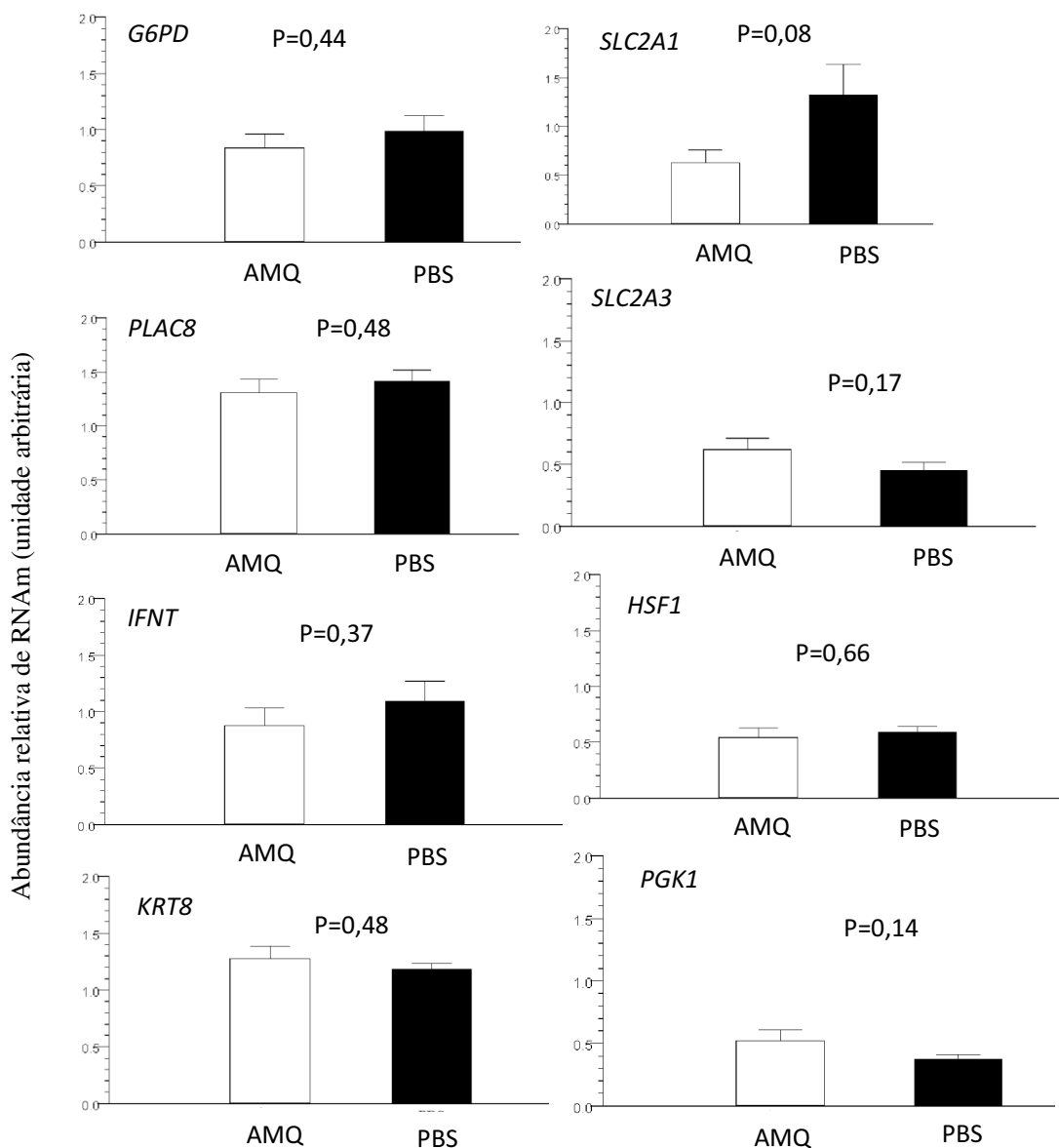


Figura 2.6. Abundância relativa de RNAm dos genes (*G6PD*, *SLCS2A1*, *PLAC8*, *SLC2A3*, *IFNT*, *HSF1*, *KRT8*, *PGK1*) determinados pela método de qPCR de embriões bovinos cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose diluído em água Milli Q (AMQ) e solução fosfato salina (PBS) no dia 15 de desenvolvimento em que foram formados 7 pools com 3 em cada. Os dados são referentes à média  $\pm$  EP que foram normalizados com a média dos genes *PPIA*, *GAPDH* e *H2A*, com resultados expressos em relação à amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001).

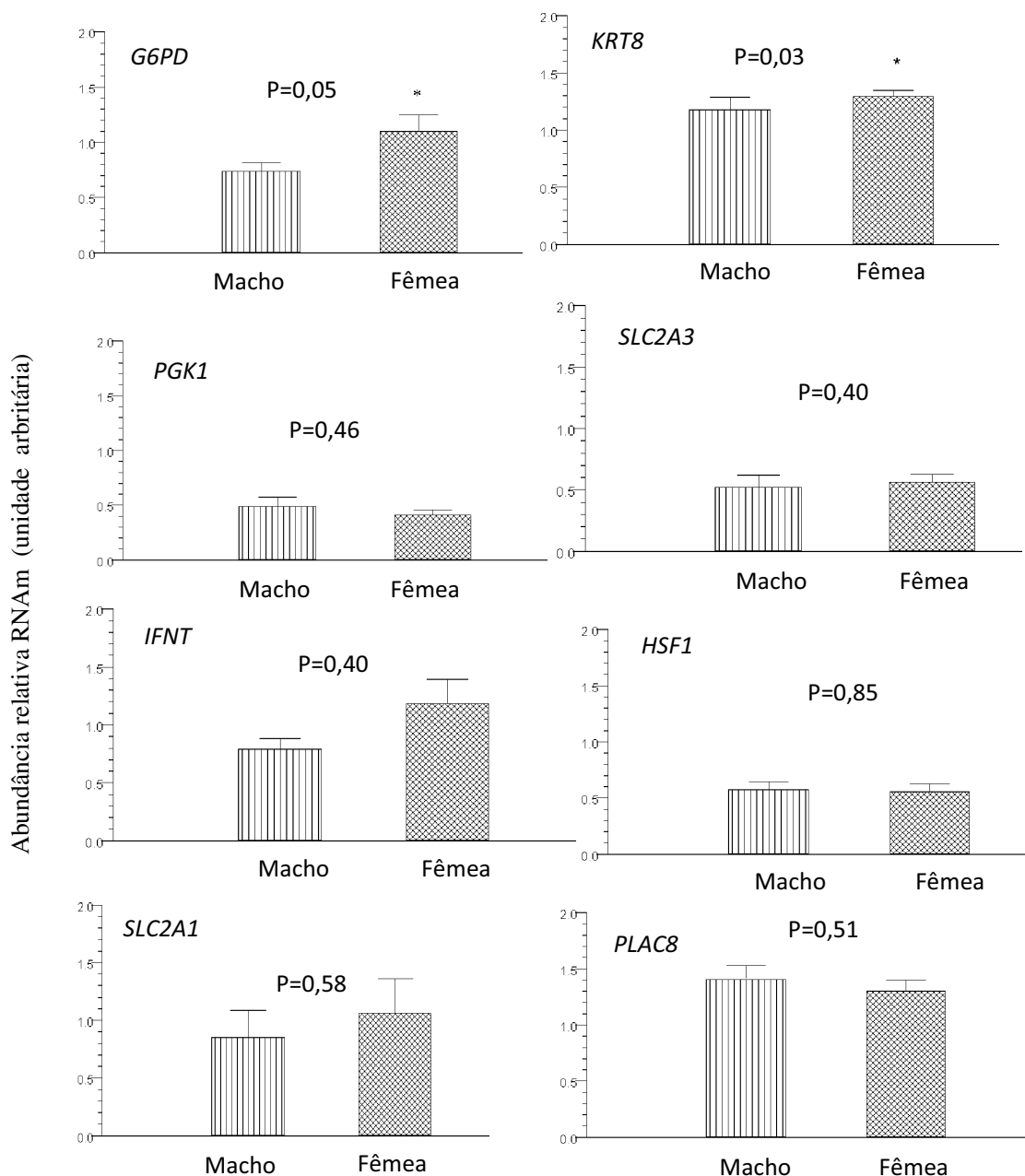


Figura 2.7. Abundância relativa de RNAm dos genes (*G6PD*, *SLCS2A1*, *PLAC8*, *SLC2A3*, *IFNT*, *HSF1*, *KRT8*, *PGK1*) determinados pela método de qPCR de embriões bovinos machos e fêmeas no dia 15 de desenvolvimento cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose em que foram formados 4 pools com 3 embriões machos e 3 pools com 3 embriões fêmeas. Os dados são referentes à média  $\pm$  EP que foram normalizados com a média dos genes *PPIA*, *GAPDH* e *H2A*, com resultados expressos em relação à amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001).



#### 4. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram avaliados o desenvolvimento e a expressão de genes de embriões machos e fêmeas cultivados até D15 no sistema PHD utilizando túneis construídos com PBS e AMQ. Os resultados mostraram que os diluentes utilizados para dissolver a agarose, mas não o sexo dos embriões afetou o desenvolvimento embrionário. E que o crescimento do embrião nos dois tipos de túneis foi influenciado pelo tamanho inicial. Além disso, apesar de embriões machos e fêmeas apresentarem a mesma cinética de desenvolvimento, eles apresentaram diferenças na expressão de genes.

Em relação ao desenvolvimento embrionário, pode-se notar que a porcentagem de embriões que alongaram no túnel até D15 foi maior do que o relatado por Brandão et al. (2004). Além disso, a média do tamanho dos embriões cultivados em túneis preparados tanto com PBS como AMQ foi semelhante ao tamanho dos embriões PIV, que foram transferidos em D7 para receptoras sincronizadas e recuperada em D12 (Lazzari et al., 2002) e em D14 (Fischer-Brown et al., 2004). Esses resultados sugerem que o sistema utilizado foi capaz de proporcionar o crescimento e alongamento de embriões produzidos *in vitro*.

Apesar de mais de 40% dos embriões que foram colocados nos túneis em D11 mostrarem crescimento contínuo e alongamento até D15, somente 32% dos blastocistos em D7 foram capazes de atingir o tamanho mínimo com morfologia normal para continuar o seu desenvolvimento no cultivo PHD. Uma alta taxa de perda embrionária entre D8 e D11 foi também relatado por Brandão et al. (2004). Esses resultados sugerem que esse é um período crítico para o desenvolvimento embrionário. Além do mais, há relatos que embriões pós-eclosão podem ser mais suscetíveis ao estresse ambiental devido ao aumento no seu metabolismo, síntese de proteínas e de demanda energética (Tiffin et al., 1991; Khurana & Niemann, 2000b; Garner, 2008).

A porcentagem de embriões que cresceram foi maior no túnel de PBS do que no de AMQ, porém o aumento de tamanho durante o desenvolvimento foi mais pronunciado em embriões cultivados em gel com AMQ. Portanto, este gel parece ser mais adequado para indicar a qualidade dos embriões, pois permite um maior aumento do tamanho que o gel de PBS. Esta hipótese está também baseada em outros estudos, os quais reportaram que esta característica morfológica em embriões D14 pode ser um bom indicador de qualidade embrionária, pois está associada ao estabelecimento da gestação (Fisher-Brown et al., 2004). Além disso, o tamanho dos embriões de D14 tem sido positivamente associado com a secreção de *IFNT* (Block et al., 2007), sugerindo que quanto mais desenvolvido o embrião mais capaz de prevenir a regressão inicial de corpo lúteo e manter a prenhez.

Considerando que Brandão et al. (2004) determinaram que o tamanho do embrião em D11 pode ser utilizado para estimar sua qualidade e seu desenvolvimento subsequente, o presente estudo investigou se o tamanho do embrião no D11 poderia afetar seu crescimento no sistema PHD utilizando diferentes diluentes para agarose. Para isso, os embriões foram separados em duas categorias de acordo com seu tamanho. Observou-se que o tamanho final e o padrão de alongamento foi similar entre os géis para os menores embriões. Porém, os embriões maiores tiveram uma maior taxa de desenvolvimento durante o período de cultivo no túnel com AMQ. Considerando que o estágio de alongamento é um indicador de qualidade e viabilidade embrionária, como proposto por Fisher-Brown et al. (2004) e Clemente et al. (2009), foi levantada a hipótese de que o gel de AMQ pode proporcionar um melhor indicativo dos embriões com maior potencial de desenvolvimento.

Além de testar a composição de gel para construção dos túneis, este estudo também focou na comparação de características morfológicas e da cinética de desenvolvimento de embriões machos e fêmeas. A determinação do sexo no D15 demonstrou um desvio significativo na proporção dos sexos, em que a maioria dos embriões era macho. Um desbalanço mais pronunciado em favor dos machos em embriões de D16 cultivados no sistema PHD foi observado por Brandão et al. (2004). Em contraste, quando embriões PIV foram mantidos em úteros de receptoras do D7 ao D16, apenas uma tendência de ter mais embriões machos foi observada por Bertolini et al. (2002). A diferença dos sexos dos embriões PIV pode ser atribuída a vários fatores, entre eles a concentração de glicose no meio (Gutiérrez-Adán et al., 2001), o que poderia explicar a baixa porcentagem de embriões fêmeas

no D15. Entretanto, quando os embriões de D9 que não estavam eclodidos foram sexados observou-se que de todos os embriões descartados, 60% eram fêmeas (dados não publicados). Como o meio PHD que contém alta concentração de glicose só foi adicionado no cultivo no D9, pode-se supor que o menor desenvolvimento dos embriões fêmeas não foi devido a alta concentração de glicose no meio PHD. É possível que a maior sensibilidade das fêmeas ao ambiente de cultivo possa ser devido ao processo de inativação do cromossomo X, o qual deve ter ocorrido antes dos embriões serem colocados no sistema PHD, conforme relatado por vários autores (Latham, 1996; Gutiérrez-Adán et al., 2001; Okamoto et al., 2004; Ferreira et al., 2010). Portanto, é bem possível que a diferença na proporção de embriões machos e fêmeas observadas no D15 já possa ter ocorrido no D11, antes dos embriões serem introduzidos no túnel.

Embora uma menor porcentagem de fêmeas tenha atingido o tamanho mínimo para serem colocadas no túnel, aquelas que foram colocadas mostraram padrão de desenvolvimento similar ao dos machos. Devido ao período de maior perda embrionária ser entre D7 e D11, além das fêmeas serem mais sensíveis ao ambiente de cultivo embrionário, aquelas que sobreviveram e atingiram o tamanho em D11 passaram por um processo de seleção robusto e mostraram-se similares aos machos.

A expressão gênica de embriões bovinos é constantemente utilizada para avaliar a qualidade de embriões (Rizos et al., 2002; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Lonergan et al., 2006). Portanto, neste estudo essa ferramenta foi utilizada para verificar a qualidade dos embriões D15 produzidos pelo sistema PHD e para avaliar as diferenças entre o sexo dos embriões. Os genes escolhidos estão relacionados ao desenvolvimento da placenta, estresse térmico, reconhecimento materno da gestação e metabolismo da glicose.

Quando os diluentes da agarose foram comparados, os níveis de transcritos do gene *SLC2A1* ser mais abundante ( $p=0,08$ ) nos embriões alongados no D15 cultivados no gel com agarose, diluído em PBS. Diferentes grupos de pesquisadores têm estudado o padrão da expressão dos genes transportadores de glicose, durante o período pré-implantação de embriões bovinos, mas os resultados são variáveis quando embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* são comparados (Lazzari et al., 2002; Harvey et al., 2004; Balasubramanian et al., 2007). No presente estudo, o *SLC2A1* e não o *SLC2A3* foi mais expresso nos embriões que

criaram no gel de PBS. Essa diferença de expressão sugere que o diluente utilizado pode afetar a captação de glicose e o metabolismo do embrião, mas o motivo para isso ainda não está claro. É importante salientar que o *SLC2A1* possui um papel intercelular ao invés do transporte apical o que significa que sua expressão não implica necessariamente em um papel dominante na captação embrionária a partir do meio ambiente como o *SLC2A3* (Augustin et al., 2001).

Existe um consenso de que embriões machos PIV desenvolvem-se mais rapidamente do que as fêmeas. Isso pode ser atribuído a captura de glicose e seu metabolismo (Gutiérrez-Adán et al., 2001; Rheingantz et al., 2004; Morton et al., 2007). No presente estudo, não foi observada diferença na expressão de genes relacionados aos transportadores de glicose (*SLC2A1* e *SLC2A3*) entre embriões machos e fêmeas. Bertolini et al. (2002) encontraram que embriões machos no D16 tiveram maior expressão de transcritos para *SLC2A 1* e *SLC2A3* que nas fêmeas. No entanto, eles também demonstraram que a expressão desses genes estava relacionada com o desenvolvimento embrionário, analisado pelo seu tamanho. Essas observações podem explicar os resultados, que mostraram que tanto os embriões machos quanto as fêmeas de D15 tiveram taxa de desenvolvimento e tamanho similares.

Mesmo que o transporte e captura de glicose façam parte do complexo metabolismo da glicose, existem outros fatores envolvidos que podem diferir com o sexo do embrião, tais como as enzimas ligadas ao cromossomo X (Tiffin et al., 1991; De La Fuente et al., 1999). A *G6PD* e a *PGKI* são algumas enzimas relacionadas ao metabolismo energético ligadas ao cromossomo X. No presente estudo, uma maior expressão do gene *G6PD* foi detectada em embriões fêmea D15 do que nos machos. Resultados de vários experimentos demonstram que embriões fêmeas *in vitro* no D7 apresentam maior expressão que nos machos (De La Fuente et al., 1999; Gutierrez-Adán et al., 2000). Desta forma pode-se especular que o ambiente *in vitro* pode afetar o processo de inativação do cromossomo X modificando o padrão de expressão do gene *G6PD* (Lonergan et al., 2003; Balasubramanian et al., 2007; Morton et al., 2007). No entanto, considerando a importância desse processo para a sobrevivência de embriões fêmeas, acredita-se que se alguma alteração tivesse ocorrido, os embriões fêmeas não conseguiriam se desenvolver até D15 e portanto teriam parado o seu desenvolvimento em fases anteriores. Além disso, não foram observadas alterações no gene

*PGK1* que também é um gene ligado ao cromossomo X. Portanto, pode-se supor que o aumento na expressão do gene *G6PD* observado nesse trabalho pode estar relacionada mais com a viabilidade dos embriões em respostas às condições adversas do meio do que a problemas na inativação do cromossomo X.

Essa hipótese é reforçada pela maior expressão, nos embriões fêmeas D15 do que nos machos, do gene *KRT8* que está relacionado com a placentação e subsequente implatação. A proteína *KRT8* é crítica para o desenvolvimento pós-eclosão de embriões bovinos (Maddox-Hyttel et al., 2003) e sua deficiência está relacionada com a morte embrionária em camundongos (Jaquemar et al., 2003). A baixa expressão desse gene também foi relatada em embriões oriundos de transferência nuclear (TN) quando comparados com embriões PIV (Pfister-Genskow et al., 2005).

Em conclusão, nota-se que o diluente de agarose utilizado para construção dos túneis influenciou o desenvolvimento embrionário no sistema PHD e que o uso da AMQ foi mais adequado para avaliar a qualidade do embrião. Além disso, as diferenças encontradas na expressão de alguns genes avaliados foram mais fortemente relacionadas ao sexo do que o diluente utilizado na agarose para preparação dos túneis.

## 5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v.60, p. 370–376, 2001.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; MOHANA KUMAR. B.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y; RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.265–275, 2007.
- BERTOLINI, M.; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B.. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v.63, p. 318–328, 2002.
- BLOCK, J.; FISCHER-BROWN, A.E.; RODINA, T.M.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to Day 14 of gestation. **Theriogenology**, v. 68, p.153–161, 2007.
- BONDIOLLI, K.R.; ELLIS, S.B.; PRYOR, J.H.; WILLIAMS, M.W.; HARPOLD, M.M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**. v.41, 95–104, 1989.
- BRANDÃO, D.O.; HYTTEL, P.; LOVENDAHL, P.; RUMPF, R.; STRINGFELLOW, D.; CALLESEN, H. Post-hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 2048–2055, 2004.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.K.; MERMILLOD, P. In vitro production of bovine embryos using individual oocytes. **Molecular, Reproduction and Development**., v. 45, p. 145–150, 1996.
- CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or a indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, p.507–517, 2009.

- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal. Reproduction and Science**, v.104, 132–142, 2008.
- ELLIS, S.B.; BONDIOLLI, K.W.; WILLIAMS, M.E. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.29, 242, 1988.
- DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (*Xist*) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p.769–775, 1999.
- FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.O.; CARVALHO, J. O.; RUMPF, R.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Allele-specific expression of the MAOA gene and X chromosome inactivation in *in vitro* produced bovine embryo. **Molecular, Reproduction and Development**, v.77, p.615–621. 2010.
- FISCHER-BROWN, A.E.; LINDSEY, B.R.; IRELAND, F.A.; NORTHEY, D.L.; MONSON, R.L.; CLARK, S.G.; WHEELER, M.B.; KESLER, D.J.; LANE, S.J.; WEIGEL, K.A.; RUTLEDGE, J.J. Embryonic disc development and subsequent viability of cattle embryos following culture in two media under two oxygen concentrations. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.787–793, 2004.
- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individuality culture bovine oocytes. **Theriogenology**. v.53, p.1553–1565, 2000.
- GARNER, D.K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristic. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p. 9–18. 2008.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; OTER, M.; MARTÍNEZ-MADRID, B.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female *in vitro*-produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular, Reproduction and Development**, v.55, p. 146–151, 2000.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117–1125, 2001.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P.N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on RNAm expression pattern in early bovine embryos cultured *in vivo* or *in vitro*. **Molecular, Reproduction, and Development**. v.68, p.441–448, 2004.
- HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1108–1119, 2004.

- HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11–20, 2000.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHIMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683–700, 1999.
- JAQUEMAR, D.; KUPRIYANOV, S.; WANKELL, M.; AVIS, J.; BENIRSCHKE, K.; BARIBAULT, H.; OSHIMA, R.G. Keratin 8 protection of placental barrier function. **Journal of Cell Biology**, v.161, p.749–756, 2003.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741–756, 2000a.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.62, p.847–856, 2000b.
- LATHAM, K.E. X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo. **Trends genetics**, v.12, p.134–137, 1996.
- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, p.767–775, 2002.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos – Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17–22, 2008.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of Messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 69, p.1424–1431, 2003.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristic in IVF – derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p.137–152, 2006.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289–1297, 2009.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v.125, p.607–623, 2003.



- MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RAHT, D., EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered RNAm expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular, Reproduction and. Development**, v.74, p.931–940, 2007.
- NARAYANAN, J.; XIONG, J.Y. & LIU, X.Y. Determination of agarose gel pore size: absorbance measurements vis a vis other techniques. **Journal of. Physics. Conference. Series**, v.28, p.83–86, 2006.
- OKAMOTO, I.; OTTE, A.P.; DAVID ALLIS, C.; REINBERG, D.; HEARD, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. **Science**.v.303, p.644–649, p. 2004.
- de OLIVEIRA, A.T.; LOPES, R.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1559–1572, 2005.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**. v.44, p.859–869, 1995.
- PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Researchs**, v.29, p.2002–2007, 2001.
- PFISTER-GENSKOW, M.; MYERS, C.; CHILDS, L.A.; LACSON, J.C.; PATTERSON, T.; BETTHAUSER, J.M.; GOUELEKE, P.J.; KOPPANG, R.W.; LANGE, G.; FISHER, P.; WATT, S.R.; FORSBERG, E.J.; ZHENG, Y.; LENO, G.H.; SCHULTZ, R.M.; LIU, B.; CHETIA, C.; YANG, X.; HOESCHELE, I.; EILERTSEN, K.J. Identification of differentially expressed genes in individually bovine preimplantation embryos produced by nuclear transfer: improper reprogramming of genes required for development. **Biology of Reproduction**, v.71, p.546–555, 2005.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, p.339, 62–66, 2003.
- REECE, W.O. **Fisiologia dos Animais Domésticos**, In *Propriedades físico-químicas das soluções* (Ed M. J. Swenson and W. O. Reece), pp. 1–7. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, Brazil. 1996.
- RHEINGANTZ, M.G.T.; PEGORARO, L.M.C.; DELLAGOSTIN, O.A.; PIMENTEL, A.M.; BERNARDI, M.L.; DESCHAMPS, J.C. Proporção macho:fêmea de embriões bovinos cultivados na presença ou ausência de glicose após FIV com espermatozoides selecionados por *Swim-up* ou Gradiente de Percoll. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.41, p.32–39, 2004.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GÁRCIA, R.; PINTADO, B.; FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential Messenger RNA

- expression between bovine blastocysts produced in different culture system: implications for blastocysts quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.589–595, 2002.
- SCHMIDT, M. Perinatal death associated with ET, IVP, and cloning in cattle. **Acta. Veterinaria Scand**, v.49, S13. 2007.
- TIFFIN, G.J.; RIEGER, D.; BETTERIDGE, K.J.; YADAV, B.R.; KING, W.A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and stage of development. **Journal of. Reproduction and. Fertility**. v.93, p.125–132, 1991.
- VAJTA, G.; ALEXOPOULOS, N.; CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts in vitro in a three-dimensional gel system. **Theriogenology**, v.7, p.1253–1263, 2004.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K.D.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.D.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genetics and. Biology**,. v.3, p.1–11, 2002.
- VEJLSTED, M.; DU, Y.; VAJTA, G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of porcine and bovine embryo – defining criteria for expected development in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v.65, p.153–156, 2006.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generation: a 2005 status. **Theriogenology**, v.65, p.914–925, 2006.

### **CAPÍTULO 3**

Artigo submetido no dia 05/11/2011 para revista: *Reproduction, Fertility and Development*, aceito com correções finais no dia 05/04/2012

## **Desenvolvimento pós-eclosão *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos até o dia 14: morfologia, sexo e expressão gênica**

Grazieli Marinheiro Machado<sup>A,B</sup>, Allice Rodrigues Ferreira<sup>A,C</sup>, Monique Mendes Guardieiro<sup>D</sup>, Michele Ricieri Bastos<sup>C</sup>, José Oliveira Carvalho<sup>A,D</sup>, Carolina Madeira Lucci<sup>E</sup>, Tiago Omar Diesel<sup>A,B</sup>, Roberto Sartori<sup>D</sup>, Rodolfo Rumpf<sup>A</sup>, Maurício Machaim Franco<sup>A,F</sup> and Margot Alves Nunes Dode<sup>A,B,G</sup>

<sup>A</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia; <sup>B</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasil Faculdade de Veterinária; <sup>C</sup>Pós-graduação em Medicina Veterinária, Unesp, Botucatu, São Paulo; <sup>D</sup>Departamento de Zootecnia, ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba; <sup>E</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasil; <sup>F</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, <sup>G</sup>Autor correspondente

### **Resumo**

Este estudo avaliou embriões D14 produzidos totalmente *in vitro* no sistema de cultivo pós-eclosão (PHD), embriões produzidos *in vivo* e cultivados no sistema PHD do D7 ao D14, e embriões produzidos totalmente *in vivo* pelo protocolo de superestimulação. Embriões D 14 foram utilizados para determinação do sexo e análise da expressão dos genes *PLAC8*, *KRT8*, *CD9*, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *PGK1*, *HSF1*, *MNSOD*, *HSP70*, *IFNT* utilizando o PCR em tempo real (qPCR). Primeiramente os embriões D7 produzidos *in vivo* e *in vitro* foram cultivados no sistema PHD. Uma taxa mais alta de sobrevivência no D14 foi observada para embriões produzidos *in vitro*. Então, embriões D14 produzidos totalmente *in vivo* e *in vitro* foram comparados. A média de tamanho de embriões totalmente *in vivo* (10,29 ± 1,83 mm) foi maior do que a de embriões totalmente *in vitro* (2,68 ± 0,33 mm). Os transcritos *HSP70* e *SLC2A1*, apresentavam menor e maior expressão, respectivamente, nos embriões *in vitro* do que nos *in vivo*. Este estudo mostrou que os embriões produzidos *in vitro* no sistema PHD foram menores que os embriões *in vivo*, e que dos 10 genes avaliados, somente dois foram diferencialmente expressos entre os grupos. Esses achados indicam que devido à baixa taxa

de sobrevivência, o sistema PHD utilizado ainda não é confiável para ser utilizado na avaliação da qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** desenvolvimento embrionário, expressão gênica, embriões pós-eclosão, gel de agarose,

### **Abstract**

This study evaluated D14 bovine embryos produced completely *in vitro* in the post hatching development (PHD) system, the *in vivo* produced embryo cultured in PHD system from D7 to D14 and the completely *in vivo* produced embryo. Embryos on D14 were used for gender determination and gene expression analysis of *PLAC8*, *KRT8*, *CD9*, *SLC2A1*, *SLC2A3*, *PGK1*, *HSF1*, *MNSOD*, *HSP70*, *IFNT* using real time (qPCR). First D7 *in vivo*- and *in vitro*-produced embryos were subjected to the PHD system. The higher rate of survival on D14 was observed for *in vitro* embryos. Then, D14 embryos produced completely *in vivo* and completely *in vitro* were compared. The mean size of completely *in vivo* ( $10.29 \pm 1.83$  mm) was greater than that of completely *in vitro* embryos ( $2.68 \pm 0.33$  mm). Transcripts for the *HSP70* and *SLC2A1* genes were down- and up-regulated, respectively, in the *in vitro* embryos. This study showed that *in vitro* embryos cultured in PHD system were smaller than the *in vivo* embryos, and of the 10 genes analyzed, only two were differentially expressed between the groups. These findings indicate that, due to the poor survival rate, the PHD system used is not reliable for evaluation of *in vitro* embryo quality.

**Keywords:** agarose tunnels, embryo development, gene expression, post-hatching embryos,

## 1. INTRODUÇÃO

Vários estudos têm sido realizados visando melhorar a qualidade de embriões produzidos *in vitro* pela avaliação do efeito de vários fatores tais como a composição do meio, a suplementação de proteína, a densidade embrionária na gota de cultivo e a atmosfera gasosa (Carolan et al. 1996; Hendricksen et al. 2000; Fukui et al. 2000; Khurana e Niemann 2000; de Oliveira et al. 2005; Corrêa et al. 2008).

A maioria desses estudos utiliza como método de avaliação a produção de blastocisto até Dia (D) 7 ou D8 de desenvolvimento ou menos frequente, a taxa de prenhez após a transferência para receptoras. No entanto, somente a morfologia dos blastocistos não é um bom indicador da capacidade do embrião de iniciar uma prenhez após a transferência. Por outro lado, utilizar a taxa de prenhez como método de avaliação é muito oneroso para ser utilizado como método de rotina. Portanto, o desenvolvimento de um procedimento mais consistente e prático para avaliação do potencial de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (PIV) além da avaliação morfológica de embriões D7 e D8, poderia ser muito útil (Brandão et al. 2004; Machado et al. 2011).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* pós-eclosão poderia ser uma nova possibilidade para monitorar o desenvolvimento embrionário sem a necessidade de transferi-los para receptoras (Vejlsted et al. 2006). Pois, com essa técnica seria possível uma avaliação mais acurada da qualidade dos embriões produzidos por diferentes técnicas de reprodução assistida e submetidos a diferentes tratamentos e manipulações. A avaliação do desenvolvimento embrionário em estágio mais tardio pode contribuir para estudos na biologia ou para a análise da toxicidade de produtos utilizados em cultivo *in vitro*, além de fármacos e pesticidas (Brandão et al., 2004). Além disso, esse método tem um grande potencial para ser

utilizado como modelo em estudos de reprogramação epigenética, especialmente, aqueles envolvidos com placentação na tecnologia de transferência nuclear.

O sistema de desenvolvimento pós-eclosão (PHD) já foi descrito em diferentes espécies (Pope et al. 1982; Pitt & Carney 1999; Wlodarczyk et al. 2001; Balls and Hellsten, 2002). Nesses estudos, no entanto, os embriões eram coletados em estágios iniciais de desenvolvimento e eram mantidos nesse cultivo por pouco tempo. A primeira versão de um sistema de desenvolvimento PHD completo foi relatada por Vajta et al. (2004), em que os embriões foram cultivados em sistema tridimensional de gel de agarose até o D16, mas não foi observada a formação de disco embrionário. Posteriormente, Brandão et al. (2004) estabeleceram um sistema com o desenvolvimento de embriões até D14 com constatação da diferenciação inicial do embrião. A capacidade desse sistema de promover o desenvolvimento embrionário até D15 foi confirmado por Machado et al. 2011. No entanto, os poucos estudos que avaliaram o sistema PHD mostraram uma alta taxa de perda embrionária, e a maioria dos embriões desenvolvidos nesse sistema eram machos (Brandão *et al.* 2004; Machado *et al.* 2011). Esses resultados indicam que várias questões relacionadas com o cultivo PHD em bovinos ainda precisam ser investigadas. Portanto, estudos são necessários para que o sistema possa ser melhorado de tal forma que possa ser utilizado como ferramenta para estudos envolvendo técnicas de reprodução assistida.

Uma melhor caracterização do sistema já estabelecido é necessária para que esse possa ser usado como ponto de partida para o estabelecimento de um sistema eficiente. É importante que as semelhanças e diferenças entre os embriões produzidos nesse sistema de cultivo e embriões produzidos *in vivo* sejam melhor caracterizadas. Portanto, o presente estudo objetivou comparar a morfologia, sexo e expressão gênica de embriões D14 produzidos totalmente *in vitro* no sistema PHD, produzidos *in vivo* até D7 e cultivados no sistema PHD até D14, e os produzidos totalmente *in vivo*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A menos quando indicado, os químicos utilizados nesse estudo foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

### 2.1. Produção *in vitro* (PIV) de embriões

Os ovários foram coletados de vacas mestiças (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) e colocados em solução salina (0,9% NaCl) a 35°C suplementada com sulfato de estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 µg/ml). Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram obtidos por aspiração de folículos de 3-8 mm, que foram puncionados com auxílio de escalpe de 19G, acoplado a um tubo de 15 ml. Após a sedimentação, os CCOs foram recuperados e selecionados utilizando um estereomicroscópio. Somente CCOs com citoplasma homogêneo e com pelos menos três camada de células do cumulus foram utilizados. Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 30-35 para uma gota de 200 µl de meio de maturação que consistiu de TCM 199 sais de *Earl's* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Invitrogen), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) 1 µg/mL de L-glutamina, 250 mg/mL de sulfato de amicacina, cobertas com óleo de silicone. Posteriormente, os ovócitos foram incubados por 22 horas a 39° C à 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima.

Após a maturação *in vitro*, os CCOs foram transferidos para uma gota de 200 µl de meio de fecundação *in vitro* que consistiu de TALP (Parrish et al., 1995) suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1 mM), epinefrina (250 mM) e heparina (10 µg/mL). Sêmen congelado de um touro com fertilidade *in vitro* conhecida, o qual já tem sido utilizado por muitos anos como touro referencia no laboratório, foi utilizado em todas as réplicas e



tratamentos. As células espermáticas móveis foram selecionadas pelo gradiente de *Percoll* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) em microtubos (Machado et al., 2009). Os ovócitos foram colocados em meio de fecundação e co-incubados com espermatozóides à concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL por 20 h em estufa a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima, sendo que o dia da inseminação *in vitro* foi considerado D0.

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µl de meio fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Holm et al, 1999). Os embriões foram co-cultivados com células do cumulus e avaliados no D2 para determinação da taxa de clivagem e no D6 e D7 para taxa de blastocisto.

## 2.2. Produção *in vivo* de embriões

Para a produção *in vivo* de embriões, as doadoras foram submetidas a protocolos de superestimulação, e a inseminação artificial (IA) para coleta de embriões no D7 e D14 de desenvolvimento. A emergência da onda foi sincronizada pela administração de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE, Ric-BE, Syntex S.A, Argentina) via intramuscular (i.m), e a inserção de dispositivo intra-vaginal de progesterona com 1,9 g de progesterona (CIDR, Pfizer, Auckland, Nova Zelândia) no D0. No D4, realizou-se um tratamento superestimulatório no total de 100 mg de NIH-FSH-P1, (Folltropin-V, Bioniche Animal Health Inc. Belleville, ON, Canadá) duas vezes ao dia com doses decrescentes até o dia 4. Na quinta e sexta aplicação de FSH, 0, 150 mg de PGF2 $\alpha$  foi aplicado por via i.m (Prolise, ARSA S.R.L, Argentina). O implante de progesterona foi removido na sétima aplicação de FSHp.e a ovulação foi induzida com aplicação i.m, de 12,5 mg de hormônio luteinizante (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) 12h após a retirada do implante. Todas as doadoras foram inseminadas com doses de sêmen congeladas do mesmo touro e mesma partida utilizada para fecundação *in vitro* 12 e 24 horas após a administração de LH. No D16 e D23, após o início do protocolo de superestimulação, ou D7,5 e D14 de desenvolvimento dos embriões, respectivamente, esses foram recuperados por lavagem uterina dupla (Castro Neto et al., 2005). Após a recuperação, os embriões *in vivo* de D7 foram submetidos ao sistema de cultivo similar ao descrito para cultivar os embriões PIV. Esse sistema consistia de um co-cultura

com células do cumulus em meio SOFaaci até o D11, quando ambos os grupos foram colocados nos túneis de agarose. As gotas de co-cultivo para o desenvolvimento de embriões *in vivo* do D7,5 ao D11 foram preparados com células do cumulus em meio SOFaaci 5 dias antes do uso.

### **2.3. Sistema de desenvolvimento pós-eclosão (PHD) *in vitro***

O sistema PHD consistiu na produção de túneis de gel de agarose coberto com meio de cultivo conforme descrito por Brandão et al. (2004). Esses túneis foram construídos após a dissolução da agarose *low-melting-point* (15517-022, Gibco BRL, Gainthensburg, MD, USA) em água Milli-Q (AMQ) na concentração final de 2,4% (Machado et al., 2011). Foram adicionados após a dissolução da agarose 10% de SFB. Os túneis foram preparados pelo menos um dia antes de serem utilizados. As placas com os túneis imersos em meio PHD (Brandão et al., 2004) foram mantidos em incubadoras a 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar até sua utilização.

Os embriões *in vivo* e *in vitro* colocados no sistema de co-cultivo foram avaliados no D8, e aqueles com sinais de degeneração foram removidos. No D9, somente os blastocistos eclodidos e sem sinais de degeneração foram mantidos no sistema de cultivo, e 200 µl de meio PHD foram adicionados às gotas, aumentando seu volume final para 400 µl (1:1 SOFaaci e SOFaaci PHD). No D11, os embriões foram avaliados e medidos sob um estereomicroscópio, e somente os que apresentavam um diâmetro  $\geq 0,5$  mm, com trofoblasto claro e massa celular compacta foram transferidos para túneis construídos com gel de agarose. Neste momento, embriões com sinais visíveis de degeneração foram descartados. Com uma pipeta da Pasteur modificada com ponta arredondada, cada embrião foi gentilmente introduzido para o interior dos túneis, onde permaneceram até o D14. O cultivo foi realizado em incubadoras à 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar.

## 2.4 Avaliação morfológica e cinética de desenvolvimento de embriões pós-eclosão

A avaliação da morfologia e o desenvolvimento dos embriões foram realizados no D11, D12,5 e D14 de cultivo. Em cada momento, os embriões foram mensurados utilizando o programa *Motic Images Plus 2.0*. No D14, os embriões foram mensurados e os que apresentavam crescimento progressivo foram removidos do sistema e uma biópsia foi retirada com lâmina de bisturi e guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para sexagem. O restante do material biológico foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em *Trizol Reagent* (Invitrogen) para análise da expressão gênica.

## 2.5 Determinação do sexo

A determinação do sexo foi realizada utilizando a biópsia armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), em que foram utilizados dois pares de *primers* diferentes. O primeiro par de *primers* é específico para uma região específica do cromossomo Y, enquanto o segundo é específico para uma região autossômica bovina. A amostra controle para os cromossomos X e Y foram originadas de DNA genômico de uma fêmea e um macho bovino. Inicialmente, as células das biópsias foram expostas por 5 min a  $50^{\circ}\text{C}$  em uma solução lise contendo 1X tampão de PCR, e 15  $\mu\text{g}$  de proteinase K (Invitrogen) em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ ; posteriormente a proteinase K foi inativada à  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min. O PCR foi realizado pela adição, em cada amostra colocadas em microtubos, de um mix de PCR contendo 20 nM de cada par dos *primers*, 200  $\mu\text{M}$  de dNTP, tampão PCR 1X e 1U Taq Polimerase Platimun® (Invitrogen®), com volume final de 30  $\mu\text{L}$ . O programa do PCR utilizado consistiu de 40 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 20s,  $57^{\circ}\text{C}$  por 30s e  $72^{\circ}\text{C}$  por 30s, seguido pela extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Os produtos de amplificação do PCR foram colocados em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando dois *amplicons* foram detectados o embrião foi considerado macho, enquanto a detecção de um *amplicon* foi fêmea.

