

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**JANINE DE CAMARGO**

**Eficiência de formulações de cultivo embrionário elaboradas para  
melhorar a criotolerância e a competência em estabelecer a gestação de  
embriões bovinos produzidos *in vitro***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**URUGUAIANA**

**2021**

**JANINE DE CAMARGO**

**Eficiência de formulações de cultivo embrionário elaboradas para  
melhorar a criotolerância e a competência em estabelecer a gestação de  
embriões bovinos produzidos *in vitro***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação  
*Stricto sensu* em Ciência Animal, pela Universidade  
Federal do Pampa — UNIPAMPA, como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Sudano

**URUGUAIANA**

**2021**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados  
fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

d33e de Camargo, Janine

Eficiência de formulações de cultivo embrionário elaboradas para melhorar a criotolerância e a competência em estabelecer a gestação de embriões bovinos produzidos in vitro / Janine de Camargo.

84 p.

1. criotolerância. 2. embriões bovinos. 3. lipídios . 4. vitrificação. I. Título.

**JANINE DE CAMARGO**

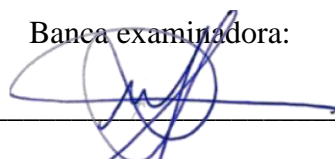
**Eficiência de formulações de cultivo embrionário elaboradas para melhorar a criotolerância e a competência em estabelecer a gestação de embriões bovinos produzidos *in vitro***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Sudano

Dissertação defendida e aprovado em 31 de Março de 2021.


Banca examinadora:



---

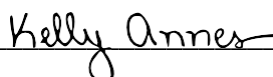
Prof. Dr. Mateus José Sudano (UFSCar; UNIPAMPA; UFABC)

(Orientador)



---

Prof. Fernando Silveira Mesquita (UNIPAMPA)



---

Dra Kelly Annes (UFABC; UFSCar)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)



CEUA  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55)3911-0200. E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 010/2019

Título: Eficiência da produção in vitro de embriões em meio livre de Soro Fetal Bovino

Data da aprovação: 20/06/2019

Período de vigência do projeto: 30/03/2020


Pesquisadores(a): Mateus José Sudano

Campus: Uruguaiiana

Telefone: (11) 97359-7707

E-mail: [mjsudano@gmail.com](mailto:mjsudano@gmail.com)

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Bovinos/ <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i>
Nº de animais	214
Peso/Idade	450 kg / 24-48 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Abatedouro e fazendas comerciais de clientes parceiros de empresa de produção in vitro de embriões

  
Prof. Dr. Vanusa Manfredini  
Coordenadora CEUA/UNIPAMPA

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu marido Diego, ao meu filho João Paulo, aos meus pais José e Ondina e aos meus irmãos Oscar e Leonardo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida! Agradeço por cada oportunidade de crescimento profissional e pessoal durante esse período. E por todas as pessoas que conheci durante o mestrado. Gratidão!

Aos meus pais, José e Ondina. Agradeço por todo apoio e incentivo em minha vida. Vocês são os melhores pais e tenho muito orgulho de vocês. Gratidão por me ensinarem a lutar por meus sonhos sem deixar de olhar ao próximo. E por amarem incondicionalmente nosso João Paulo.

Ao meu marido Diego. Agradeço por acreditar em mim e por todo apoio psicológico. Por caminhar ao meu lado sempre e me mostrar o quão forte eu sou em todos os desafios já vividos. Por construir nossa família ao meu lado. Por todo amor e atenção que você dedica a nós. Você e nosso filho João Paulo foram meu alicerce e minha força diária para vencer todos os desafios. Desculpe pelas noites mal dormidas, pelas viagens intermináveis e pelas vezes que não pude me dedicar a você. Amo você meu amor, meu companheiro de vidas.

Ao meu filho João Paulo por ressignificar minha vida e me fazer enxergar caminhos que antes eu não me permitia ver. Com você me torno todo dia uma pessoa melhor. Amo você meu filho.

Aos meus irmãos, Oscar e Leonardo. Obrigado por me apoiarem e motivarem. Amo vocês.

À família Biulchi Pereira, em especial a minha sogra Nice, que sempre acreditou em mim. Obrigada vovó por todo cuidado e amor dedicado ao João durante esse período.

Ao meu orientador Professor Mateus José Sudano. Agradeço professor pelo crescimento científico, por cada conversa, pela confiança, pela paciência, pelo incentivo e pela amizade. Gostaria que soubesse que o admiro muito profissionalmente, como ser humano, mas principalmente como o paizão que és. Obrigada pelo apoio nos dias de lágrimas e por comemorar comigo as vitórias. Sinto-me muito abençoada por ter tido a oportunidade de aprender com o senhor e mais ainda de ter ao lado um ser humano com

um coração maravilhoso que enquanto eu estava assustada com minha gravidez me apoiou e me fez lembrar a benção que eu estava recebendo. Com o senhor aprendi a amar ainda mais o mundo dos embriões, a acreditar e fazer ciência!!

Ao professor Fernando por todas as conversas científicas e as informais também. Por acrescentar a mim e a todos que estavam comigo no laboratório a vontade de sempre explorar nosso melhor. O senhor é um grande exemplo que levo pra vida.

À minha amiga Irmã Fran, a responsável por eu decidir tentar meu mestrado na tão tão distante Uruguaiana. A amiga que a faculdade me proporcionou. Minha companheira nas dificuldades (juntando os pila pra comer rap10 com mortadela) e nas horas boas (comendo bolo na padaria do posto) A dinda do meu JP que esteve ao meu lado nos dias de progesterona a mil e jamais me abandonou. Eu te amo minha amiga e tenho muitaaaa saudades da nossa convivência diária!

À minha amiga Roniele, irmã que o mestrado me proporcionou, companheira de vida, experimento, caminhada, conversas, plantas e até de receitas em tempos de pandemia. Obrigada minha amiga por todo carinho comigo e com o JP. E agora nossa parceria continua no doutorado, se Deus quiser!

À minha amiga Kelly. Obrigada pela amizade acolhedora. Pela paciência, pelo amor a produção *in vitro* e pelos embriões que você traz com você, tenha certeza você transparece o amor pelo que faz e inspira outras pessoas. Por todo aprendizado que tive com você práticos...teóricos. Mais uma vez agradeço a paciência e a oportunidade de crescer com você.

À minha amiga Fernanda. Obrigada Fer pela tua amizade e companheirismo. Por sempre ter uma mensagem de força e coragem. E por adoçar nossa vida no Lab com teus doces maravilhosos. Por todo cuidado comigo e com meu filho ainda na barriga.

Aos meus amigos de laboratório e da vida, Jorge, Andressa (minha IC do coração) Thamiris, Diego, Diana, Gabrielly, Milena e Marco Antônio. Agradeço pela amizade e pelo aprendizado que todos me proporcionaram.



À todos os amigos que Uruguiana me trouxe que levarei para vida. Especialmente Dona Fátima e seu Newton minha eterna gratidão pelo cuidado comigo.

À Universidade Federal do Pampa, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e ao Laboratório de Fisiologia Molecular e Integrativa Molecular (MINT) pelo aprendizado científico.

Ao Laboratório de Virologia (LV), ao professor Mario Celso e a mestranda Ingrid pela oportunidade de utilizar o laboratório durante o desenvolvimento do projeto, pela amizade e auxílio.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal por inspirarem nos alunos a buscar o melhor sempre mesmo com as dificuldades. Agradeço por todo apoio durante minha gestação.

À cidade de Uruguiana pelo acolhimento e qualidade de vida. Por esse rio Uruguai maravilhoso que renova nossas energias e sempre me fez querer crescer ao contemplar a beleza dele e do por do sol mais lindo que existe.

Aos colaboradores, equipe *In Vitro* Brasil – IVB que tornaram possível a realização dos experimentos.

Aos demais colaboradores que tornaram possível a realização de todos os experimentos.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERGS e FINEP pelo apoio financeiro para implementação dos experimentos.