## 2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Após a determinação do sexo, formaram-se quatro pools contendo três embriões machos produzidos *in vitro* ou *in vivo*. Em cada pool de embriões, foram adicionados 50 µl de Trizol (Invitrogen) e 12,5 µg de glicogênio. A extração do RNA total foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e o RNA ressuspendido em 10µL de água Milli-Q.

Para a síntese de cDNA, o RNA total foi incubado com 1U de DNase I (*Invitrogen*) e a transcrição reversa foi realizada, utilizando 200U SuperScript III (*Invitrogen*) e 0,5 µg de primer oligo-dT<sub>12-18</sub> (*Invitrogen*) num volume final de 25 µL. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 min e 42 °C por 52 min, seguindo da inativação por enzima a 70 °C por 15 min em um termociclador *MJ Research PTC – 100 Thermo Cycler* (GMI, Ramsey, Minnesota, USA).

## 2.7 PCR em Tempo real (qPCR)

A abundância relativa dos genes foi determinada pela técnica de qPCR em que se utilizou o protocolo de amplificação do “kit” PCR SYBR Green Rox Plus (LGC Biotecnologia, Brasil). As reações de amplificação consistiram de volume final de 25 µl, utilizando cDNA correspondente a 0,12 embriões D14. E foram realizadas na máquina de PCR 7500 *Fast Real- Time PCR System* (*Applied Biosystems*). O programa de qPCR foi utilizado à temperatura de 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 15 s e a temperatura à 60 °C por 1min. Para os genes em que a temperatura de anelamento foi diferente de 60 °C (Tabela 3.1) um passo foi adicionado a 72 °C por 1 min. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente. As reações para determinar a eficiência de amplificação de cada gene que foi superior a > 90%, foi determinada pela curva padrão. A sequência, concentração

dos *primers*, e número de acesso do *GenBank*, tamanho do amplicon e a temperatura de anelamento de cada gene está listado na Tabela 3.1.

As reações foram otimizadas para obter uma eficiência máxima de amplificação > 90%, que foi calculada utilizando uma curva padrão no software 7500 versão 2.0.3 (*Applied Biosystems*) Cada amostra foi analisada em duplicata e os produtos dos PCR foram determinados pela análise de curva de *melting* e o tamanho do *amplicon* em gel de agarose.

A abundância relativa de cada gene foi obtida após a normalização com gene constitutivo *PPIA*, que se mostrou mais estável em relação ao *GAPDH* e *H2A* pela avaliação no programa *gNorm* (*Microsoft*). Os resultados foram expressos em relação a uma amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001).

Tabela 3.1. Informações específicas dos fragmentos utilizados para amplificação dos genes na análise de PCR tempo real (qPCR).

Gene	Sequência do primer	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Concentração do primer	Numero de acesso Gen Bank/referência
<i>PPIA</i>	F 5'GCCATGGAGCGCTTTGG 3' R 5'CCACAGTCAGCAATGGTGATCT 3'	65 pb	60 °C	300 nM	BC-105173
<i>CD9</i>	F: CAC ATC AGT CCA ACC CAG AC R: AAT CGG AGC CAT AGT CCA AC	146pb	60 °C	300nM	NM_173900/El-Sayed et al., 2006
<i>HSP70</i>	F:5' CAA GAT CAC CAT CAC CAA CG R: AAA TCA CCT CCT GGC ACT TG	219pb	55°C	300nM	JN604432.1
<i>MNSOD</i>	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT	135pb	55°C	300nM	NM_201527
<i>KRT8</i>	F 5'TGTGAAGAAGATTGAGACCCGCGA 3' R 5'AAACCTCAGGTCTCCTGTGCAGAT 3'	160 pb	60°C	300nM	X12877/El-Sayed et al. 2006
<i>PLAC8</i>	F 5'GACTGGCAGACTGGCATCTT 3' R 5'CTCATGGCGACACTTGATCC 3'	140 pb	60°C	300nM	NM_016619/El-Sayed et al. 2006
<i>HSF1</i>	F 5'AAGCACAGCAACATGGCTAGCTTC 3' R 5'AGTGGACACACTGGTCACTTTCCT 3'	189 pb	60°C	300nM	EU914814.1
<i>PGK1</i>	F 5'TGCAGCTGAATTGCCAAGATGTGC 3' R 5'TTGATGCTTGGAACAGCAGCCTTG 3'	161 bp	60°C	300nM	BT021601.1
<i>SLC2A1</i>	F 5'CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC 3' R 5'CACAAATAGCGACACGACAGT 3'	258 pb	60°C	300nM	BT029806
<i>SLC2A3</i>	F 5'ACTCTTCACCTGATTGGCCTTGGA 3' R 5'GGCCAATTTCAAAAGAAGGCCACGA 3'	145 pb	60°C	300nM	NM_174603.3
<i>INFT</i>	F 5'GCAGATGGTGATTGCAGCCATGAA 3' R 5'CTTTGGCGCTCAGCTTTCCTCACA 3	194 pb	62°C	150nM	AF238612

## 2.8 Análise estatística

A porcentagem de embriões *in vivo* e *in vitro* alongados nos túneis e a proporção de embriões machos e fêmeas no D14 foi avaliada pelo teste  $\chi^2$ . Os dados que compararam o tamanho dos embriões entre o D11 e D14 e os resultados da expressão gênica foram avaliados utilizando o teste t ou teste de *Mann-Whitney* para aqueles que apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Para todas as avaliações utilizou-se o programa Prophet Program, versão 5.0, 1997.

## 2.9. Delineamento experimental

Para avaliar o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* no sistema PHD dois experimentos foram realizados.

No primeiro experimento, comparou-se o desenvolvimento dos embriões D7 *in vivo* e *in vitro* no sistema PHD até D14. Um total de 101 embriões *in vivo* D7 foram coletados de vacas superestimuladas, e 119 embriões *in vitro* de D7 foram utilizados. Os embriões de ambos os grupos foram colocados no sistema de túneis de gel de agarose, e a taxa de sobrevivência até o D14 e a cinética de desenvolvimento foram avaliados.

No segundo experimento, outro grupo de embriões D14 (n=27) produzidos totalmente *in vivo* foi obtido pelo super-estimulação ovariana das fêmeas bovinas e embriões produzidos totalmente *in vitro* (n=21) pelo sistema de cultivo PHD. Eles foram comparados quanto ao tamanho, proporção macho:fêmea e expressão gênica. Para análise da expressão gênica, após a determinação do sexo, formaram-se quatro pools com três embriões machos. Os genes selecionados estão relacionados com o metabolismo da glicose – *solute carrier family 2* (facilitador de transporte de glicose) *member 1* (*SLC2A1*) e *member 3* (*SLC2A3*), *phosphoglycerate kinase 1* (*PGK1*); desenvolvimento da placenta – *placenta-specific 8* (*PLAC8*), *keratin proteins 8* (*KRT8*); implantação – *tetraspanin* (*CD9*); estresse oxidativo e térmico – *heat shock transcription factors 1* (*HSF1*), *70 kilodalton heat shock proteins* (*HSP70*), *manganese superoxide dismutase* (*MNSOD*); e reconhecimento materno da gestação

– *interferon-tau (IFNT)*. O gene *peptidylprolyl isomerase A (PPIA)* foi utilizado como controle endógeno.



### 3. RESULTADOS

O primeiro experimento comparou a cinética de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* no sistema de cultivo PHD até D14. Um maior número de embriões PIV se desenvolveu do D7 ao D11 quando comparado com os *in vivo*. Dos 101 embriões *in vivo* coletados no D7, somente três sobreviveram no sistema PHD até D14 (Tabela 3.2). No entanto, não se observou nenhuma diferença na porcentagem de embriões *in vivo* e *in vitro* que alcançaram o tamanho mínimo ( $\geq 0,5$ mm) para serem colocados nos túneis de agarose no D11 (Tabela 3.2). Quanto ao tamanho, os embriões *in vivo* e *in vitro*, foram semelhantes no D11, D12,5 e D14 (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Porcentagem de embriões D7 *in vivo* e *in vitro* que se desenvolveram nos sistema de cultivo pós-eclosão até o D14 de desenvolvimento.

Embriões	N	N°. de embriões (%) (D11)	N°. de embriões $\geq 0.5$ mm (%) (D11)	N°. de embriões (%) (D14)
<i>In vivo</i>	101	59 (58%) <sup>a</sup>	20 (19,8%) <sup>a</sup>	3 (3%) <sup>a</sup>
<i>In vitro</i>	119	88 (74%) <sup>b</sup>	30 (25,2%) <sup>a</sup>	11 (9%) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Diferentes subscrito na mesma coluna representa diferença estatística (P<0,05).

Tabela 3.3. Média de tamanhos (mm) de embriões *in vivo* e *in vitro* até D14 de desenvolvimento no sistema PHD.

Grupo	Média de tamanhos dos embriões (mm)			
	n	D11	D12,5	D14
<i>In vitro</i>	11	0,73 ± 0,05	0,91 ± 0,10	1,83 ± 0,30
<i>In vivo</i>	3	0,57 ± 0,06	0,80 ± 0,03	1,88 ± 0,46

Devido ao pequeno número de embriões *in vivo* que sobreviveram no cultivo PHD, não foi possível utilizar esse grupo para análise do sexo e da expressão dos genes. Por esse motivo, outro experimento foi realizado para melhor avaliar o desenvolvimento dos embriões *in vitro* no sistema PHD (totalmente *in vitro*; Figura 3.1A), em que esses foram comparados com os totalmente *in vivo* no D14 (Figura 3.1B). Para atingir esse objetivo o tamanho, sexo e expressão gênica foram comparados entre esses grupos. Embora os embriões do grupo totalmente *in vivo* fossem maiores ( $p < 0,05$ ) do que os totalmente *in vitro*, eles apresentaram uma maior variação no tamanho ( $10,29 \pm 1,83$  mm vs.  $2,68 \pm 0,33$  mm, respectivamente). Nenhuma diferença foi observada na proporção de embriões machos e fêmeas para os embriões D14 totalmente *in vivo*, enquanto um desbalanço a favor dos embriões machos foi observado nos embriões D14 produzidos totalmente *in vitro*. Entretanto, nenhuma diferença foi observada no tamanho dos embriões quando os machos e fêmeas de ambos os grupos foram comparados (Tabela 3.4).

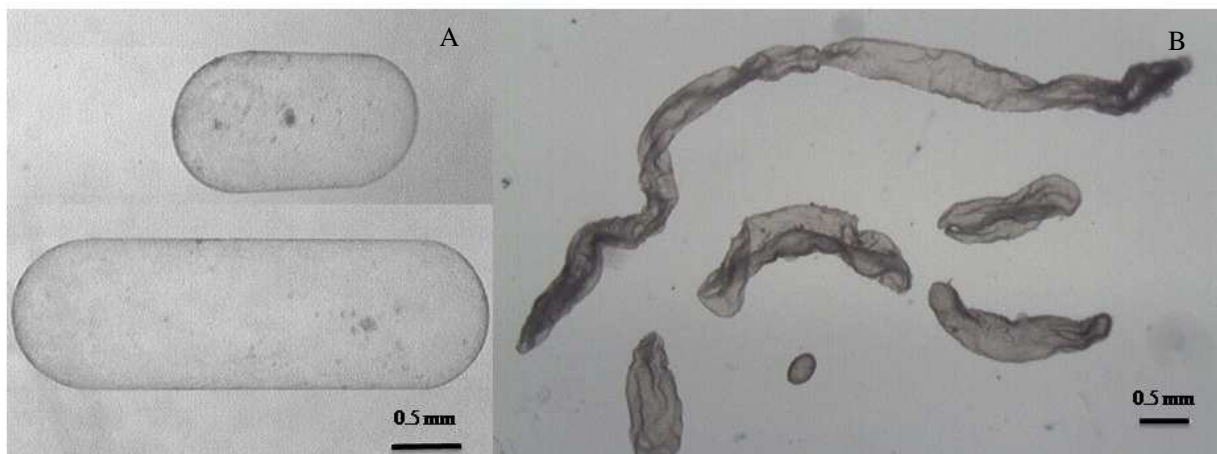


Figura 3.1. A- embriões bovinos D14 produzidos totalmente *in vitro* no gel de agarose do sistema de cultivo *in vitro* pós-eclosão sem colabamento. B – embriões bovinos D14 produzidos totalmente *in vivo* colabados após a coleta do útero das doadoras. Embriões com ampla variação de tamanho.

Tabela 3.4. Média do tamanho (mm) de embriões macho/fêmeas de D14 de desenvolvimento totalmente *in vivo* coletados de doadoras e totalmente *in vitro* produzidos no sistema PHD.

Grupo	Média do tamanho dos embriões (mm)	
	N (%)	D14
Fêmeas <i>In vitro</i>	4 (9) <sup>A</sup>	1.70 ± 0.18 <sup>a</sup>
Machos <i>In vitro</i>	17 (81) <sup>B</sup>	1.88 ± 0.46 <sup>a</sup>
Fêmeas <i>In vivo</i>	15 (56) <sup>A</sup>	13.99 ± 3.48 <sup>b</sup>
Machos <i>In vivo</i>	12 (44) <sup>A</sup>	7.33 ± 1.49 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes subscrito na mesma coluna representa diferença estatística ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B</sup> Diferentes subscrito na mesma coluna indica diferença estatística dentro do grupo de embriões totalmente *in vivo* coletados de doadoras e totalmente *in vitro* produzidos no sistema PHD ( $p < 0.05$ ).

Para avaliar a qualidade dos embriões usando o perfil molecular como parâmetro, a expressão de 10 genes (Figura 3.2) foi quantificada. Na comparação da expressão gênica entre embriões D14 totalmente *in vivo* e *in vitro*, verificou-se uma menor expressão do gene *HSP70* ( $p=0,03$ ) e maior expressão de *SLC2A1* ( $p=0,08$ ) em embriões

totalmente *in vitro*. Para outros genes, nenhuma diferença foi observada nos níveis de transcritos entre os grupos de embriões.

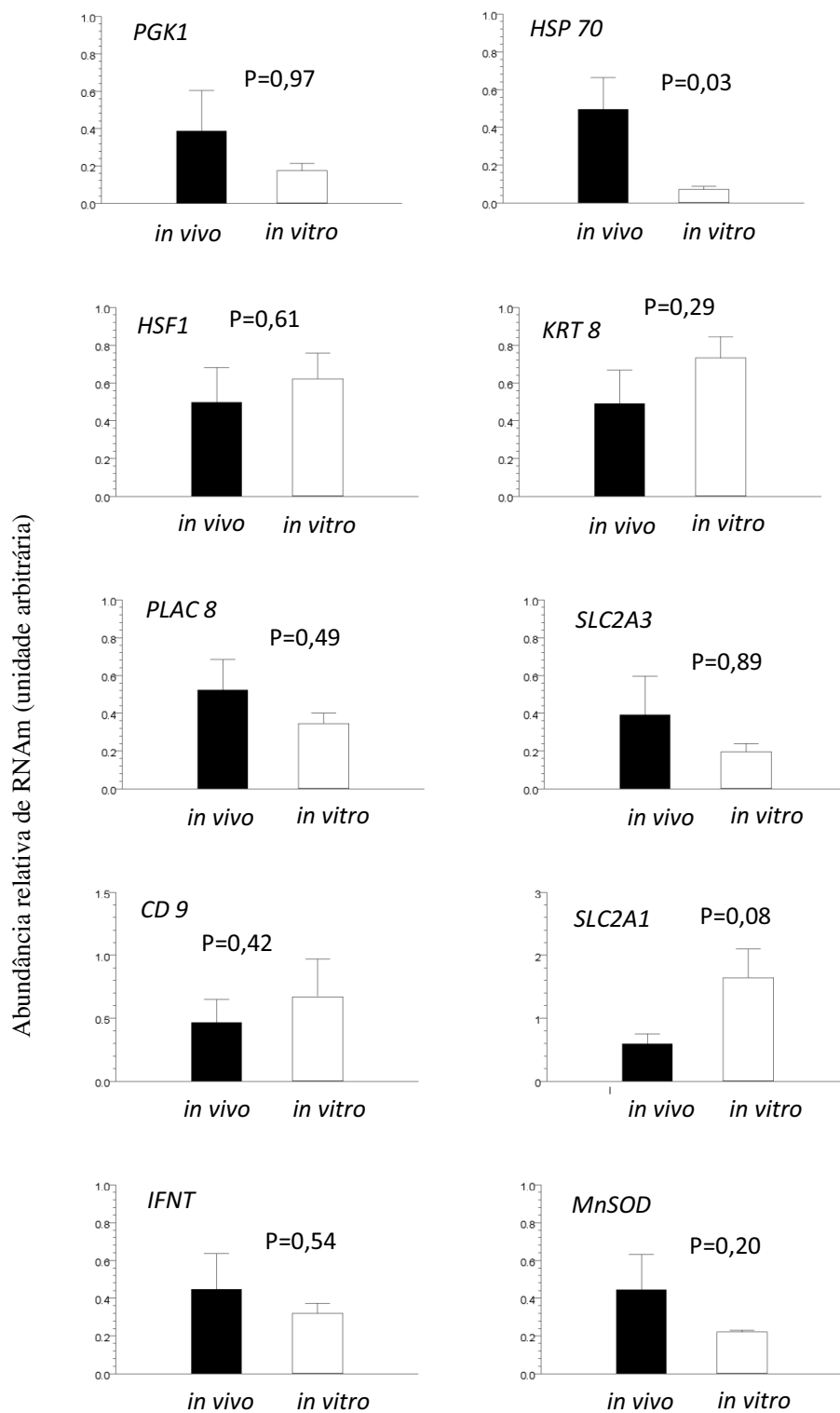


Figura 3.2. Abundância relativa de RNAm dos genes (*PGK1*, *HSP70*, *HSF1*, *KRT8*, *PLAC 8*, *SLC2A3*, *CD 9*, *SLC2A1*, *IFNT*, *MnSOD*) determinados pelo método de qPCR em embriões bovinos produzidos totalmente *in vivo*, obtidos das coletas de doadoras e totalmente *in vitro* cultivados no sistema pós-eclosão em gel de agarose diluído em água Milli-Q no D14 de desenvolvimento. Para a determinação da expressão dos genes foram formados quatro pools com três embriões D14 de cada grupo. Os dados foram normalizados com o gene constitutivo *PPIA*, com resultados expressos em relação à amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001) e, são apresentados como média  $\pm$  EP.

#### 4. DISCUSSÃO

Embora o sistema de cultivo pós-eclosão de embriões bovinos seja um sistema interessante e com um potencial para ser utilizado como ferramenta em estudos envolvendo técnicas de reprodução assistida, poucos estudos foram realizados utilizando esse procedimento. Portanto, esforços são necessários para melhor caracterizá-lo e otimizar o seu uso como parâmetro para avaliação embrionária. Esse trabalho objetivou determinar as características morfológicas e moleculares dos embriões desenvolvidos *in vitro* até um estágio mais avançado de desenvolvimento.

No primeiro experimento, quando embriões D7 produzidos *in vivo* e *in vitro* foram submetidos ao cultivo no sistema PHD até D14 de desenvolvimento, uma maior taxa de sobrevivência foi observada nos embriões *in vitro*. Dos 101 embriões *in vivo* coletados no D7, somente três sobreviveram no sistema PHD até o D14. A baixa taxa de desenvolvimento de embriões *in vivo* pode ser devido às condições adversas do sistema de cultivo *in vitro* quando comparado às condições uterinas. Devido ao rigoroso processo de seleção os quais os embriões produzidos *in vitro* são submetidos desde os estágios iniciais de desenvolvimento, eles provavelmente possuem uma maior plasticidade para sobreviver a condições desfavoráveis do que os embriões produzidos *in vivo*. Portanto, tentativas para melhorar as condições de cultivo do sistema PHD para que esse proporcione um ambiente mais favorável para o desenvolvimento embrionário devem ser realizadas.

Nesse sentido, se considerarmos as condições uterinas algumas alternativas seriam suplementar o meio PHD com substâncias tais como fluido uterino, progesterona (Clemente et al., 2009), materiais bioativos derivados de células troncos embrionárias (Kim et al., 2011) ou mesmo diminuir a concentração de glicose utilizada nesse meio.

Embora poucos embriões *in vivo* cresceram no sistema de cultivo PHD, a média de tamanho dos embriões *in vivo* e *in vitro* foi similar. O alongamento observado nesses dois grupos de embriões foi semelhante ao alongamento relatado para embriões PIV, que foram transferidos para receptoras em D7 e coletados em D12 (Lazzari et al., 2002). No entanto, o tamanho dos embriões observado nesse estudo foi bem menor do que dos embriões PIV transferidos para receptoras e coletados no D16 (Bertolini et al., 2002; Maddox-Hyttel et al., 2003). Isso mostra que o cultivo PHD resultou em um atraso no crescimento dos embriões, em comparação com aqueles produzidos *in vivo*. Mesmo assim, o comprimento dos embriões *in vivo* e *in vitro* no sistema PHD foi semelhante ao observados em um estudo anterior, utilizando embriões D15 (Machado et al., 2011). A notável capacidade de alguns embriões *in vivo* de se protegerem das condições adversas e se desenvolverem no ambiente PHD, induz a levantar questões sobre sua qualidade, inclusive se eles iriam proporcionar maiores taxas de prenhez do que os que em não cresceram nesse sistema. Se isso for verdadeiro, o sistema PHD também poderia ser utilizado como ferramenta para identificar os embriões produzidos *in vivo* de melhor qualidade.

Devido aos embriões *in vivo* ter o seu crescimento severamente comprometido no sistema PHD até D14, um segundo experimento foi realizado para comparar a características morfológicas e moleculares entre os embriões produzidos totalmente *in vitro* e totalmente *in vivo*.

O tamanho dos embriões produzidos totalmente *in vivo* e recuperados no D14 mostrou alta variação (Tabela 3.4), o que foi semelhante aos resultados relatados por outros pesquisadores (Bertolini et al., 2002; Maddox-Hyttel et al., 2003; Vejlsted et al., 2005; Clemente et al., 2009). Os embriões produzidos *in vitro* apresentaram menor variabilidade no tamanho, mas foram menores que os *in vivo* no D14, portanto pode-se afirmar que o alongamento dos embriões no sistema PHD foi comprometido. Considerando as condições artificiais associadas ao limite de espaço que o sistema PHD fornece comparado ao ambiente uterino, não seria esperado que os dois grupos de embriões tivessem crescimento semelhante. Mesmo assim, o sistema foi capaz de induzir o alongamento de embriões PIV, sendo que alguns apresentavam inclusive tamanhos semelhantes aos menores embriões coletados *in vivo* no D14. Esses resultados são encorajadores para que alterações no sistema sejam propostas



visando fornecer melhores condições de crescimento e, conseqüentemente melhorar o desenvolvimento do embrião.

No segundo experimento, observou-se um desvio da proporção 1:1 esperada entre macho:fêmea, com uma maior porcentagem de embriões machos produzidos no sistema PHD (Tabela 3.4). No entanto, nenhum desvio nessa proporção foi observado nos embriões produzidos totalmente *in vivo*. Em estudo prévio, uma maior porcentagem de machos foi observada em embriões totalmente *in vitro* produzidos em D15 (Machado et al., 2011). Brandão et al. (2004) observaram um maior número de embriões machos cultivados no sistema PHD que as fêmeas no D16. Em contrapartida, quando embriões PIV foram mantidos no útero de receptoras do D7 ao D16 somente uma tendência a ter mais embriões machos do que fêmeas foi observado (Bertolini et al., 2002). O ambiente *in vitro*, portanto, parece favorecer o desenvolvimento de embriões machos. No entanto, não se sabe em que estágio do desenvolvimento embrionário ocorre esse desvio e se essa relação já foi estabelecida no D11, quando os embriões foram introduzidos nos túneis. Curiosamente, a determinação do sexo de embriões removidos no D9 do ambiente de cultivo *in vitro* revelou que 60% deles eram fêmeas (dado não publicado). Fêmeas, portanto, parecem ser afetadas pela condição de cultivo antes de serem colocadas nos túneis. Diferenças na proporção entre os sexos têm sido atribuídas a vários fatores, incluindo velocidade de desenvolvimento (Kochhar et al., 2001), presença de soro no meio de cultivo (Gutiérrez-Adán et al., 2001), tempo de co-incubação antes da FIV (Kochhar et al. 2003) e/ou efeito do touro (Alomar et al., 2008). Além disso, a concentração de glicose tem sido relatada como sendo mais prejudicial para o desenvolvimento de embriões fêmeas (Gutiérrez-Adán et al., 2001). No entanto, esse não seria o caso já que o meio PHD, que possui alta concentração de glicose, só foi adicionado às gotas de cultivo no D9, quando o desvio na proporção do sexo já deve estar estabelecido.

Embriões de mamíferos no estágio pré-implantação são conhecidos por serem suscetíveis ao meio ambiente e às condições de cultura, que podem afetar a abundância de RNAm de genes importantes que comprometem o desenvolvimento do embrião (Lonergan et al., 2006; Wrenzycki et al., 2007; Corrêa et al., 2008). A avaliação do perfil de expressão gênica é uma ferramenta utilizada para prever a qualidade do embrião e para compreender os eventos que causam mortalidade embrionária (El-Halawany et al., 2004; Wrenzycki et al., 2007).

Alguns genes avaliados em nosso estudo foram escolhidos por estarem relacionados com o sucesso de prenhez (El-Halawany et al., 2004), outros por estarem envolvidos com o metabolismo da glicose e estresse (Morton et al., 2007; Corrêa et al., 2008), duas vias muito suscetíveis de serem afetadas pelo ambiente de cultivo *in vitro* e por estarem relacionadas com a qualidade do embrião.

Dos genes relacionados ao metabolismo de glicose, somente o *SLC2A1* foi diferencialmente expresso nos embriões PIV. Vários grupos têm avaliado o padrão de expressão de genes de transportadores de glicose durante o período pré-implantação em bovinos, mas os resultados são conflitantes quando embriões *in vivo* e *in vitro* são comparados (Lazzari et al., 2002, Balasubramanian et al., 2007). Essas diferenças sugerem que o metabolismo e a captação de glicose do embrião podem ser afetados pelo sistema de cultivo utilizado. É possível que o excesso de glicose no meio SOF PHD (27,7 mM) associado à alta tensão de oxigênio (Harvey et al., 2004), comparado às condições uterinas, pode ter estimulado a maior expressão de *SLC2A1*.

O motivo da alteração na expressão do *SLC2A1* e a não do *SLC2A3* ainda não está claro, mas resultados semelhantes foram observados em embriões *in vitro* D15 que apresentavam um maior potencial de desenvolvimento (Machado et al., 2011). Entre os genes relacionados ao estresse, apenas o *HSP70* foi diferencialmente expressos entre embriões D14 *in vivo* e *in vitro*. É bem conhecido que, além da variação de temperatura a ativação dessa proteína também é afetada por vários processos de estresse celular, incluindo a presença de peróxido de hidrogênio, processo de fosforilação oxidativa, infecções e processos inflamatórios (Paula-Lopes & Hansen 2002; Ahn & Thieli, 2003). Outros fatores também podem modificar a atividade transcricional do *HSP*, tais como o meio de cultivo (Sagirkaya et al., 2006; Lazzari et al., 2002), sexo dos embriões ou a simples a manipulação dos embriões (Morton et al., 2007). Devido às condições adversas do cultivo *in vitro*, poderia se esperar uma maior expressão do gene *HSP70* nos embriões produzidos totalmente *in vitro*. No entanto, os embriões D14 totalmente *in vivo* foram os que apresentaram maior abundância relativa de transcritos para esse gene. É possível que nos embriões D14 totalmente *in vitro*, tenha ocorrido uma queda do estoque de RNAm deste gene devido a maior síntese de sua proteína em resposta às condições adversas de estresse ambiental.

Para os genes relacionados à implantação e placentação, os quais foram relatados como sendo diferencialmente expresso em embriões que resultaram em prenhez ou em nascimento, (El-Sayed et al., 2006), nenhuma diferença foi observada na expressão entre *in vivo* e *in vitro*. Embora um número limitado de genes tenha sido avaliado no presente estudo, os resultados indicam que embriões PIV que são capazes de crescer no sistema PHD também têm o potencial para manter o desenvolvimento subsequente.

Em resumo, esse estudo mostrou que o sistema PHD utilizado é ainda ineficiente para o cultivo de embriões *in vivo* e *in vitro* devido à baixa sobrevivência dos dois tipos de embriões. Contudo, os embriões produzidos *in vitro* mostraram maior taxa de sobrevivência do que os produzidos *in vivo* no sistema PHD. Apesar dos embriões totalmente *in vitro* terem tamanho inferior aos totalmente *in vivo*, quando se comparou o perfil da expressão gênica verificou-se um padrão de expressão semelhante entre os dois grupos de genes relevantes (*PGK1*, *HSF1*, *PLAC8*, *CD9*, *IFNT*, *MNSOD*, *SLC2A3* e *KRT8*) para o seu desenvolvimento. Esses resultados estimulam a busca pelo aprimoramento do sistema PHD, que tem um potencial para ser uma ferramenta na avaliação da qualidade dos embriões PIV e de outras biotécnicas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S.G.; & THIELE, D.J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. **Genes Development**, v 17, p. 516–528, 2003.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal of Reproduction and Science**, v.107, p.48–61, 2008.
- BALLS, M. & HELLSTEN, E. Statement on the scientific validity of post-implantation rat whole-embryo culture assay – an *in vitro* test for embryotoxicity. **ATLA**, v.30, p. 271–273, 2002.
- BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; MOHANA KUMAR, B.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; AND RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.265–275, 2007.
- BERTOLINI, M.; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B. Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v.63, p.318–328, 2002.
- BRANDÃO, D.O.; HYTTTEL, P.; LOVENDAHL, P.; RUMPF, R.; STRINGFELLOW, D.; CALLESEN, H. Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2048–2055, 2004.
- BONDIOLI, K.R.; ELLIS, S.B.; PRYOR, J.H.; WILLIAMS, M.W.; HARPOLD, M.M. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.41, p. 95–104, 1989.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; KHATIR, H.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of bovine embryos using individual oocytes. **Molecular, Reproduction and Development**, v.45, p.145–150, 1996.

- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v.63, p.1249–1255, 2005.
- CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; NAIB, A.AL.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, p. 507–517, 2009.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal of. Reproduction and. Science**, v.104, p.132–142, 2008.
- EL-HALAWANY, N.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts in preimplantation developmental stages of *in vitro*-produced bovine embryos using real-time polymerase chain reaction. **Reproduction, Fertility and. Development**, v. 16, p. 753–762, 2004.
- ELLIS, S.B.; BONDIOLLI, K.W.; WILLIAMS, M.E. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.29, 242, 1988.
- EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER, K., TESFAYE, D.. Large – scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiology and. Genomics**, v.28, p. 84–96, 2006.
- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individuality culture bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p.1553–1565, 2000.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p. 1117–1125, 2001.
- HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; PANTALEON, M.; ARMSTRONG, D.T.; THOMPSON, J.G. Oxygen –regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of. Reproduction**, v.71, p.1108–1119, 2004.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEM, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E., TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.141–152, 1995.
- HENDRICKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11–20, 2000.

- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHIMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p. 683–700, 1999.
- KHURANA, N.K.& NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741 – 756, 2000.
- KIM, E.Y.; JEE, J.B.; PARK, H.Y.; JEONG, C.J.; RIU, K.Z.; PARK, S.P. The use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the *in vitro* culture of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v.57, p.346–354, 2011.
- KOCHHAR, H.P.S.; PEIPPO, J.; KING, W.A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v.55, p. 3–14, 2001.
- KOCHHAR, H.S.; KOCHHAR, K.P.; BASRUR, P.K., KING, W.A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal of Reproduction and Science**, v.77, p. 33–49, 2003.
- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMAN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C.. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v.67, 767–775, 2002.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristic in IVF–derived embryos. **Theriogenology**, v.65, p. 137–152, 2006.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R., DODE, M.A.N.. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 1289–1297, 2009.
- MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Post-hatching development *in vitro* until D15 of bovine male and female embryos in agarose gel tunnels diluted in PBS solution or in Milli-Q Water. **Zygote**, v.23, p. 1–12, 2011.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v.125, p. 607–623, 2003.
- MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RAHT, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered

- RNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular of Reproduction and Development**, v. 74, p. 931–940, 2007.
- de OLIVEIRA, A.T.; LOPES, R.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v.64, p. 1559–1572, 2005.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859–869, 1995.
- PAULA-LOPES, F.F. & HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169–1177, 2002.
- PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v 29, p 2002–2007, 2001.
- PITT, J.A. & CARNEY, E.W. Evaluation of various toxicants in rabbit whole embryo culture using a new morphologically based evaluation system. **Teratology**, v.59, p 102–109, 1999.
- POPE, L.; POPE, V.Z.; BECK, L.R. Development of Babbon pre-implantation embryos to post-implantation stages *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 915–923, 1982.
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. **Reproduction**, v.131, p. 895–904, 2006.
- TIFFIN, G.J.; RIEGER, D.; BETTERIDGE, K.J.; YADAV, B.R.; KING, W.A. Glucose and glutamine metabolism in pre-attachment cattle embryos in relation to sex and state of development. **Journal of. Reproduction and. Fertility**, v.93, p 125–132, 1991.
- VAJTA, G.; ALEXOPOULOS, N.; CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts *in vitro* in a three-dimensional gel system. **Theriogenology**, v 7, p 1253–1263, 2004.
- VEJLSTED, M.; AVERY, B.; SCHMIDT, M.; GREVE, T.; ALEXOPOULOS, N.; MADDOX-HYTELL, P. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of bovine epiblast. **Biology of. Reproduction**, v. 72, p 678–686, 2005.
- VEJLSTED, M., DU, Y., VAJTA, G., AND MADDOX-HYTELL, P. Post-hatching development of porcine and bovine embryo – defining criteria for expected development *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v.65, p 153–156, 2006.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. S77-S83, 2007.

WOLDAREZYK, .B.; BIERNACKI, B.; MINTA, M.; ZMUDZKI, J.. Postimplantation whole embryo culture assay for hamsters: an alternative to rat and mouse. **The Scientific World**, v 1, p. 227–234, 2001.



## **CAPÍTULO 4**

## Desenvolvimento pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo

Grazieli Marinheiro Machado<sup>1,2</sup>, Allice Ferreira Rodrigues<sup>3</sup>, Ivo Pivato<sup>2</sup>, Andrei Fidelis<sup>4</sup>, José Felipe Spricigo<sup>1,2</sup>, Fernanda Paulini<sup>5</sup>, Carolina Madeira Lucci<sup>5</sup>, Maurício Machaim Franco<sup>2,3,4</sup> e Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia; <sup>2</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasil Faculdade de Veterinária; <sup>3</sup>Pós-graduação em Medicina Veterinária, Unesp, Botucatu, São Paulo; <sup>4</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia; <sup>5</sup>Programa de Pós-graduação do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília <sup>6</sup>Autor correspondente

### Resumo:

O presente estudo verificou o efeito do cultivo pós-eclosão até o D14 no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (PIV). Para isso, embriões PIV em D7 foram transferidos para receptoras (parcialmente *in vitro*), ou colocados no sistema PHD (totalmente *in vitro*), ou congelados para posterior análise. Como controle, foram utilizados embriões D7 produzidos *in vivo* que também foram transferidos para receptoras e coletados no D14 (totalmente *in vivo*), sendo que amostras desses embriões foram congeladas no D7 e no D14. Os embriões *in vitro* e *in vivo* de D7 e de D14 congelados foram utilizados para quantificação da expressão de 8 genes (*PLAC8*, *CD9*, *GLUT-1*, *GLUT-3*, *KRT8*, *MnSOD*, *HSP70* e *INFT*) por qPCR. Os embriões de D14 de todos os grupos foram mensurados e avaliados para a presença e tamanho do disco embrionário (DE). Sendo que a análise de microscopia eletrônica foi realizada nos embriões D14 recuperados das receptoras após a transferência múltipla. A taxa de recuperação dos embriões D14 foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os embriões *in vivo* (38,6%, 53/137) e *in vitro* (50%, 64/128) cultivados no útero de receptoras. Entretanto, um menor ( $P < 0,05$ ) número de embriões alongou e foi recuperado dos túneis do PHD (3%). Estes embriões, também, foram menores ( $2,92 \pm 0,45$  mm) que os totalmente *in vivo* ( $24,18 \pm 3,71$  mm) e parcialmente *in vitro* ( $19,06 \pm 2,43$  mm), que não diferiram entre si. O DE foi detectado em 25% ( $n=16/64$ ) dos embriões *in vitro* e em 26% ( $n=14/53$ ) dos *in vivo* cultivados no útero, e apresentou diâmetro semelhante entre esses dois grupos de embriões  $0,28 \pm 0,01$  mm e  $0,29 \pm 0,03$  mm, respectivamente. Uma maior percentagem de embriões cultivados no PHD apresentou o DE (64,2%), entretanto o diâmetro ( $0,14 \pm 0,007$  mm) era inferior ( $P < 0,05$ ) ao dos outros grupos. Quanto à expressão gênica, observou-se que embriões PIV no D7 apresentaram maior expressão do *HSP70* e do *SLC2A1* que os *in vivo*. Nos

embriões D14, não se observou nenhuma diferença na expressão de genes entre os embriões *in vivo* e *in vitro* cultivados no útero de receptoras. Contudo, quando se comparou a expressão gênica entre esses embriões com os totalmente *in vitro*, cultivados no sistema PHD uma maior expressão dos genes *PLAC8*, *MnSOD* e *SLC2A3* foi observada nestes embriões. Portanto, esse trabalho mostrou que os embriões PIV de D7 são diferentes dos *in vitro* quanto à expressão de genes. Entretanto, os embriões D14 oriundos de embriões *in vitro* e *in vitro* transferidos para o ambiente uterino foram similares molecular e morfológicamente. Já os embriões colocados no sistema PDH diferiram dos outros grupos, em relação ao tamanho, diâmetro do DE, à porcentagem de embriões que se desenvolvem nesse sistema e a expressão dos genes avaliados.

**Palavras-chaves:** embriões *in vivo*, expressão gênica, sistema PHD, túneis de agarose.

### **Abstract**

The present study evaluated the effect of post-hatching culture until Day (D) 14 of *in vitro* produced embryos (IVP). D7 IVP embryos were either transferred to recipients' uterus (partially *in vitro*) and collected on D14, or placed in the PHD system (completely *in vitro*) until D14, or frozen for posterior analysis. As a control group, D7 *in vivo* produced embryos were transferred to recipients' uterus and collected at D14 (completely *in vivo*), samples of which were also frozen for gene expression analysis. Frozen D7 and D14 *in vitro* and *in vivo* embryos were used for the quantification of 8 genes (*PLAC8*, *CD9*, *GLUT-1*, *GLUT-3*, *KRT8*, *MnSOD*, *HSP70* and *INFT*) by qPCR. D14 embryos from all groups were measured and evaluated for the presence and diameter of the embryonic disc (ED). The ED from both groups cultured in the recipient's uterus was also compared using electron microscopy. The recovery rate of D14 embryos was similar ( $P>0.05$ ) between *in vivo* (38.6%, 53/137) and *in vitro* (50%, 64/128) embryos cultured in recipients uterus. However, a lower ( $P<0.05$ ) proportion of embryos were elongated and recovered from PHD tunnels (3%). These embryos were also smaller ( $2.92 \pm 0.45$  mm) than the completely *in vivo* ( $24.18 \pm 3.71$  mm) and the partiality *in vitro* ( $19.06 \pm 2.43$  mm) embryos, which were similar between them. The ED was detected in 25% ( $n=16/64$ ) of the *in vitro* and 26 % ( $n=14/53$ ) of the *in vivo* embryos cultured in the uterus, which also had similar diameter between them ( $0.28 \pm 0.01$  mm e  $0.29 \pm 0.03$  mm, respectively). A higher percentage of embryos cultured in the PHD system

presented an ED (64.2%), however the diameter ( $0.14 \pm 0.007$  mm) was lower ( $P < 0.05$ ) than in the other groups. With regards to gene expression, we found that D7 IVP embryos demonstrated higher expression of *HSP70* and *SCL2A1* than *in vivo* embryos. D14 embryos, showed no difference in gene expression between the completely *in vivo* and partiality *in vitro* embryos. However, when we compared the gene expression of those embryos with the completely *in vitro*, cultured in the PHD system, we observed a higher expression in *PLAC8*, *MnSOD* and *SLC2A3* genes in the PHD cultured embryos. Therefore, the present study showed that IVP D7 embryos are different from the *in vivo* embryos with regards to gene expression. However at D14, when transferred to uterine environment, they were morphologically and molecularly similar. Conversely, D7 IVP embryos placed in the PHD system differ from the others groups, in relation to size, ED diameter, the percentage of embryos that develop in the system and gene expression.