À banca examinadora deste trabalho, obrigado pela disponibilidade e por todas as contribuições.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

## RESUMO

O sucesso da criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) mostra-se o ponto chave para a expansão comercial nesse setor. Entretanto, embriões PIV submetidos a essa biotecnologia apresentam oscilações dos índices de prenhez, devido sua baixa criotolerância. O presente estudo visa avaliar a eficiência de embriões produzidos em formulações de meios de cultivo, livres de SFB e suplementadas com meio A ou B. Além disso, averiguar o efeito dos meios na viabilidade embrionária, no perfil lipídico, no perfil molecular e no estabelecimento da prenhez. Em um primeiro experimento, oócitos oriundos de ovários de abatedouro foram maturados e fertilizados, e posteriormente, os possíveis zigotos, foram cultivados *in vitro* e distribuídos aleatoriamente em três grupos: i) Controle (C): meio sintético modificado de fluido de oviduto (mSOF) suplementado com 5 mg / mL de BSA e 2,5% de soro fetal bovino; ii) Meio A (MA): suplemento A, mSOF alterado sem soro; e iii) Meio B (MB): suplemento B, mSOF alterado sem soro. O uso de meios MA e MB melhorou a viabilidade embrionária à criopreservação sem afetar a produção de blastocistos (D7). Os blastocistos oriundos do grupo MB apresentaram a maior ( $P < 0,05$ ) taxa de eclosão (26%) em relação aos demais grupos, e maior porcentagem de embriões transferíveis MB [92,1% (187/203)] em relação ao controle C [85,8% (175/204)]. O perfil lipídico de embriões PIV do grupo MB foi similar ao de embriões produzidos *in vivo*. Além disso, a morfometria das gotas lipídicas citoplasmáticas desses embriões parece ter conferido menor fragilidade a vitrificação. Os meios MA e MB apresentaram genes do metabolismo lipídico com expressão reduzida em relação ao controle, indicando, uma melhor qualidade embrionária. Além disso, o grupo MB demonstrou expressão aumentada do gene Lumican (*LUM*), com importante função na estrutura da membrana plasmática. A soma desses achados nos levou a investigar a taxa de concepção dos embriões oriundos do meio MB. As taxas de concepção, aos 45 dias, oriunda da transferência dos blastocistos dos grupos MB e C foram semelhantes (49,2 vs. 47,9, respectivamente;  $P > 0,05$ ), validando a eficiência da formulação MB. Portanto, o meio de cultivo MB favorece a criotolerância sem prejudicar a competência do desenvolvimento e obtenção da prenhez dos embriões em programa comercial em larga escala. Acreditamos que esse achado possa ser explicado pela natureza dos lipídeos embrionários e perfil transcricional associados.

**Palavras chave: embrião bovino, lipídios, vitrificação, criotolerância**

## ABSTRACT

The success of cryopreservation of embryos produced *in vitro* (IVP) shows itself to be the key point for commercial expansion. However, successful cryopreservation of *in vitro*-produced embryos is a fundamental requirement for the expansion of the IVP industry. The present study aims to evaluate the efficiency of different formulations of FBS-free culture media supplemented with medium A or B on cryotolerance, and the establishment of pregnancy. In a first experiment, oocytes from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized and then the presumptive zygotes were cultured *in vitro* and randomly distributed into three groups: *i*) Control (C): modified synthetic oviduct fluid (mSOF) culture medium supplemented with 5 mg/mL BSA and 2.5% fetal calf serum; *ii*) Medium A (MA): serum-free altered mSOF medium A; and *iii*) Medium B (MB): serum-free altered mSOF medium B. The use of MA and MB media improved the embryo viability to cryopreservation without affecting the production of blastocysts. Blastocysts from the MB group had the highest ( $P < 0.05$ ) hatching rate (26%) in relation to the other groups ( $P < 0.05$ ); and the highest percentage of MB transferable embryos (92.1%, 187/203) compared to control group [85.8% (175/204)]. This result can be explained by the lipid and transcriptional profile of the embryos. The lipid profile of IVP embryos of the MB group was similar to that of embryos produced *in vivo*. Furthermore, the morphometry of the cytoplasmic lipid droplets seems to have conferred less fragility to the vitrification. The MA and MB media showed downregulated lipid metabolism genes in relation to the control, indicating a better embryo quality. In addition, the MB group demonstrated the upregulation of the Lumican gene (LUM), with an important function in the structure of the plasma membrane. The sum of these findings led us to investigate the conception rate of embryos from the MB medium. The conception rates, at 45 days, resulting from the transfer of MB medium-derived blastocysts (49.2%) was similar ( $P > 0.05$ ) to that for control-derived embryos (47.9%). Therefore, the novel MB culture medium favors cryotolerance without impairing pregnancy rate in a large-scale *in vitro* bovine embryo production program. We believe that this finding can be explained by the embryonic lipids and transcriptional profile.