**Keywords:** agarose tunnels, gene expression, *in vivo* embryos, PHD system

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos na técnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos, os índices de gestação ainda são inferiores aos obtidos com embriões produzidos *in vivo* pela técnica de superestimulação ovariana de doadoras (Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011). Esses resultados se devem, provavelmente, às diferenças observadas entre os embriões produzidos *in vitro* e os produzidos *in vivo* (Greve et al., 1993; Crosier et al., 2000, Crosier et al., 2001, Farin et al., 2001), em várias características incluindo níveis de expressão gênica (Rizos et al., 2002a,b; Tesfaye et al., 2004; Smith et al., 2007). Essas diferenças, que estão relacionadas com a qualidade, podem ser responsáveis pela maior perda da prenhez entre os dias 8 e 17 que ocorre nos embriões produzidos *in vitro*, no qual cerca de 40% se degenera após a transferência para as receptoras (Mamo et al., 2011). Portanto, vários aspectos relacionados às exigências dos embriões, principalmente, no período pré-implantação precisam ser esclarecidos.

Inúmeros estudos têm sido realizados avaliando diversos fatores que podem influenciar no sucesso do desenvolvimento embrionário, tais como, a composição do meio, a suplementação protéica, a densidade de embriões por gota e a atmosfera gasosa, (Carolan et al., 1996; Hendricksen et al., 2000; Fukui et al., 2000; Khurana & Niemann, 2000; de Oliveira et al., 2005; Correa et al., 2008) na tentativa de melhorar a qualidade do embrião produzido *in vitro*, de forma que esse se aproxime ao máximo aos produzidos *in vivo*. Esses estudos adotam como critério para validação de protocolos o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto no dia 7 (D7) ou 8 (D8) do cultivo. No entanto, sabe-se que somente a avaliação morfológica dos blastocistos não é um bom indicador da capacidade do embrião de iniciar e manter uma prenhez após a transferência. Por outro lado, utilizar a taxa de prenhez como método de avaliação é muito oneroso para ser utilizado como método de rotina.

Portanto, a identificação de um método mais consistente e prático e que seja viável economicamente, para avaliação do potencial desenvolvimento de embriões PIV, além da avaliação morfológicas de embriões D7 e D8, poderia ser muito útil (Brandão et al. 2004; Machado et al. 2011).

Para estudar esse embrião, uma alternativa que tem sido utilizada por alguns autores com propósitos diversos é a técnica de múltiplas transferências de embriões com posterior recuperação dos embriões no D14 a D16 de desenvolvimento (Bertolini et al 2002; Clemente et al., 2009; Rodríguez-Alvarez et al., 2010; Clemente et al., 2011). Esse método permite avaliar o desenvolvimento de embriões produzidos por diferentes técnicas de reprodução assistida e submetidos a diferentes tratamentos, em um estágio mais avançado de desenvolvimento. Entretanto, esse também requer a disponibilidade de fêmeas para serem utilizadas como receptoras temporárias, envolvendo também maior custo no que se refere ao manejo e cuidado com os animais. Outra alternativa, para avaliar embriões em um estágio mais tardio de desenvolvimento sem precisar transferi-los para receptoras (Brandão et al., 2004; Vejlsted et al. 2006), que é proposta neste trabalho, é a utilização de um sistema de produção totalmente *in vitro* de embriões até o dia 14 de desenvolvimento, o *post hatching development (PHD)* system.

O sistema PHD, já foi descrito para várias espécies e abre uma nova possibilidade para acompanhar o desenvolvimento embrionário após o D7 de cultivo. Em bovinos a primeira versão de um sistema PHD completo foi descrito por Vajta et al. (2004), que obtiveram crescimento embrionário até o D16 em um sistema de cultivo tridimensional preparado com gel de agarose. Entretanto, nesse estudo, os embriões não apresentavam a formação do disco embrionário. Posteriormente, esse método foi aprimorado por Brandão et al. (2004), que obtiveram um sistema de cultivo *in vitro* mais estável, mostrando não só que os embriões apresentavam os estágios iniciais de diferenciação, mas também indicando alguns fatores importantes para que os mesmos pudessem se desenvolver nesse tipo de cultivo. Estudos posteriores mostraram que o sistema PHD não é viável para ser utilizado na avaliação de embriões produzidos *in vivo*, entretanto confirmaram a possibilidade de embriões *in vitro* de se desenvolverem até o D14 ou D15 de cultivo (Machado et al., 2011). Apesar desse método ainda precisar ser melhor caracterizado, avaliado e aprimorado, representa uma

alternativa importante para acompanhar e avaliar de forma mais precisa os embriões pela técnica de reprodução assistida.

O presente estudo teve por objetivo verificar o desenvolvimento pós-eclosão de embriões submetidos a dois sistemas de cultivo *in vivo*, após a transferência múltipla para o útero de receptoras, e *in vitro* no sistema PHD.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Ao menos quando indicado, os químicos utilizados nesse estudo foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, USA).

### 2.1. Produção *in vitro* de embriões

Os ovários foram coletados de vacas mestiça (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) e colocados em solução salina (0,9% NaCl) a 35°C suplementada com sulfato estreptomicina (100 µg/ml) e penicilina (100 µg/ml). Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram obtidos por aspiração de folículos de 3-8 mm, que foram puncionados com auxílio de escalpe de 19G, acoplado a um tubo de 15 ml. Após a sedimentação, os CCOs foram recuperados e selecionados utilizando um estereomicroscópio. Somente CCOs com citoplasma homogêneo e com pelos menos três camada de células da granulosa foram utilizados. Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 30-35 para uma gota de 200 µl de meio de maturação que consistiu de TCM 199 com sais de *Earl's* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (*Invitrogen*), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) 1 µg/mL de L-glutamina, 250 mg/mL de sulfato de amicacina, cobertas com óleo de silicone. Posteriormente, os ovócitos foram incubados por 22 horas a 39° C a 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima.

Após a maturação *in vitro*, os CCOs foram transferidos para uma gota de 200 µl de meio de fecundação *in vitro* que consistiu de TALP (Parrish et al., 1995) suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1 mM), epinefrina (250 mM) e heparina (10 µg/mL). Sêmen congelado de um touro com fertilidade *in vitro* conhecida, o qual tem sido utilizado



por muitos anos como touro referência no laboratório foi utilizado em todas as réplicas e tratamentos. As células espermáticas móveis foram selecionadas pelo gradiente de *Percoll* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) em microtubos (Machado et al., 2009). Os ovócitos foram colocados em meio de fecundação e co-incubados com espermatozóides à concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL por 20 h em estufa a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar com umidade máxima, sendo que o dia da inseminação *in vitro* foi considerado D0.

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gota de 200 µl de meio fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Holm et al, 1999). Os embriões foram co-cultivados com células do cumulus e avaliados no D2 para determinação da taxa de clivagem e no D6 e D7 para taxa de blastocisto. Embriões D7 foram classificados de acordo com o manual da IETS (Robertson & Nelson, 1998) e somente os blastocistos com qualidade grau I foram utilizados. Parte dos blastocistos de D7 foi transferida não cirurgicamente (n=10) para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo de receptoras previamente sincronizadas, 7 dias após o estro. Outra parte foi armazenada a -20°C em RNA Later (*Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA*) para avaliação da expressão gênica em PCR em tempo real (qPCR) e, o restante utilizado para cultivo no sistema PHD.

## 2.2. Produção *in vivo* de embriões

Para obter embriões *in vivo* que foram utilizados como grupo controle, doadoras foram submetidas a protocolos de superestimulação (SOV) com posterior inseminação artificial (IA) e coleta de embriões em D7,5. A emergência da onda foi sincronizada pela administração de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE, Ric-BE, *Syntex S.A*, Buenos Aires, Argentina) via intramuscular (i.m), e a inserção de dispositivo intra-vaginal de progesterona com 1.9 g de progesteron (CIDR, *Pfizer, Auckland, Nova Zelândia*) no D0. No D4, realizou-se um tratamento superestimulatório no total de 100 mg de NIH-FSH-P1, (Folltropin-V, *Bioniche Animal Health Canada Inc., Belleville, ON Canadá*) duas vezes ao dia com doses decrescentes até o dia 7. Na quinta e sexta aplicação de FSH, 150 mg de PGF2α foi aplicado por via i.m (Prólise, ARSA S.R.L, Buenos Aires, Argentina). O implante

de progesterona foi removido na sétima aplicação de FSHp.e a ovulação foi induzida com aplicação i.m, de 12,5 mg de hormônio luteinizante (Lutropin-V, *Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá*) 12h após a retirada do implante. Todas as doadoras foram inseminadas com doses de sêmen de mesmo touro e partida utilizados na PIV 12 e 24 horas após a administração de LH.

No D16, após o início do protocolo de superestimulação, embriões D7,5 foram recuperados utilizando lavagem uterina dupla de acordo com Castro Neto et al. (2005). Embriões grau I foram selecionados de acordo com manual da IETS (Robertson & Nelson, 1998) para serem transferidos para receptoras. Parte dos embriões (n=10) foi transferida de forma não cirúrgica ao corno uterino isplateral ao corpo lúteo de receptoras sincronizadas que entraram em estro 7,5 dias antes da transferência. E outra parte dos blastocistos foi armazenada em RNA *Later (Applied Biosystems)* à - 20°C para avaliação da expressão gênica em qPCR.

Para sincronização das receptoras que foram utilizadas para transferência de embriões PIV e *in vivo*, foi realizada no D0 a administração de 2,0 mg de benzoato de estradiol (*Syntex S.A*) via i.m associada a inserção de dispositivo intra-vaginal de segundo uso contendo 1,9 g de progesteron (*Pfizer*) . No D5, realizou-se um tratamento com 300 UI de ECG (hormônio glicoprotéico equino) via i.m., dose única e 75 mg/mL de PGF2 $\alpha$  também via im. No D8, retirou-se o implante vaginal e no D9, aplicou-se 1 mg de benzoato de estradiol (*Syntex S.A*). No D10, observou-se o cio das receptoras que foram utilizadas no D18 para a transferência dos embriões PIV e *in vivo*.

### **2.3. Coleta de embriões D14 das receptoras**

Após 7 dias da transferência de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* para receptoras, os embriões D14 foram coletados das receptoras com auxílio de uma sonda para coleta de embriões bovinos n° 22. Foram realizadas duas lavagens com 500 mL de meio PBS, em que o útero foi cuidadosamente manipulado para que os embriões fossem capturados em um frasco de Erlenmeyer. No laboratório, após a procura, todos os embriões foram mensurados e avaliados morfológicamente observando o aspecto do trofoblasto, que era claro

sem células extrusas e a presença do DE. Logo após essas avaliações o trofoblasto e o DE foram fotografados pela câmera e medidos pelo *Motic Image Plus 2.0*. Uma parte dos embriões foram biopsiados e a biópsia foi armazenada em solução de PBS sem cálcio, sem magnésio, sem antibiótico e sem SFB a - 20°C para posterior determinação do sexo. O restante do embrião foi guardado em Trizol (*Invitrogen*) a -20°C para avaliação da expressão gênica em qPCR. Na outra parte dos embriões D14 oriundos de receptoras, a porção onde o DE estava presente foi removida e fixada em solução de *Karnowsky* (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por 24 h a 4°C. Posteriormente, eles foram colocados em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,3) e estocados a 4°C até o processamento para avaliação da ultraestrutura. O restante dos embriões em que o DE foi removido foi armazenado para estudos posteriores.

#### **2.4. Sistema de desenvolvimento pós-eclosão *in vitro* (PHD)**

O sistema PHD consistiu na produção de túneis de gel de agar coberto com meio de cultivo conforme descrito por Brandão et al. (2004). Esses túneis foram construídos após a dissolução da agarose *low-melting-point* (15517-022, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) em água Milli-Q (AMQ) na concentração final de 2,4%. Foram adicionados após a dissolução da agarose 10% de SFB. Os túneis foram preparados pelo menos um dia antes de serem utilizados. As placas com os túneis imersos em meio PHD (Brandão et al., 2004) foram mantidos em incubadoras a 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar até sua utilização.

Os embriões grau I no dia 7 de desenvolvimento foram selecionados de acordo com manual da IETS (Robertson & Nelson, 1998) para permanecerem no cultivo para avaliações posteriores do protocolo do sistema PHD. Os embriões *in vitro* que permaneceram na gota de co-cultivo foram avaliados no D8, e aqueles com sinais de degeneração foram removidos. No D9, somente os blastocistos eclodidos e sem sinais de degeneração foram mantidos no sistema de cultivo, e 200 µl de meio PHD foram adicionados às gotas, aumentando seu volume final para 400 µl (1:1 SOFaaci e SOFaaci PHD). No D11, embriões foram avaliados sob um estereomicroscópio, e mensurados com auxílio da câmera *Motic Images Plus 2.0* e somente os que apresentavam um diâmetro  $\geq 0,5$  mm, com trofoblasto claro e massa celular compacta foram transferidos para túneis construídos com gel de agarose.

Neste momento, embriões com sinais visíveis de degeneração foram descartados. Com uma pipeta da Pasteur modificada com ponta arredondada, cada embrião foi gentilmente introduzido para interior dos túneis, onde permaneceram até o D14. O cultivo foi realizado em incubadoras a 39°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar. Os embriões D14 foram avaliados morfológicamente quanto à existência de células extrusas, trofoblasto claro e a presença do disco embrionário. Tanto o comprimento dos embriões quanto o DE foram mensurados com o programa *Motic Images Plus 2.0*. Os embriões alongados foram removidos do gel. Para isso foi realizado no gel um corte com lâmina de bisturi e com auxílio de uma ponteira de 1000 µl, os embriões foram lentamente retirados do túnel. Então, eles foram biopsiados com auxílio de uma lâmina de bisturi e o material guardado a -20 °C para determinação do sexo. O restante do embrião foi armazenado em reagente Trizol (*Invitrogen*) a -20 °C para análises no qPCR.

## **2.5 .Avaliação morfológica: microscopia de luz e microscopia eletrônica**

Para a análise por microscopia óptica e eletrônica os discos embrionários foram fixados em solução de *Karnowsky* (2% de paraformaldeído, 2% de glutaraldeído e 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) e lavados em tampão cacodilato de sódio (0,1M), pós-fixados em tetróxido de ósmio (1%), ferricianeto de potássio (0,8%) e desidratados em soluções crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incluídos em Spurr. Cortes semi-finos (3µm) foram realizados e corados com azul de toluidina para serem observados ao microscópio óptico. Os cortes ultrafinos (70nm) foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão. As características das células como integridade de membranas, organelas e citoplasma foram observadas e comparadas entre os grupos de embriões D14 coletados do útero de receptoras oriundos tanto da PIV quanto do protocolo da SOV.

## **2.6. Determinação do sexo**

A determinação do sexo foi realizada na biópsia armazenada a -80°C. Utilizou-se a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), em que foram utilizados dois pares de *primers* diferentes. O primeiro par de *primers* foi específico para uma região do cromossomo Y, enquanto o segundo era específico para uma região autossômica de gene autossômico

bovino. A amostra controle do cromossomo X e Y foram originadas de DNA genômico de um animal macho e de uma fêmea. Inicialmente, as biópsias foram expostas por 5 min a 50°C em uma solução lise contendo 1X tampão de PCR, e 15 µg de proteinase K (*Invitrogen*) em um volume final de 10 µL; posteriormente a proteinase K foi inativada a 95 °C por 5 min. O PCR foi realizado pela adição, em cada amostra colocada em microtubos, de um mix de PCR contendo 20 nM de cada par dos *primers*, 200 µM de dNTPs, tampão da enzima 1X e 1U Taq Polimerase Platinun (*Invitrogen*), com volume final de 30 µL. O programa do PCR utilizado consistiu de 40 ciclos de 94°C por 20s, 57°C por 30s e 72°C por 30s, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação do PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), e visualizado sob iluminação ultra-violeta (UV). Quando dois *amplicons* foram detectados o embrião foi considerado macho, enquanto a detecção de um *amplicon* foi fêmea.

## 2.7. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os embriões D7 tanto *in vivo* quanto *in vitro* foram distribuídos aleatoriamente para formação de 3 pools com 18 blastocisto expandidos em cada. A extração de RNA desses embriões foi realizada utilizando o kit de extração *RNeasy Plus Micro Kit* (*Qiagen*, Valencia, CA, USA).

Para os embriões D14, após a determinação do sexo, formaram-se quatro pools contendo três embriões machos/pool. Em cada pool de embriões, foram adicionados 50 µL de Trizol (*Invitrogen*) e 12,5 µg de glicogênio. A extração do RNA total foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para a síntese de cDNA, o RNA total foi incubado com 1U de DNase I (*Invitrogen*) e a transcrição reversa foi realizada com 200U de SuperScript III (*Invitrogen*) e 0,5 µg de primer oligo-dT<sub>12-18</sub> (*Invitrogen*) num volume final de 25 µL. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 min e 42 °C por 52 min, seguindo da inativação por enzima a 70 °C for 15 min no termocilcador *MJ Research PTC – 100 Thermo Cycler* (GMI, Ramsey, Minnesota, USA).

## 2.8 PCR em Tempo real (qPCR)

A abundância relativa dos genes foi determinada pela técnica de qPCR em que o foi utilizado o protocolo de amplificação do *kit Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA)*. As reações de amplificação consistiram de volume final de 25  $\mu$ l, utilizando o cDNA correspondente a 0,12 embriões D14 e foram realizadas na máquina de PCR 7500 *Fast Real- Time PCR System (Applied Biosystems)*. O programa da qPCR utilizado consistiu de um passo a 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 15 s e a temperatura à 60 °C por 1min. Para os genes em que a temperatura de anelamento foi diferente de 60 °C (Tabela 4.1) um passo foi adicionado a 72 °C por 1 min. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas a fim de propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em triplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente. Os produtos de cada PCR foram determinados pela análise de curva do *melting* e o tamanho do *amplicon* determinado no gel de agarose. As reações para determinar à eficiência de amplificação de cada gene que foi superior a > 90%, foi determinada pela curva padrão no software 7500 versão 2.0.3 (*Applied Biosystems*). As sequências, concentração dos *primers*, e números de acessos do *GenBank*, tamanho dos amplicons e as temperatura de anelamento de cada gene estão listados na Tabela 4.1.

A abundância relativa de cada gene foi obtida após a normalização com gene constitutivo *PPIA*, que se mostrou mais estável em relação ao *GAPDH* e à *H2A* pela avaliação no programa *gNorm (Microsoft)*. Os resultados foram expressos em relação a uma amostra controle utilizando o método  $\Delta\Delta C_t$  e eficiência de correção utilizando a equação de Pfaffl (2001).

Tabela 4.1. As sequências, as concentrações dos *primers*, e os números de acessos do *GenBank*, tamanho dos amplicons e as temperatura de anelamento de cada gene utilizado para expressão gênica no PCR tempo real (qPCR).