**Keywords:** bovine embryo, lipids, vitrification, cryo-survival

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

- Figura 1. Número de embriões bovinos (produzidos *in vitro* [PIV], derivado *in vivo* [DIV] e total) registrados no período de 2000-2019. Dados disponibilizados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) [https://www.iets.org/comm\\_data.asp?autotry](https://www.iets.org/comm_data.asp?autotry) Acesso em fevereiro, 2020). ..... 21
- Figura 2. Eventos celulares e moleculares necessários para a aquisição da competência de desenvolvimento embrionário e seu impacto na criotolerância. Etapas interligadas (setas azuis tracejadas, da esquerda para a direita) para produzir *in vitro* embriões de qualidade e com sucesso na criopreservação. Efeitos ambientais e genéticos na aquisição de competência embrionária (caixa preta). Variáveis associadas à produção *in vitro* de embrião de qualidade (caixa dourada, em detalhes blastocistos PIV frescos com ótima qualidade). O sucesso na retomada do desenvolvimento após os efeitos da criopreservação e da técnica de criopreservação (caixa verde, em detalhes blastocistos PIV expandidos após o aquecimento). Todos os eventos (caixa preta, dourada e verde) impactam no sucesso da criopreservação embrionária. Fonte: Marsico et al., 2019. .... 23
- Figura 3. Proporção de transferências de embriões bovinos criopreservados no período de 2000-2019, de acordo com a origem do embrião (derivado *in vivo* [DIV] ou produzido *in vitro* [PIV]). Dados disponibilizados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) [https://www.iets.org/comm\\_data.asp?autotry](https://www.iets.org/comm_data.asp?autotry) Acesso em fevereiro, 2020). ..... 25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prováveis efeitos de diferentes estressores durante o cultivo de embriões produzidos <i>in vitro</i> em diferentes espécies. Fonte: Ramos-Ibeas et al., 2019.....	28
---	----

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.Criopreservação de embriões produzidos <i>in vitro</i>. .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.A influência do meio de cultivo na qualidade embrionária .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3.Avaliação celular e molecular de viabilidade embrionária. ....</b>	<b>30</b>
<b>2.3.1.Número total de células e Apoptose em embriões PIV .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.Prenhez em embriões PIV.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5.Analise transcricional em embriões PIV .....</b>	<b>32</b>
<b>2.6.O papel dos lipídios na qualidade embrionária à criopreservação.....</b>	<b>34</b>
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>36</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.Objetivos específicos: .....</b>	<b>36</b>
<b>5. CAPÍTULO 1- ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>38</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>



## 1.INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos vem apresentando índices produtivos satisfatórios nas últimas décadas. Em 2019 embriões produzidos *in vitro* (PIV) representaram 72,7% de todos os embriões bovinos transferíveis, superando pela primeira vez, nas últimas duas décadas, o número de embriões derivados *in vivo* (DIV). Em 2019, o Brasil ocupou o segundo lugar na produção global de embriões PIV (International Embryo Transfer Society - IETS, 2017) (Vianna., 2020). Esses números são possíveis devido ao potencial reprodutivo para técnicas de Aspiração Folicular Ovariana Guiada por Ultrassom (OPU) dos animais utilizados, principalmente pela raça Nelore (*Bos taurus indicus*) (Pontes et al., 2011). Dessa maneira, evidencia-se a importância do investimento no aprimoramento de meios utilizados na produção embrionária *in vitro*, com o objetivo de produzir embriões em quantidade, suficiente para suprir a crescente demanda, e com qualidade, para garantir índices de prenhez satisfatórios.