Gene	Sequência do primer	Tamanho do amplicon	Temperatura de anelamento	Concentração do primer	Número de acesso do GenBank/referência
<i>PPIA</i>	F 5'GCCATGGAGCGCTTTGG 3'	65 pb	60 °C	300 nM	BC_105173
	R 5'CCACAGTCAGCAATGGTGATCT 3'				
<i>CD9</i>	F: CAC ATC AGT CCA ACC CAG AC	146pb	60 °C	300 nM	NM_173900/EI-Sayed <i>et al.</i> 2006
	R: AAT CGG AGC CAT AGT CCA AC				
<i>HSP70</i>	F: CAA GAT CAC CAT CAC CAA CG	219pb	55°C	300 nM	JN604432.1
	R: AAA TCA CCT CCT GGC ACT TG				
<i>MNSOD</i>	F: TTG CTG GAA GCC ATC AAA CGT GAC	135pb	55°C	300 nM	NM_201527
	R: AAT CTG TAA GCG TCC CTG CTC CTT				
<i>KRT8</i>	F 5'TGTGAAGAAGATTGAGACCCGCGA 3'	160 pb	60°C	300 nM	X12877/EI-Sayed <i>et al.</i> 2006
	R 5'AAACCTCAGGTCTCCTGTGCAGAT 3'				
<i>PLAC8</i>	F 5'GACTGGCAGACTGGCATCTT 3'	140 pb	60°C	300 nM	NM_016619/EI-Sayed <i>et al.</i> 2006
	R 5'CTCATGGCGACACTTGATCC 3'				
<i>SLC2A1</i>	F 5'CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC 3'	258 pb	60°C	300 nM	BT029806
	R 5'CAAAATAGCGACACGACAGT 3'				
<i>SLC2A3</i>	F 5'ACTCTTCACCTGATTGGCCTTGGA 3'	145 pb	60°C	300 nM	NM_174603.3
	R 5'GGCCAATTTCAAAGAAGGCCACGA 3'				
<i>INFT</i>	F 5'GCAGATGGTGATTGCAGCCATGAA 3'	194 pb	62°C	150 nM	AF238612
	R 5'CTTTGGCGCTCAGCTTTCTTCACA 3				

## 2.9. Análise estatística

Para avaliação da taxa de recuperação dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e coletados do útero das receptoras no D14, e dos embriões cultivados no sistema PHD, utilizou-se o modelo linear generalizado, em que foi atribuída distribuição binomial do programa de linguagem estatística R (*R Development Core Team*, 2010, Viena, Áustria). A proporção de embriões com o DE foi avaliadas pelo teste  $\chi^2$ . Os resultados da expressão gênica, o tamanho dos embriões e do DE foram avaliados utilizando o teste t ou teste de *Mann-Whitney* para aqueles que apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Para estas avaliações utilizou-se o programa Prophet Program, versão 5.0, 1997.

## 2.10. Delineamento experimental

Este estudo visou avaliar o desenvolvimento pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* em dois sistemas distintos, o útero de receptoras temporárias e o sistema PHD. Para isso, os embriões produzidos *in vitro* de D7 foram distribuídos em três grupos, um grupo foi cultivado no sistema PHD até D14, outro foi transferido para o útero de receptoras e coletados em D14, e o outro estocado em RNA *later* (*Applied Biosystem*) a - 20°C para posterior análise da expressão gênica. Como grupo controle foi utilizado embriões produzidos *in vivo* por superestimulação ovariana e lavagem uterina em D7. Quanto aos embriões *in vivo* de D7, uma parte foi transferida para o útero de receptoras e a outra estocada em RNA *later* (*Applied Biosystem*). No D14 de desenvolvimento, os embriões foram recuperados do útero por lavagem uterina e removidos dos túneis do sistema PHD. Os embriões D14 dos três grupos, *in vitro* cultivado no PHD, *in vitro* cultivados no útero e *in vivo* cultivados no útero foram então avaliados quanto à taxa de recuperação, ao tamanho total e à presença e tamanho do disco embrionário (DE).

A análise ultra-estrutural da região do epiblasto também foi comparada entre embriões D14 de PIV e *in vivo* coletados de útero de receptoras, já que eles apresentavam semelhança morfológica na avaliação sob estereomicroscópio.



Para avaliar o perfil molecular, a expressão de genes envolvidos com o metabolismo da glicose– *solute carrier family 2* (facilitated glucose transporter), member 1 (*SLC2A1*) e member 3 (*SLC2A3*), desenvolvimento da placenta – *placenta-specific 8* (*PLAC8*), *keratin proteins 8* (*KRT8*), implantação – *tetraspanin* (*CD9*), estresse térmico e oxidativo– *70 kilodalton heat shock proteins* (*HSP70*), *manganese superoxide dismutase* (*MnSOD*), e reconhecimento materno da prenhez – *interferon-tau* (*IFNT*), foram quantificados nos embriões de D7 e de D14.

### 3. RESULTADOS

Foi produzido um total de 656 embriões *in vitro* no D7 e 233 *in vivo* no D7,5, sendo que na avaliação dos embriões *in vivo* observou-se uma maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de blastocisto na fase inicial (8,15%) do que nos embriões produzidos *in vitro* (1,98%). Entretanto, uma maior proporção ( $P < 0,05$ ) dos embriões *in vitro* (71,34%) do que dos *in vivo* (63,09%) encontravam-se no estágio de blastocistos expandido (Figura 4.1). Do total dos embriões produzidos, 128 (20%) embriões *in vitro* e 137 (59%) *in vivo* foram transferidos para receptoras. Esses embriões eram grau I de acordo com manual da IETS (Robertson & Nelson, 1998). Desses, 64 (50%) dos *in vitro* e 53 (38,6%) dos *in vivo* foram recuperados no D14, sete dias após a transferência múltipla. A taxa de recuperação foi semelhante entre esses dois grupos (razão de verossimilhança ( $rv$ ) = 1,33, grau de liberdade ( $gl$ ) = 1,  $P = 0,25$ ). Dos embriões *in vitro* de D7, 473 blastocistos foram submetidos ao sistema PHD, sendo que 81 (17,1%) apresentavam em D11 um diâmetro  $\geq 0,5$  mm, trofoblasto claro e massa celular interna bem definida e foram colocados nos túneis de agarose. No D14, somente 14 (3%, 14/473) cresceram e apresentavam aparência normal. Portanto, a porcentagem de embriões obtidos no grupo que foi cultivado no sistema PHD foi muito inferior ( $P < 0,05$ ) a dos obtidos nos grupos, *in vivo* e *in vitro*, cultivados no útero de receptoras.

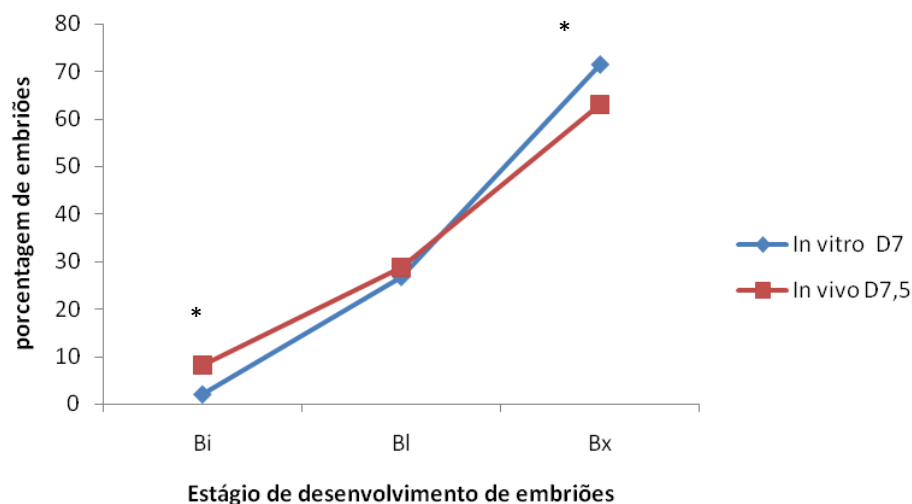


Figura 4.1. Distribuição do estágio de desenvolvimento dos embriões *in vivo* coletados em D7,5 de doadora superestimuladas e de embriões produzidos *in vitro* no dia D7 de cultivo. Bi – blastocisto inicial, Bl – blastocisto, Bx – blastocisto expandido.\* Diferença estatística entre os grupos,  $P < 0,05$ .

Quanto às características morfológicas dos embriões no D14, aqueles cultivados no útero de receptoras, apresentavam na maioria uma forma tubular, sendo o tamanho semelhante, para os embriões *in vitro* ( $19,06 \pm 2,43$  mm) e *in vivo* ( $24,18 \pm 3,71$  mm). Apesar disso, uma grande variação no comprimento dos embriões foi observada nos dois tipos de embriões (Tabela 4.2). Em contraste, os embriões *in vitro* cultivados no sistema PHD mostraram um menor tamanho ( $2,92 \pm 0,45$  mm) quando comparados aos embriões de ambos os grupos cultivados no útero de receptoras (Tabela 4.2).

A presença do DE foi detectado em somente 26,4 % ( $n=14/53$ ) e 25,0 % ( $n=16/64$ ) dos embriões D7 *in vivo* e *in vitro* recuperados no D14, respectivamente (Tabela 4.2). Nenhuma diferença foi observada nas características morfológicas do DE avaliadas no estereomicroscópio entre os grupos de embriões cultivados no útero. Nesses, o DE apresentava-se como uma saliência distinta do trofoblasto (Figura 4.2 B e 4.2 C) e mediram  $0,29 \pm 0,03$  mm (*in vivo*) e  $0,28 \pm 0,01$  mm (*in vitro*). Em contraste, o DE dos embriões *in vitro* D7 submetidos ao cultivo PHD apresentava-se como um agregado de células, com aparência morfológica diferente da dos demais grupos (Figura 4.2 A) e diâmetros inferior ( $0,14 \pm 0,007$  mm) ao dos embriões dos demais grupos.

Tabela 4.2 – Média do tamanho do trofoblasto, porcentagem de embriões D14 com disco embrionário (DE) e diâmetro do DE nos três tipos de embriões D14: embriões *in vivo* D7 no útero de receptoras, embriões *in vitro* D7 no útero de receptoras e *in vitro* D7 no sistema PHD. N: número de embriões do D14 de desenvolvimento obtido de receptoras e do sistema PHD.

Embriões D14	N	Tamanho do embrião	Intervalo de tamanho dos D14	N. embriões com DE	Botão embrionário
<i>In vivo</i> D7/útero de receptora	53	24,18 ± 3,71 mm <sup>a</sup>	0,60 – 90,00 mm	14	0.29 ± 0.030 mm <sup>a</sup>
<i>In vitro</i> D7/útero de receptora	64	19,06 ± 2,43 mm <sup>a</sup>	0,57 – 57,10 mm	16	0.28 ± 0.010 mm <sup>a</sup>
<i>In vitro</i> D7/sistema PHD	14	2,92 ± 0,45 mm <sup>b</sup>	1,66 – 6,60 mm	9	0.14 ± 0.007 mm <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Diferentes subscrito na mesma coluna representa diferença estatística (p<0.05).

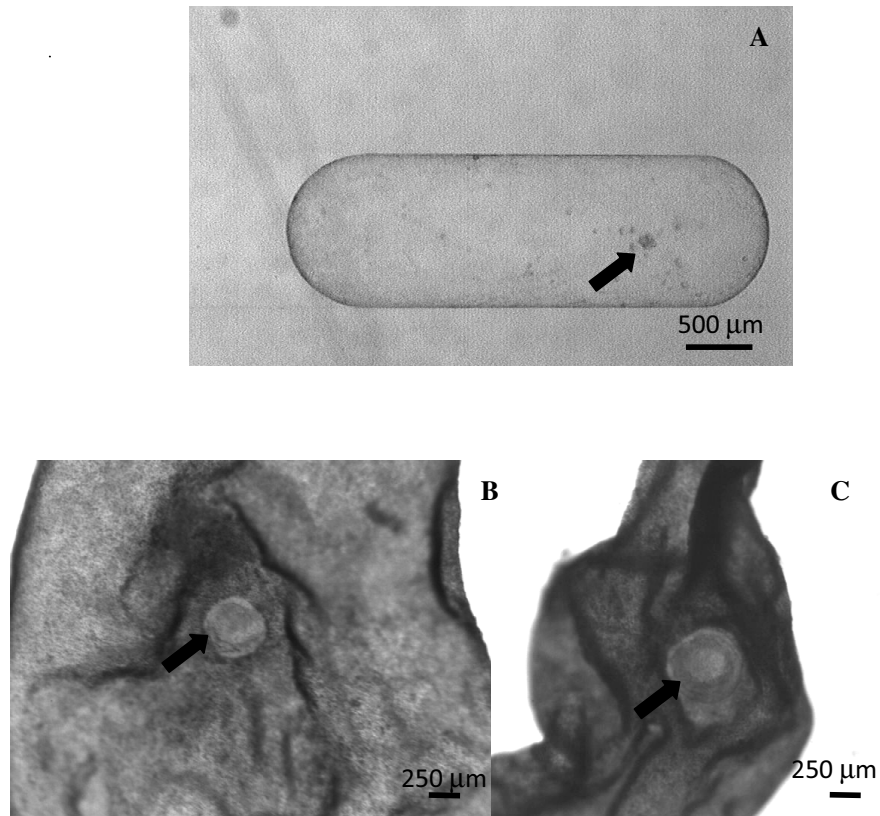


Figura 4.2. Fotografia representativa do disco embrionário de bovinos avaliados em estereomicroscópio: (A) Na seta observa-se o possível disco embrionário que se assemelha a um aglomerado de células, que foi considerado com disco embrionário íntegro de embrião D14 produzido *in vitro* até D7 e no sistema de cultivo *post-hatching development* – PHD até D14; (B) Seta indica disco embrionário íntegro de embrião D7 *in vivo* cultivados no útero de receptoras até D14; (C) Seta indica disco embrionário íntegro de embrião D7 produzido *in vitro* até D7 e cultivados no útero de receptoras até D14.

Para avaliação da histologia, foram utilizados os discos embrionários dos embriões D14 coletados do útero de receptoras oriundos de embriões D7 produzidos *in vitro* e *in vivo*, pois esses discos embrionários foram semelhantes na avaliação pelo estereomicroscópio (Figura 4.2 B e 4.2 C). Foram avaliados por microscopia de luz embriões D14 (n=5) originários da PIV e produzidos *in vivo* (n=7), sendo que para análise

ultraestrutural três embriões de cada grupo foram utilizados. A região do epiblasto, que continha células mais alongadas e em várias camadas, que foram diferentes das células do trofoblasto, em que as células eram cubóides (Figura 4.3 A e 4.3 B). O hipoblasto estava presente tanto dos embriões D14 oriundos de embriões produzidos *in vitro* como dos *in vivo*. Não foram observados vacúolos e nem sinais de degeneração em nenhum dos discos embrionários avaliados. Quanto à análise ultra-estrutural, os dois tipos de embriões foram semelhantes, sem sinais de degeneração. Observaram-se mitocôndrias com a presença de cristas, abundantes e distribuídas nas células; vacúolos de lipídios; e as células estavam justapostas, com ausência de vacúolos e de espaços vazios (Figura 4.3 C, 4.3 D, 4.3 E, 4.3 F).

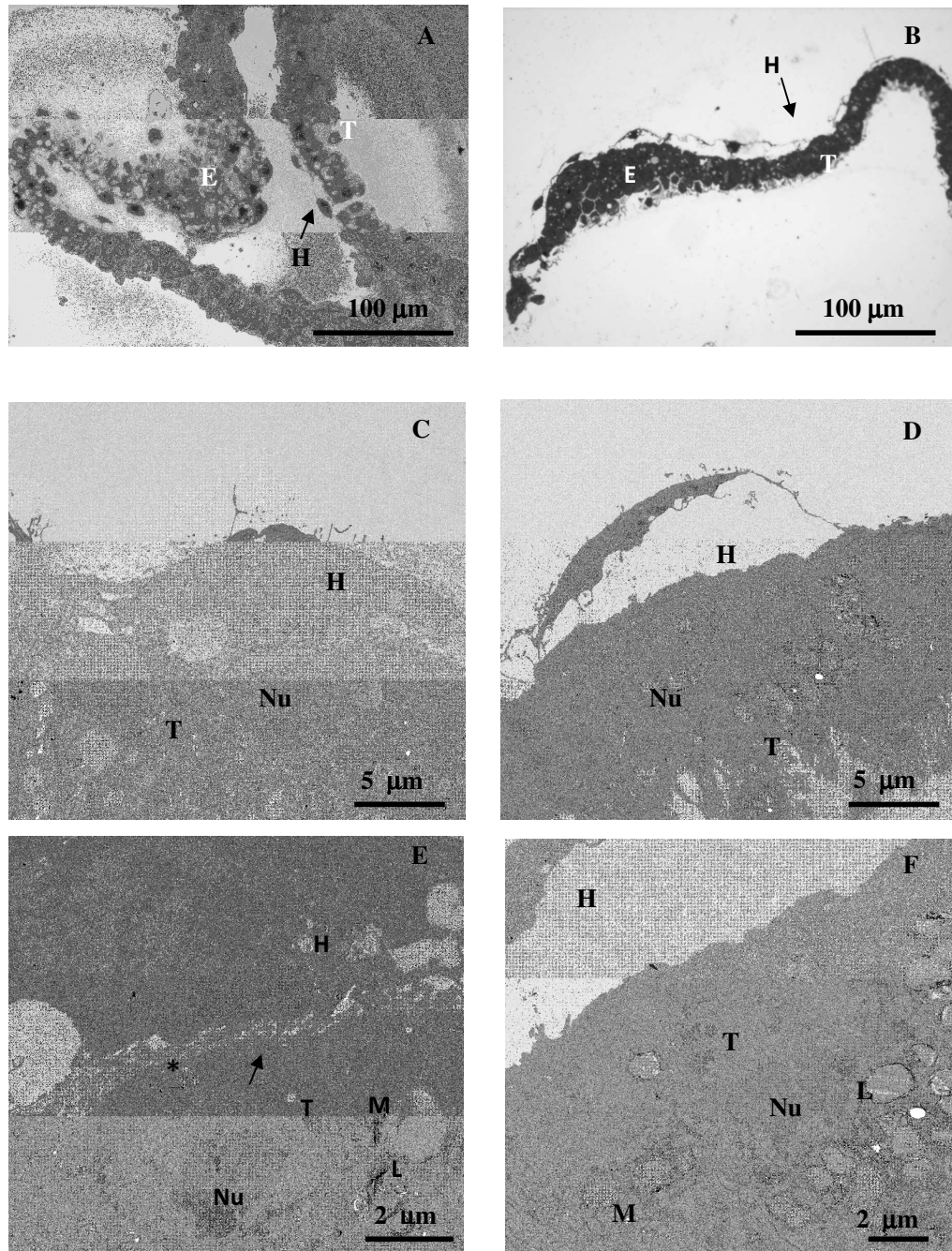


Figura 4.3. Embrião bovino do dia 14 de desenvolvimento (D14). Fotomicrografia em microscopia de luz de embrião D14 coletado do útero de receptoras oriundos de embriões D7 produzido *in vivo* (A) e produzidos *in vitro* (B). Epiblasto (E), trofoblasto (T) e hipoblasto (H). Fotomicrografica em microscopia eletrônica de transmissão do embrião D14 coletado do útero de receptoras oriundos de embriões D7 produzido *in vivo* (C,E), e produzidos *in vitro* (D, F). Regiões entre o trofoblasto e hipoblasto. M = mitocôndrias, L=vesículas de lípidios, Nu = nucléolo, asterisco = lâmina basal, seta = projeções do hipoblasto para o trofoblasto.

Para verificar a qualidade dos embriões de D7 usando o perfil molecular como parâmetro oito genes foram analisados por qPCR (Figura 4.4). Uma maior expressão dos genes *HSP70* (P=0,005) e *SLC2A1* (P=0,04) foi detectada nos embriões de D7 produzidos *in vitro* do que produzidos *in vivo*. Nenhuma diferença foi encontrada entre esses embriões para os demais genes avaliados.

A expressão dos mesmos genes avaliados em embriões de D7 foi quantificada nos embriões de D14 dos três diferentes grupos. Os resultados mostraram que nenhum dos oito genes estudados foram diferencialmente expressos entre os grupos de embriões cultivados *in vivo* no período pós-eclosão. Por outro lado, três genes *SLC2A3* (P=0,06), *MnSOD* (P=0,01) e *PLAC8* (P=0,05) (Figura 4.5) apresentaram maior nível de expressão nos embriões *in vitro* cultivados no sistema PHD do que os embriões que foram cultivados no útero de receptoras (Figura 4.5).