A criopreservação de embriões PIV é uma alternativa para a melhor utilização da genética produzida, pois possibilita a superação de desafios logísticos enfrentados na transferência de embriões (TE). Além disso, viabiliza a expansão comercial de embriões produzidos no Brasil para mercados internacionais (B. V. Sanches et al., 2017; Sudano et al., 2013). Porém, a criopreservação de embriões PIV ainda é um desafio, devido à menor viabilidade desses embriões após o aquecimento, quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (B. V. Sanches et al., 2017). A melhor compreensão de fatores que predispõe a essa menor criotolerância, viabiliza a aplicabilidade dessa biotecnologia na rotina do manejo reprodutivo em fazendas (Sanches et al., 2013; Sudano et al., 2012). Diante desse cenário se estruturam pesquisas de ciência básica e aplicada, com o intuito de compreender fatores que prejudicam a qualidade de embriões PIV após criopreservação.

O principal motivo associado a menor criotolerância de embriões PIV está na incompatibilidade dos meios de cultivo, disponíveis, com a dinâmica embrionária realizada *in vivo*. Além disso, esses meios interferem no metabolismo embrionário e não fornecem segurança sanitária suficiente para a comercialização internacional (Abe et al.,

2002a; Rizos et al., 2008a, 2003). Uma vez que, a qualidade do blastocisto está diretamente ligada às condições de cultura pós fertilização (Pinyopummintr and Bavister, 1994; Rizos et al., 2003). O soro fetal bovino (SFB), utilizado nos meios comerciais, atua como protagonista frente aos problemas de viabilidade relacionados à criopreservação de embriões PIV. Além disso, outros aspectos negativos do uso do SFB são associados, em bovino, a anomalias (McEvoy et al., 2000; Rizos et al., 2008a; Walker et al., 1996).

Entre os motivos desses efeitos negativos, destaca-se a ação do SFB sobre o metabolismo embrionário, importante na manutenção da célula durante o processo de criopreservação (Abe et al., 2002a; Del Collado et al., 2016; Paschoal et al., 2017). Dessa forma, o tema motiva diferentes grupos de pesquisa a buscar outras fontes protéicas e/ou redução nas concentrações de SFB utilizadas durante o cultivo embrionário (Moreno et al., 2015; Murillo et al., 2017; Rizos et al., 2003). Visto que, o SFB, no meio de cultivo, afeta a viabilidade embrionária, devido o acúmulo lipídico exacerbado (Abe et al., 2002a; Rizos et al., 2003; Sudano et al., 2016, 2012). Apesar de, ainda não possui um mecanismo elucidado, alguns autores relatam que o desvio no metabolismo lipídico pode causar um aumento da produção de radicais livres, estimulando o processo de morte embrionária, através da peroxidação lipídica ou por incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol na membrana embrionária. Isso implicaria na qualidade da membrana plasmática, tornando-a menos permeável e mais rígida, explicando a susceptibilidade do embrião PIV à criopreservação (BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL, 2007; BEITZ, 1996). Outras hipóteses a partir do uso de agentes lipolíticos também vêm sendo estudadas com o objetivo de produzir embriões com características lipídicas favoráveis à criopreservação (Sanches et al., 2013).

A análise da viabilidade/qualidade embrionária na PIV tem extrema importância devido à capacidade de expressar o potencial embrionário às biotecnologias e à implantação (MÁRQUEZ-ALVARADO et al., 2004; MADDOX-HYTTEL et al., 2019). A viabilidade celular em embriões pode ser representada através do número total de células e porcentagem de células em apoptose (Jacobson et al., 1997; Maddox-Hyttel et al., 2019; Rätty et al., 2011). A taxa de eclosão após vitrificação/aquecimento também é utilizada como análise de viabilidade embrionária (Bruno Valente Sanches et al.,

2017) A expressão transcricional de embriões PIV aponta os desafios passados por blastocistos, durante o desenvolvimento inicial, e por isso essa metodologia tem sido descrita como ferramenta de direcionamento na produção de embriões competentes ao estabelecimento da prenhez e a criopreservação (Dey et al., 2004; Lonergan et al., 2006a, 2003a; Rizos et al., 2003; Wrenzycki et al., 1999).

O presente estudo testou a hipótese que formulações de meios livre de SFB suplementados com meio A ou B proporcionam menor conteúdo lipídico e fenótipo lipídico compatível com embriões criotolerantes (derivados *in vivo*), devido a melhor viabilidade celular e molecular. E assim, essas características refletem positivamente na produção embrionária, criotolerância e estabelecimento da prenhez. Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes formulações de meios de cultivo livres de SFB e suplementadas com meio A ou B sobre os fenótipos: produtivos, metabólicos, molecular e sobre a competência à criopreservação e ao estabelecimento gestacional de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV).

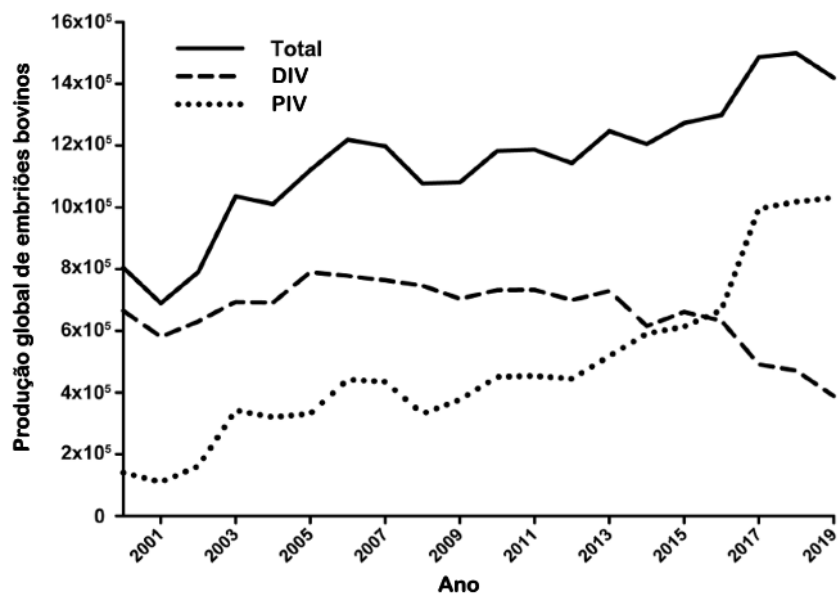
## **2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.Criopreservação de embriões produzidos *in vitro*.**

O mercado global bovino apresenta um interesse econômico e produtivo pela indústria de embriões. E nos últimos anos a demanda de embriões tem apostado na produção *in vitro* (PIV), devido à aplicação de biotecnologias reprodutivas no gado de leite e corte (Marsico et al., 2019; Pontes et al., 2011). A combinação da PIVE a outras biotecnologias como: a seleção genética, a múltipla ovulação e transferência embrionária (MOET) e a aspiração folicular (OPU - Ovum pick-up) permitiram um grande avanço genético, o qual encoraja o aprimoramento da reprodução assistida em bovinos (Ferré et al., 2020a; Goddard et al., 2010; Ponsart et al., 2014).

Essa mudança, de padrão nas biotecnologias reprodutivas, dentro da pecuária vem sendo demonstrada pela International Embryo Technology Society (IETS) durante a última década. Nesse cenário, a produção *in vitro* (PIV) é a principal responsável pela crescente valorização da indústria de embriões. Desde 2015 a produção global de embriões PIV vem tomando a frente da produção *in vivo* (Fig. 1). E em 2019 embriões produzidos *in vitro* (PIV) representaram 72,7% de todos os embriões bovinos transferíveis, superando pela primeira vez nas últimas duas décadas o número de embriões derivados *in vivo* (DIV) (Vianna, 2020).

**Figura 1.** Número de embriões bovinos (produzidos *in vitro* [PIV], derivado *in vivo* [DIV] e total) registrados no período de 2000-2019. Dados disponibilizados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) [https://www.iets.org/comm\\_data.asp?autotry](https://www.iets.org/comm_data.asp?autotry) Acesso em fevereiro, 2020).