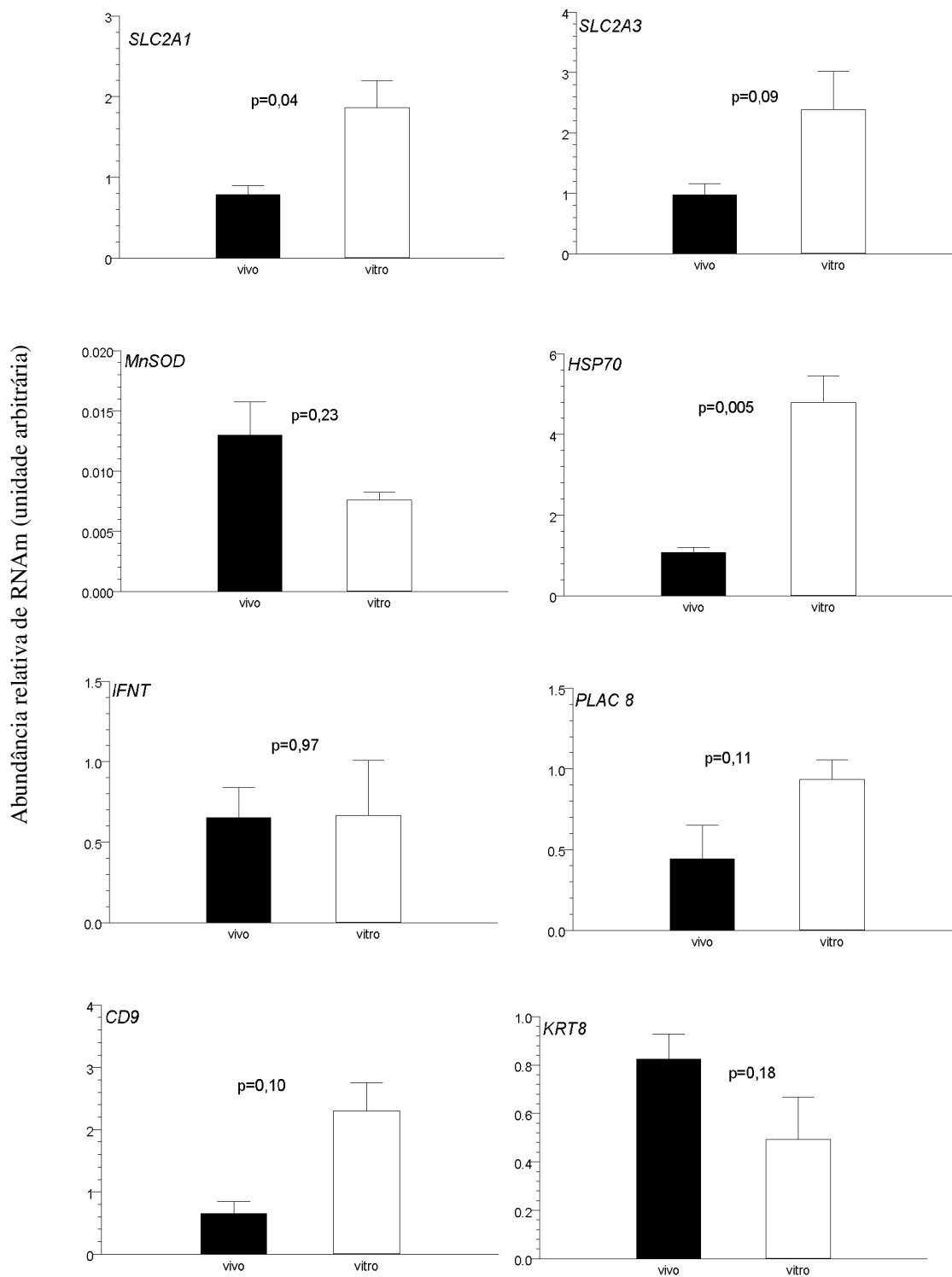


Figura 4.4. Abundância relativa de RNAm dos genes *SLC2A1*, *SLC2A3*, *MnSOD*, *HSP70*, *IFNT*, *PLAC8*, *CD9* e *KRT8* que foram determinados por qPCR em embriões D7 bovinos produzidos *in vivo* (vivo) e *in vitro* (vitro). A análise da expressão gênica foi realizada com pools constituídos de 18 embriões. Os dados foram normalizados

com a fórmula  $\Delta\Delta CT$  (Pfaffl,2001). utilizando gene constitutivo *PPIA* e controle endógeno.

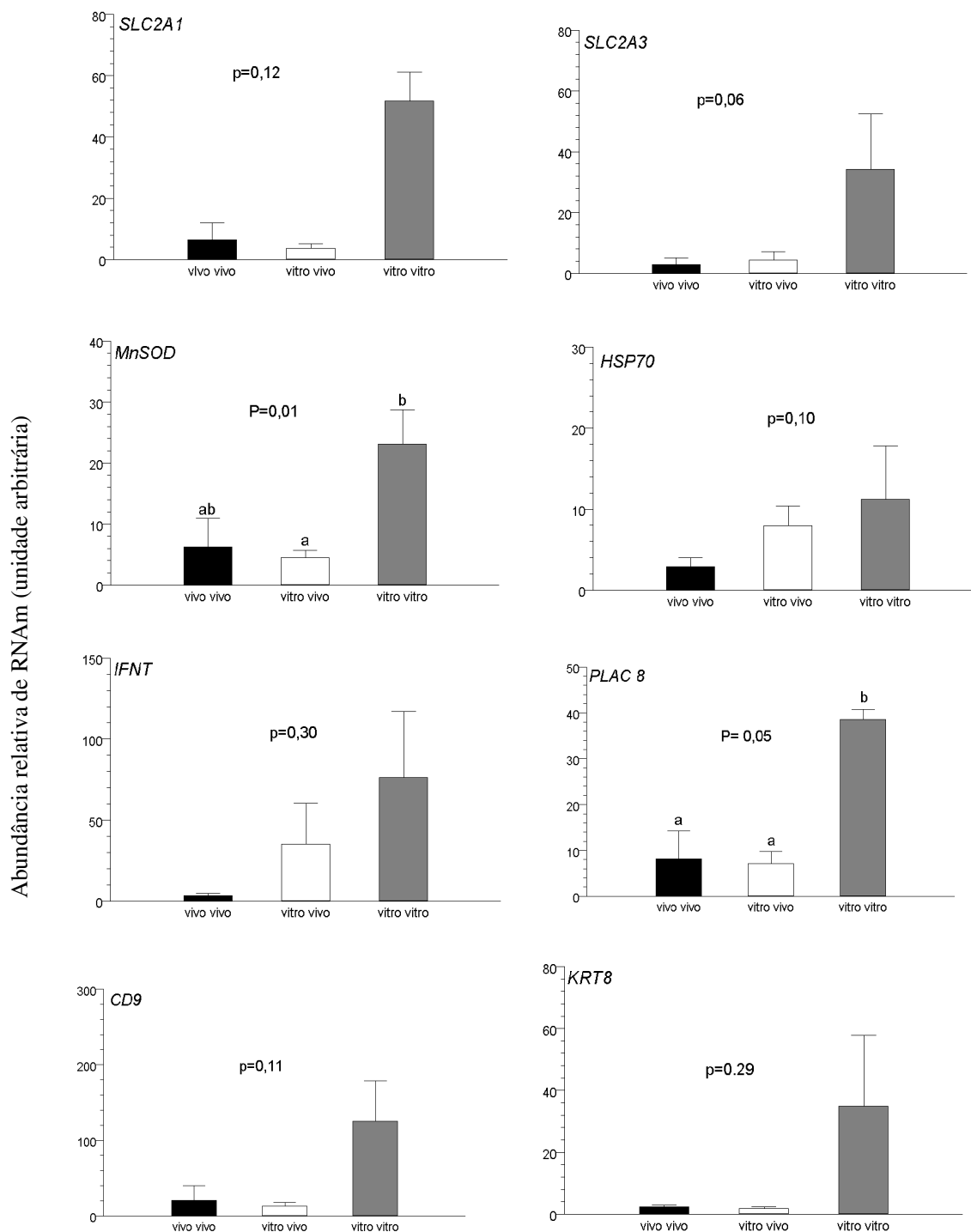


Figura 4.5. Abundância relativa de RNAm dos genes *SLC2A1*, *SLC2A3*, *MnSOD*, *HSP70*, *IFNT*, *PLAC8*, *CD9* e *KRT8* determinada por qPCR em embriões bovinos D14. Grupos: “vivo vivo”: embriões produzidos no útero de doadoras coletados no dia 7, quando foram transferidos para receptoras sincronizadas e recuperados no dia 14 de desenvolvimento; “vitro vivo”: produzidos *in vitro* até o dia 7 de

desenvolvimento, quando foram transferidos para receptoras sincronizadas e recuperados no dia 14 de desenvolvimento; “vitro vitro”: *in vitro* até o dia 7 de desenvolvimento, quando foram transferidos para o sistema de cultivo *in vitro* pós-eclosão e recuperados no dia 14 de desenvolvimento. A análise da expressão gênica foi realizada com 4 pools constituídos 3 embriões para cada grupo. Os dados foram normalizados com a fórmula  $\Delta\Delta CT$  (Pfaffl,2001) utilizando gene constitutivo *PPIA* como controle endógeno.

#### 4. DISCUSSÃO

Os embriões oriundos de técnicas de reprodução assistida diferem daqueles produzidos *in vivo* quanto à competência de desenvolvimento, apresentando em geral taxas de prenhez inferiores (Farin et al., 2006). Esses embriões normalmente são avaliados em D7 e, poucos estudos têm focado no período pós-eclosão, em que ocorrem as maiores perdas embrionárias (Diskin & Morris, 2008; Alexopoulos & French, 2009). O presente estudo visou avaliar o desenvolvimento e qualidade de embriões D7 produzidos *in vitro*, e cultivados até o D14 no sistema PHD e no útero de receptoras sincronizadas.

Quanto à taxa de recuperação de embriões de D14, observou-se uma semelhança entre os embriões D7 produzidos *in vitro* e *in vivo* após a transferência múltipla. Os resultados desse tipo de procedimento relatados na literatura são muito variáveis. Uma maior taxa de recuperação de embriões PIV do que embriões clonados por transferência nuclear foi observada no D14 de desenvolvimento (Alexopoulos & French, 2009). Entretanto, outros estudos verificaram que a taxa de recuperação foi semelhante entre os embriões PIV e clonados no D17 (Rodríguez-Alvarez et al., 2010) e entre os embriões PIV e controle (embriões *in vivo*) (Bertolini et al., 2002). O sucesso do desenvolvimento embrionário até esse estágio depende não só da qualidade do embrião (Farin & Farin, 1995) como também da origem do embrião (Bauersachs et al., 2009) e da sua interação com endométrio uterino da receptora (Mansouri-Attia et al., 2009; Clemente et al., 2011; Mamo et al., 2011). Porém, quando se comparou a recuperação de embriões D14 no sistema PHD com os de transferência múltipla observou-se que a proporção de embriões obtidos nesse sistema foi muito inferior. Isso mostra que o sistema de cultivo PHD ainda é ineficiente para o cultivo dos embriões nessa fase, o que pode ser devido não só à ausência de substâncias essenciais – aminoácidos, fatores de crescimento – para desenvolvimento dos embriões nesse estágio e que estão presentes no útero (Garner, 2008), mas também pela limitação do espaço físico.

Quanto às características morfológicas e ao tamanho dos embriões D14 oriundos tanto da produção *in vitro* quanto da produção *in vivo* D7, verificou-se que eles eram semelhantes, inclusive com a mesma variação no tamanho. Estudos prévios que avaliaram embriões pós-eclodidos bovinos *in vivo* e *in vitro* observaram que é comum a variação no tamanho dos embriões coletados no estágio pós-eclosão (Bertolini et al., 2002; Maddox-Hyttel et al., 2003; Clemente et al., 2009). Provavelmente, essa ampla diferença de tamanho é causada devido à transferência múltipla para uma única receptora, o que contraria a fisiologia reprodutiva do bovino. Por outro lado, a qualidade dos embriões também tem sido associada ao grau de alongamento no D17 e D18 (Farin et al., 1999; Hue et al., 2000). Essa relação entre qualidade e tamanho pode ser confirmada por estudos que mostram que embriões oriundos de clonagem, de PIV e de produção *in vivo* após a inseminação artificial estimulam a reação do endométrio uterino de forma diferente (Mansouti-Attia et al., 2009), alterando o padrão do desenvolvimento embrionário. Portanto, a variação no tamanho dos embriões também pode estar associada a diferenças na qualidade entre os embriões. Considerando, que inúmeros estudos mostram que o embrião *in vitro* é inferior ao *in vivo*, poderia se esperar que os *in vitro* apresentassem um tamanho menor que os *in vivo*. Contudo, a semelhança no padrão de desenvolvimento entre os dois tipos de embriões indica que a fonte do embrião não influenciou o seu crescimento. Ou também que os embriões PIV que foram transferidos eram de excelente qualidade e, possivelmente, resultariam em prenhez.

Já o tamanho dos embriões D14 produzidos totalmente *in vitro* no sistema PHD foi menor do que ambos os grupos coletados das receptoras. Entretanto, foi semelhante ao tamanho observado em outros estudos que também utilizaram o sistema PHD (Brandão et al., 2004; Machado *et al.* 2011). Essa discrepância de tamanho era esperada, pois o meio de cultivo e a estrutura física do sistema PHD ainda não estão adequados para esse estágio. Sabe-se que o sistema reprodutor da fêmea contém níveis de aminoácidos e carboidratos ideais para cada estágio do desenvolvimento embrionário. Além de células epiteliais uterinas que removem fatores tóxicos que favorecem o desenvolvimento embrionário (Garner, 2008). Considerando que o estágio de alongamento é um indicador de qualidade e viabilidade embrionária (Fisher-Brown et al., 2004; Clemente et al., 2009), os embriões cultivados no sistema PHD possuem qualidade inferior do que os mantidos no útero de receptoras. Pois apesar do tamanho do túnel ser limitado, em nenhum caso foi observado à tentativa do

embrião de sair do túnel devido ao crescimento excessivo. Apesar de não esperar que os embriões do sistema PHD tivessem um tamanho semelhante aos dos coletados do útero da receptora, era esperado que uma maior quantidade de embriões crescessem no túnel visto que a qualidade dos embriões que foram destinado ao sistema PHD foi semelhante aos dos transferidos para receptoras.

Além do crescimento do embrião, é importante verificar a presença e a qualidade do DE em embriões do D14, pois aqueles que apresentam disco embrionário sem sinais de degeneração estão relacionado com sucesso de prenhez (Fischer-Brown et al., 2004). No presente estudo, verificou-se semelhança morfológica dos DEs, quanto ao aspecto e tamanho, entre os embriões D14 oriundos da PIV ou SOV. Entretanto, menos de 30% dos embriões D14 recuperados de receptoras tanto dos *in vitro* quando dos *in vivo* apresentaram o DE íntegro. A porcentagem de embriões pós-eclosão com presença de DE nesse estudo foi semelhante à porcentagem de embriões oriundos de transferência nuclear coletado por Alexopoulos et al. (2009) e inferior a encontrado por Bertolini et al. (2002) e Fischer-Brown et al. (2004) em embriões PIV. Um fator importante a ser considerado quando se avalia essas diferenças entre os trabalhos é que muito conceptos colabam devido ao rompimento do trofoblasto causado pelo procedimento de coleta, o que afeta a visualização do DE (Bertolini et al., 2002). Além disso, em alguns embriões o DE pode estar presente ao longo do trofoblasto, mas sua detecção é falha devido ao método de imagem utilizado (Fischer-Brown, et al., 2004). Portanto, é importante ressaltar que no presente estudo apenas aqueles embriões com DE evidente foram considerados. Apesar disso, o diâmetro do disco embrionário dos embriões *in vivo* e *in vitro* encontrado nesse estudo foi semelhante ao encontrado por Maddox-Hyttel et al. (2003) e Fischer-Brown et al. (2004). Isso mostra que o tamanho do DE dos dois tipos de embriões D14 coletados do útero de receptoras no presente estudo corrobora com outros autores e permite inferir, mais uma vez que os embriões PIV eram de boa qualidade e com boa probabilidade de sucesso de prenhez. Porém, o disco embrionário dos embriões cultivados no sistema PHD foi menor e possuía aspecto morfológico diferente daqueles obtidos do útero de receptoras. Mas que apesar disso, Brandão et al. (2004) mostraram que em embriões desse sistema ocorre a formação de epiblasto e de hipoblasto, ou seja, apesar de morfológicamente diferente em relação aos embriões oriundos de receptoras é possível a formação dos folhetos embrionários.

Está bem estabelecido na literatura que os embriões produzidos *in vitro* possam diferir dos *in vivo* apesar de serem morfológicamente normais (Niemann & Wrenzycki, 2000). Essas diferenças são detectadas, principalmente, com a utilização de estudos do transcriptoma bovino que mostram os genes diferencialmente expressos entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (El-Sayed et al., 2006; Mamo et al., 2011; Clemente et al., 2011). Por isso, a determinação da expressão gênica é uma ferramenta utilizada para prever a qualidade dos embriões e compreender os eventos que provocam a mortalidade embrionária (El-Halawany et al., 2004; Wrenzycki et al., 2007). No presente estudo, dos oito genes avaliados, verificou-se que dois, ou seja, 25% dos genes avaliados apresentaram-se com maior expressão, nos embriões D7 produzidos *in vitro* do que nos *in vivo*. Talvez essa diferença fosse maior caso utilizasse embriões *in vivo* sem estimulação hormonal ovariana, pois se sabe que os hormônios utilizados no protocolo de superestimulação afeta a expressão de genes dos embriões (Mundim et al., 2009).

Em relação aos genes relacionado ao estresse – *HSP70* e *MnSOD* –, apenas o *HSP70* teve maior expressão nos embriões D7 produzidos *in vitro*. A *HSP70* é considerada uma chaperona que interage com outras proteínas para prevenir a agregação e garantir uma localização celular adequada (Christopher Luft and Dix, 1999). Sabe-se que a ativação das *heat shocks protein* está relacionada não só com a variação de temperatura, mas também com estresse celular, estresse osmótico, peróxido de hidrogênio, fosforilação, infecção e inflamação (Paula-Lopes and Hansen, 2002; Fiorenza et al., 2004; Ahn and Thieli, 2003). Além disso, o ambiente e meio de cultivo (Sagirkaya et al., 2006; Lazzari et al., 2002), a manipulação e o sexo dos embriões (Lazzari et al., 2002; Morton et al., 2007) podem alterar a expressão do gene *HSP70*. Apesar desse gene não ser mencionado em alguns trabalhos que comparam embriões bovinos utilizando a análise do transcriptoma (El-Sayed et al., 2006; Mamo et al., 2011), ele parece ser um gene bastante sensível às manipulações como mostrado em vários trabalhos, tanto é que Clemente et al. (2011) detectaram a diferenças na expressão de um gene da família das “*heat shock protein*” (*HSPA5*) entre embriões bovinos *in vivo* e *in vitro* no D7 e no D13. No presente estudo, esse gene mostrou-se alterado em embriões PIV, possivelmente, devido a todo processo de manipulação que pode ter estimulado a expressão com o objetivo de garantir a sua sobrevivência no ambiente *in vitro*. Por outro lado, o gene *HSP70* mostrou maior abundância relativa em embriões D14 totalmente *in vivo* em relação aos totalmente *in vitro* no capítulo 3 (Figura 3.2). Isso pode ter ocorrido neste experimento



porque os embriões totalmente *in vivo* foram mantidos no útero de receptoras superovuladas, que teoricamente possuem elevadas concentrações de progesterona, por sete dias, o que pode ter estimulado essa expressão nos embriões *in vivo*. Ou também pode ter ocorrido uma queda dos transcritos do gene *HSP70* nos embriões totalmente *in vitro* para produção de proteína. Concluiu-se então que a expressão gênica do *HSP70* é muito variável em função do ambiente.

Já os genes *SLC2A1* e *SLC2A3* são importantes transportadores de glicose, o principal substrato energético embrionário no estágio pós-compactação, para o interior do embrião (Harvey et al., 2004). Nesse estudo, somente o *SLC2A1* estava *up-regulated* nos embriões D7 produzidos *in vitro*. Porém, Lazzari et al. (2002) não detectaram diferenças na expressão de *SLC2A1* entre os embriões D7 produzidos *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, há relatos da abundância relativa de *SLC2A1* ser maior em embriões *in vivo* do que embriões PIV em D7 (Balasubramanian et al., 2007) e também em embriões produzidos totalmente *in vitro* até o D14 (Figura 3.2). Bertolini et al. (2002) mostraram que a baixa expressão do gene *SLC2A1* em embriões PIV quando comparado com os produzidos *in vivo* possa estar relacionado com o crescimento retardado dos conceitos PIV no D16. Porém, isso não se justifica no presente estudo em embriões D7 *in vitro* cultivados no útero de receptoras já que eles apresentaram desenvolvimento semelhante aos *in vivo* no D14.