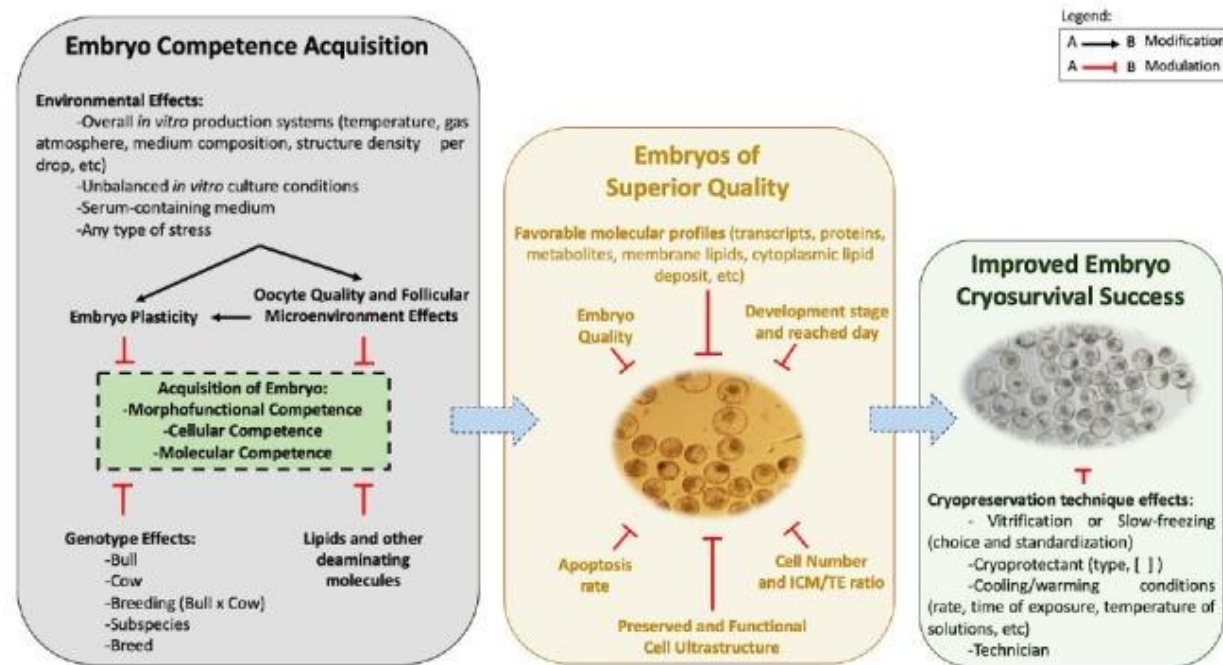


A PIVE é uma abordagem viável que proporciona o aumento exponencial do número de animais com mérito genético. Além disso, favorece a preservação de germoplasma de fêmeas bovinas, o qual é diminuído naturalmente através da atresia folicular (Ashry and Smith, 2015). E por esse motivo, a compreensão de fatores que influenciam na qualidade embrionária de embriões PIV é amplamente estudada (Lonergan et al., 2003b; Rizos et al., 2008a; Wrenzycki, 2016).

O primeiro registro de sucesso de um embrião, produzido completamente *in vitro* (maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*), ocorreu em 1982, e de lá em diante, os sistemas de produção ainda apresentam resultados desafiadores (Brackett et al., 1982). Visto que, a eficiência dessa biotecnologia precisa ser melhorada pra a obtenção de resultados de prenhez e criopreservação similar a embriões produzidos *in vivo* (Lonergan et al., 2016; Marsico et al., 2019). Esse é o principal desafio atual para os laboratórios de produção *in vitro*, aumentar a quantidade de embriões produzidos com competência para o estabelecimento da gestação e viáveis para a serem submetidos à criopreservação (Marsico et al., 2019; Sanches et al., 2013).

A competência embrionária, definida pelo estabelecimento da prenhez, é dependente do ambiente em que ocorre a foliculogênese e seu impacto na qualidade oocitária. Esses eventos, em sincronia com a capacidade de sinalização embrionária e a preparação do ambiente uterino. Portanto, a formação do blastocisto mostra-se apenas um degrau no desenvolvimento de estruturas viáveis (Fig.2) (Lonergan et al., 2003b; Marsico et al., 2019; McEvoy et al., 2000).