Após a transferência dos embriões D7, tanto daqueles produzidos *in vivo* quanto *in vitro*, para o útero de receptoras as diferenças na expressão dos genes anteriormente encontradas em embriões D7 não se observaram em embriões D14. Provavelmente as diferenças que existiam entre os embriões D7 foram minimizadas pelo ambiente uterino, incluindo a presença de secreções que exercem funções particulares importantes para a sobrevivência e crescimento do conceito em ruminantes, principalmente no estágio pré-implantação (Clemente et al., 2011). Entretanto, é importante observar que os embriões *in vivo* utilizados neste estudo foram originários de doadora superestimuladas, que foram expostas a altas concentrações hormonais que podem causar alteração na expressão gênica. Portanto, se embriões utilizados tivessem sido produzidos em fêmeas não superovuladas, é possível que uma maior diferença entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* tivesse sido encontrada (Mundim et al., 2009). Mansouti-Attia et al. (2009) encontraram alterações em numerosos genes envolvidos com a produção de ATP no endométrio que recebeu o embrião clone além da super-expressão de genes relacionados com transporte de glicose, incluindo do *SLC2A1*.

Contudo, no presente estudo, este gene e nenhum dos escolhidos foram diferentemente expressos nesse estágio de embrião. Então, sugere-se que os embriões PIV D14 cultivados útero das receptoras e que foram utilizados para a expressão gênica eram semelhante aos *in vivo*. É possível que os embriões PIV de qualidade ruim tenham se degenerado durante esse período no útero e por isso não foram recuperados. Ou que o estágio e a qualidade morfológica em que os embriões foram transferidos no D7 já fizeram uma seleção prévia dos melhores embriões.

Porém, observamos diferenças em três genes – *SLC2A3*, *MnSOD* e *PLAC8* – quando se comparou os dois grupos de embriões coletados de receptoras com aqueles cultivados totalmente *in vitro* até o D14 no sistema PHD. O gene *SLC2A3*, que estava super-expresso em embriões D14 cultivados no PHD, codifica outra isoforma de transportador que fornece glicose do ambiente externo para embriões bovinos no estágio pré-implantação (Augustin et al., 2001). Parece que proteína *SLC2A3*, que tem um papel dominante na captação de glicose pelo embrião e está mais relacionada com a captação de glicose conforme aumenta a idade gestacional (Ehrhardt & Bell, 1997). E, portanto, um dos motivos do aumento da expressão do *SLC2A3* nos embriões totalmente *in vitro* D14 pode ser pelo fato da concentração de glicose (27,7 mM) ser mais alta no meio SOF PHD em relação ao ambiente uterino que é 3,15 mM (Lane & Gardner, 2007).

Já a expressão do gene *MnSOD* está relacionada com atividade mitocondrial e a tensão de oxigênio. Estudos têm mostrado que o aumento da tensão de O<sub>2</sub> na produção *in vitro* de embriões ocasiona o aumento na expressão de *MnSOD*, porém não afetando sua a qualidade embrionária (Corrêa et al., 2008). Talvez, o aumento da sua expressão ocorra como forma de proteção contra as situações adversas do meio para viabilizar o desenvolvimento de embriões PIV. A diferença de expressão de *MnSOD* já foi observada entre os embriões D7 cultivados *in vitro* ou *in vivo* (Rizos et al., 2002a; Lonergan et al., 2003) e a presença do soro fetal no meio de cultivo propiciou o aumento da expressão desse gene (Rizos et al., 2003). Interessante observar que entre os grupos de embriões D7, apesar dos embriões PIV sofrerem um maior estresse que os *in vivo*, a expressão desse gene foi semelhante. Já os embriões D14 totalmente *in vitro* passam por um período maior em um ambiente adverso, esse gene mostrou-se super-expressão nesse grupo.

Com relação aos genes relacionados à placentação – *KRT8* e *PLAC8* – e à implantação – *IFNT* e *CD9* –, no presente estudo, somente o gene *PLAC8* apresentou maior abundância relativa nos embriões D14 totalmente *in vitro*. O *PLAC8* exerce um papel no desenvolvimento da placenta e comunicação materno fetal (Gómez et al., 2009). Esse gene está relacionado com invasão celular e sua expressão está relacionada com embriões D7 que tiveram sucesso no nascimento (El-Sayed et al., 2006). Porém, no presente estudo, o embrião avaliado estava do dia 14 de desenvolvimento que foi produzido no sistema PHD apresentou uma maior expressão de *PLAC8*, diferente do esperado para um embrião de pior qualidade. Entretanto é preciso considerar que esse embrião de D14 apresenta maior número de células no trofoblasto do que o embrião de D7. É possível que o trofoblasto desse embrião totalmente *in vitro* não esteja no seu estado fisiológico, exacerbando a expressão desse gene, que está expresso nessas células. Mostrando mais uma vez que os embriões do sistema PHD por estarem passando por condições extremamente estressantes não apresentem as vias que regulam a expressão dos genes dentro da normalidade.

A avaliação da ultraestrutura da região do DE foi realizada nos embriões oriundos do útero de receptoras, pois na avaliação morfológica pelo estereomicroscópio essa estrutura foi semelhante entre os grupos. Portanto, buscou-se averiguar se teria alguma diferença ultraestrutural. Então, verificou-se que a região dos epiblasto nos embriões D14 oriundos da PIV foi semelhante aos embriões *in vivo* do D14. E não se observaram vacúolos, nem corpos apoptóticos e células necróticas, o que indica uma boa qualidade desses embriões (Talbot et al., 2000). Não se verificou em nenhum embrião a formação inicial de âmnio e os sinais de mortalidade inicial como relatado por Maddox-Hyttel et al. (2003). Provavelmente, essas estruturas não foram observadas, pois o que se objetivou no presente estudo foi coletar o disco embrionário íntegro e com as características semelhantes entre os dois tipos de embriões.

Concluiu-se que os embriões D7 *in vivo* e *in vitro* possuíam um perfil molecular diferente em dois genes estudados, o *HSP70* e o *SLC2A1* e que essas diferenças desapareceram após o cultivo dos embriões no ambiente uterino. Porém, quando os embriões foram transferidos para o sistema PHD outros genes mostraram-se diferentes. Isso mostra que o sistema PHD não proporcionou um ambiente adequado para o desenvolvimento do embrião.

Observou-se que no sistema PHD somente embriões de qualidade excepcional conseguem se desenvolver. Ou seja, embriões de boa qualidade que conseguiria se desenvolver normalmente no útero e obter sucesso de prenhez não foi capaz de se desenvolver no sistema de cultivo pós-eclosão *in vitro*. Porém é um sistema promissor já que a expressão genes importantes para o sucesso do desenvolvimento embrionário foi semelhante com embriões D14 oriundos do útero das receptoras. Portanto, é plausível um investimento nesse sistema.

## 6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AHN, S.G., AND THIELE, D.J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection form stress. **Genes Development** v.17, 516–528, 2003.
- ALEXOPOULOS, N.I.; & FRENCH, A.J. The prevalence of embryonic remnants following the recovery of post-hatching bovine embryos produced *in vitro* or by somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.43-53, 2009.
- AUGUSTIN, R., POCAR, P., NAVARRETE-SANTOS, A., WRENZYCKI, C., GANDOLFI, F., NIEMANN, H., FISCHER, B. *Glucose transporter expression is developmentally regulated in vitro* derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.60,p.370-376, 2001.
- BALASUBRAMANIAN, S., SON, W.J., MOHANA KUMAR, B., OCK, S.A., YOO, J.G., IM, G.S., CHOE, S.Y., RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of *in vitro* and *in vivo* preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.68, p.265-275, 2007.
- BERTOLINI, M; BEAM, S.W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L.R.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; ANDERSON, G.B. Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular of Reproduction and Development**, v. 63, p. 318 – 328, 2002.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S.E.; ZAKHARTCHENKO, V.; MINTEN, M.; REICHENBACH, M.; REICHENBACH, H.D.; BLUM, H.; SPENCER, T.E.; WOLF, E. The endometrium responds differently to cloned versus fertilized embryos. **PNAS**, v.106, 2009.
- BRANDÃO, D. O.; HYTTEL, P.; LOVENDAHL, P.; RUMPF, R.; STRINGFELLOW, D.; CALLESEN, H. Post hatching development: a novel system for extended *in vitro* culture of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2048 – 2055, 2004.

- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.
- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v. 63, p. 1249–1255. 2005.
- CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; NAIB, A.AL.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J.F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, 507–517, 2009.
- CLEMENTE, M.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; O'GAROA, P.; MEHTA, J.P.; FORDE, N.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P., RIZOS, D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 285-295, 2011.
- CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.132-142, 2008.
- CHRISTOPHER LUFT, J. & DIX, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress Chaperones**, v.4, p.162-170, 1999.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1459 – 1465, 2000.
- CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375 – 1385, 2001.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 41 – 49, 2001.
- DISKIN, M.G.& MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p.260–267, 2008.
- de OLIVEIRA, A.T., LOPES, R.F., AND RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1559–1572, 2005.
- EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large – scale transcriptional

- analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiology Genomics**, v. 28, p. 84 – 96, 2006.
- EHRHARDT RA AND BELL AW. Developmental increases in glucose transporter concentration in the sheep placenta. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 1132–1141,1997.
- EL-HALAWANY, N.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER K. Quantitative expression analysis of blastocyst-derived gene transcripts inpreimplantation developmental stages of in vitro-produced bovine embryos using real polymerase chain reaction technology. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.753-762, 2004.
- FARIN, P.W.; FARIN, C.E.; CROSIER, A.E.; BLONDIN, P.;ALEXANDER, J.E. Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. **Theriogenology**, v.51, p.238, 1999. Abstract
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* system on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151 – 170, 2001.
- FARIN, P. W & C. E. FARIN. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 676–682, 1995.
- FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Erros in development of fetus and placentas from in vitro –produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.178-191, 2006.
- FIORENZA, M.T.; BEVILACQUA, A.; CANTERINI, S.; TORCIA, S.; PONTECORVIM & MANGIA, F. Early transcriptional activation of the hsp70.1 gene by osmotic stress in one-cell embryos of the mouse. **Biology of Reproduction**, v.70, p.1606–1613, 2004.
- FISCHER-BROWN, A.E.; LINDSEY, B.R.; IRELAND, F.A.; NORTHEY, D.L.; MONSON, R.L.; CLARK, S.G.; WHEELER, M.B.; KESLER, D.J.; LANE, S.J.; WEIGEL, K.A.; RUTLEDGE, J.J. Embryonic disc development and subsequent viability of cattle embryos following culture in two media under two oxygen concentrations. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.787 – 793, 2004.
- FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individuality culture bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.1553–1565, 2000.
- GARNER, D.K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristic. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p.9–18, 2008.

- GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J.N.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DÍEZ, C.; MUÑOZ, M.; MARTÍN, D.; CARROCERA, S.; GUTIÉRREZ-ADÁN A. Gene expression in early expanded parthenogenetic and in vitro fertilized bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, p. 607 – 614, 2009.
- GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of in vivo and *in vitro* produced embryo. **Reproductio of Domestic Embryo**, v. 28, p 164–169, 1993.
- HARVEY, A.J., KIND, K.L., PANTALEON, M., ARMSTRONG, D.T., THOMPSON, J.G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**,v.71,p.1108–1119, 2004.
- HARVEY A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal, Reproduction and Science**, v. 98, p. 113–128; 2007.
- HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11–20, 2000.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHIMIDT, M.H.; GREVE, T., CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v. 52, p 683–700, 1999.
- HUE, I.; HUNEAU, D.; LANGMANN, W.; MOLLY, S.; VIEBAHN, C.; RENARD JP. Brachyury expression in gastrulating bovine embryos, in vivo- or in vitro-produced. **Theriogenology**, v. 53, p.273, 2000. Abstract.
- KHURANA, N.K. & NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741–756, 2000.
- LANE, M.; GARNER, D.K. Embryo culture medium: which the best? **Best Practical Research Clinic, Obstetric and Gynaecology**, v.21, p. 83–100, 2007.
- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 767 – 775, 2002.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR,T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality : effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction of Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003.
- MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R., DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of



- centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p. 1289–1297, 2009.
- MACHADO, G.M.; CAIXETA, E.S.; LUCCHI, C.M.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v.23, p.1–12, 2011.
- MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N. I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; NYBORG, P.; TROUNSON, A. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607 – 623, 2003.
- MAMO, S.; MEHTA, J.P.; McGETTIGAN, P.; FAIR, T.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; LONERGAN, P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptus associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. **Biology of Reproduction**, v.85, p.1143–1151, 2011.
- MANSOURI-ATTIA, N.; SANDRA, O.; AUBERTB, J.; DEGRELLEA, S.; EVERTSC, R.E.; GIRAUD-DELVILLEA, C.; HEYMANA, Y.; GALIO, L.; HUEA, I.; YANG, X.; TIANE, X. C.; LEWIN, H.A.; RENARDA, J.P. Endometrium as an early sensor of *in vitro* embryo manipulation technologies. **PNAS**, v.106, p.5687 – 5692, 2009.
- MORTON, K.M., HERRMANN, D., SIEG, B., STRUCKMANN, C., MAXWELL, W.M.C., RAHT, D., EVANS, G., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., WRENZYCKI, C. Altered RNAm expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm, **Molecular of Reproduction and Development**, v.74, p.931–940, 2007.
- MUNDIM, T.C.D.; RAMOS, A.F.; SARTORI, R.; DODE, M.A.N.; MELO, E.O.; GOMES, L.F.S.; RUMPF, R.; FRANCO, M.M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1398 – 1407, 2009.
- NIEMANN H.; & WRENZYCKI C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, p. 21–34, 2000.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859–869, 1995.
- PAULA-LOPES, F.F. & HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantaion bovine emryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169–1177, 2002.

- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002–2007, 2001.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparation of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, 71, 690 – 697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; STERZA, M. F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GÁRCIA, R.; PINTADO, B.; FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture system: implications for blastocysts quality. **Biology of Reproduction**, v 66, p. 589–595, 2002a.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular of Reproduction and Development**, v. 61, p. 234–248, 2002b.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GÁRCIA, R.; PINTADO, B.; FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of differential Messenger RNA expresión between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589 – 243, 2003.
- ROBERTSON I, NELSON RE.. Certification and identificationof the embryo. *In*: STRINGFELLOW D, SEIDEL S.M.(Ed.) **Manual of the International Embryo TransferSociety**. IETS, Savoy, IL, USA, p.103-134, 1998.
- RODRÍGUEZ-ALAVAREZ, L.; SHARBATI, J.; SHARBATI, S.; COX, J.F.; EINSPANIER, R.; CASTRO, F.O. Differential gene expression in bovine elongated (Day 17) embryos produced by somatic cell nucleus transfer and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v.74, p.45 – 59, 2010
- SAGIRKAYA, H.; MISIRLIOGLU, M.; KAYA, A.; FIRST, N.L.; PARRISH, J.J.; MEMILI, E. Developmental and molecular correlates of bovine preimplatantion embryos. **Reproduction**, v.131, p.895-904, 2006.
- SMITH, C.; BERG, D.; BEAUMONT, S.; STANDLEY, N. T.; WELLS, D. N.; PFEFFER, P.L. Simultaneous gene quantitation of multiple genes in individual bovine nuclear transfer blastocysts. **Reproduction**, v. 133, 231–242, 2007.

- TALBOT, N.C.; POWELL, A.M.; GARRETT, W., EDWARDS, J.L.; REXROAD, C. JR. Ultrastructural and karyotypic examination of *in vitro* produced bovine embryos developed in the sheep uterus. **Tissue Cell**, v. 32, p. 9–27; 2000.
- TESFAYE, D.; PONSUKSILI, S.; WIMMERS, K.; GILLES, M.; SCHELLANDER, K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 39, p. 396–404, 2004.
- VAJTA, G.; ALEXOPOULOS, N.; CALLESEN, H. Rapid growth and elongation of bovine blastocysts *in vitro* in a three-dimensional gel system. **Theriogenology**, v. 7, p. 1253–1263, 2004.
- VEJLSTED, M.; DU, Y.; VAJTA, G.; MADDOX-HYTTTEL, P. Post-hatching development of porcine and bovine embryo – defining criteria for expected development *in vivo* and *in vitro*. **Theriogenology**, v. 65, p. 153–156, 2006.
- WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, A.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKING, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p. 276 – 289, 2003.
- WOOD, I.S., TRAYHURN, P. (Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, 3–9, 2003.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. 77–83, 2007.
- YAO, N.; WAN, P.-C.; HAO, Z.-D.; GAO, F.-F.; YANG, L.; CUI, M.-S.; WU, Y.; LIU, J.-H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S.-M. Expression of interferon-tau RNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 44, p. 132–139, 2009.

## CONCLUSÃO FINAL

O sistema de cultivo pós-eclosão (PHD) foi estabelecido com êxito para embriões produzidos *in vitro* no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia (LRA).

O melhor protocolo desse sistema no LRA foi quando a água Milli-Q foi utilizada para construção dos túneis.

Entretanto, o sistema se mostrou ineficiente devido à baixa taxa de sobrevivência dos embriões ao final do cultivo. Contudo, o perfil molecular dos embriões produzidos totalmente *in vitro* foi parecido com o dos embriões totalmente *in vivo*, indicando que os embriões que atingiram o final do cultivo no sistema PHD podem ser considerados de boa qualidade. Isso justificaria mais esforços para melhorar esse sistema para que possa ser utilizado para avaliar e estudar os embriões nesse estágio mais tardio de desenvolvimento.

O ponto crítico do sistema PHD parece não ser a fase em que os embriões são introduzidos nos túneis de agarose, mas sim as etapas antecedentes, entre o dia 7 e dia 11, período em que foram observadas as maiores perdas embrionárias.

O gene *SLC2A1* se destacou como o possível biomarcador para esse modelo de estudo, pois apresentou-se diferente nos três trabalhos realizados.

A transferência múltipla para receptoras sincronizadas se mostrou um método eficaz para o cultivo pós-eclosão, pois os embriões D14 *in vitro* foram semelhantes morfológica e molecularmente aos *in vivo*. Sendo, portanto, mais uma alternativa para os estudos que visam enfocar esse estágio crítico do concepto.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação do desenvolvimento embrionário até D14 é um bom método de estudo para verificar a qualidade de embriões produzidos por diversas biotécnicas de reprodução assistida. Além de verificar os embriões por uma semana a mais do que o habitual, que é até D7, essa avaliação é realizada em um período crítico do desenvolvimento embrionário. Esse tipo de avaliação poderia ser realizado transferindo os embriões para receptoras e avaliando taxa de prenhez. Entretanto, esse método é praticamente inviável economicamente. As alternativas para isso seriam realizar o cultivo pós-eclosão *in vitro*, em que as avaliações poderiam ser realizadas em qualquer momento durante o período ou realizar esse cultivo *in vivo* transferindo vários embriões de cada tratamento para o útero de receptoras. O sistema de cultivo pós-eclosão *in vitro* é uma promissora ferramenta de estudo desses embriões. Com essa metodologia as descobertas científicas relacionadas aos embriões *in vitro*, demorariam menos tempo e seriam menos onerosas, pois não necessitaria de receptoras. Contudo, como observado nesse trabalho esse sistema ainda é ineficiente. Portanto, devido a sua importante utilidade torna-se viável melhorá-lo. De fato, não se procura, primeiramente, ter um sistema que proporcione o desenvolvimento de um embrião semelhante ao *in vivo*. Mas, objetiva-se aprimorá-lo para que um maior número de embriões se desenvolva até o fim do cultivo. Para isso seria de grande valia, antes de tudo, verificar se o embrião que cresce nele está apto para obtenção de prenhez e conseqüentemente para produção de nascimento. Posteriormente, o mais importante seria enriquecer o meio SOF PHD, fornecendo um maior aporte de substratos, importantes para o desenvolvimento dos embriões nesse estágio tais como o acréscimo de fluido uterino. Outra modificação seria alterar o protocolo de cultivo no período que antecede a entrada dos embriões nos túneis de agarose (D11), pois é o estágio em que ocorrem as maiores perdas. Entre as opções de alterações do sistema PHD, pode-se incluir a construção dos túneis de agarose com diâmetro maior, visando não limitar o espaço de crescimento dos embriões; dissolver a agarose no

próprio meio de cultivo dos embriões ao invés de solução de PBS ou água Milli-Q; diminuir a concentração de glicose; e acrescentar progesterona. Apesar do sistema PHD ainda não estar nas condições ideais para o uso, a transferência múltipla pode ser utilizada como método alternativo para o estudo de embriões pós-eclosão.