Figura 2. Eventos celulares e moleculares necessários para a aquisição da competência de desenvolvimento embrionário e seu impacto na criotolerância. Etapas interligadas (setas azuis tracejadas, da esquerda para a direita) para produzir *in vitro* embriões de qualidade e com sucesso na criopreservação. Efeitos ambientais e genéticos na aquisição de competência embrionária (caixa preta). Variáveis associadas à produção *in vitro* de embrião de qualidade (caixa dourada, em detalhes blastocistos PIV frescos com ótima qualidade). O sucesso na retomada do desenvolvimento após os efeitos da criopreservação e da técnica de criopreservação (caixa verde, em detalhes blastocistos PIV expandidos após o aquecimento). Todos os eventos (caixa preta, dourada e verde) impactam no sucesso da criopreservação embrionária. Fonte: Marsico et al., 2019.



Nesse sentido, o desafio embrionário *in vitro* se eleva, pois o embrião deve se desenvolver sob condições que mimetizam o ambiente *in vivo* (Wrenzycki, 2016). Quando avaliados, dados disponíveis na literatura, percebe-se que apesar de 80-90% dos oócitos, submetidos a maturação, apresentarem a completa maturação nuclear (quebra da vesícula germinativa) apenas 80% passa pelo processo de clivagem após a fertilização. E apenas 20-40% dos oócitos maturados se desenvolvem até o estágio de blastocisto (Rizos et al., 2008b; Wrenzycki and Stinshoff, 2013). O ambiente *in vitro* pode influenciar o metabolismo embrionário, a composição e distribuição lipídica, os transcritos e seus produtos sintetizados para suprir o desenvolvimento embrionário inicial (Lonergan et al., 2006b; Rizos et al., 2002; Sudano et al., 2016). E dessa maneira, interfere no fenótipo embrionário, nos resultados de prenhez e na criopreservação de embriões PIV (Marsico et al., 2019).

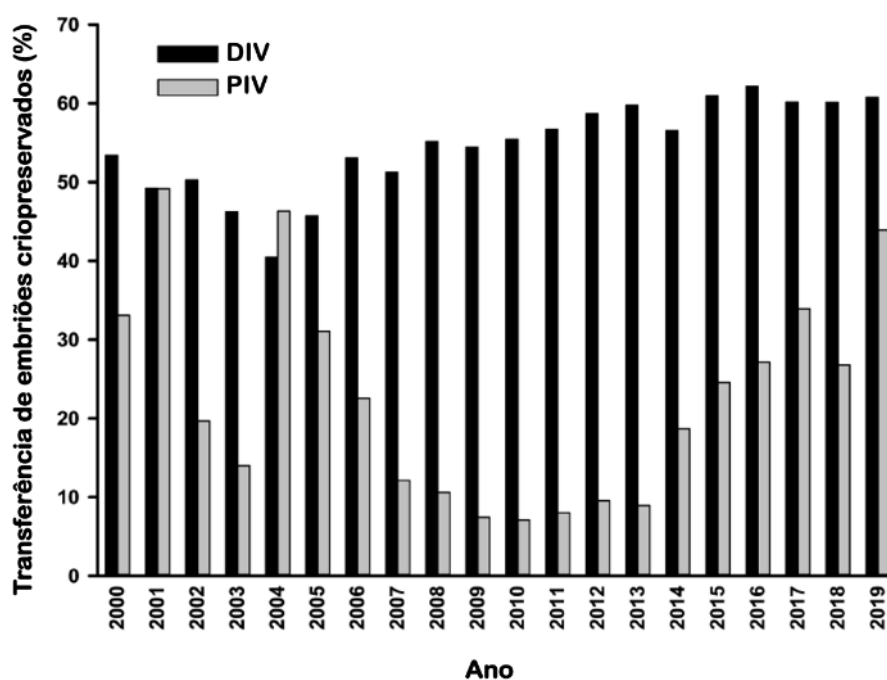
A criopreservação é a biotecnologia de conservação em nitrogênio (N<sub>2</sub>), com o objetivo de manter as células em estado de quiescência, prolongar a viabilidade durante longos períodos de tempo. Assim, possibilita a melhor utilização das células criopreservadas. Na reprodução assistida, abrange o congelamento de células germinativas primordiais, gametas e embriões. Portanto, é considerada uma estratégia para superar problemas logísticos associados à transferência de um grande número de embriões frescos e, principalmente, para a expansão da comercialização de embriões entre países (Sudano et al., 2013). Apenas embriões PIV considerados de alta qualidade são recomendados para a criopreservação, pois apresentam melhores resultados de viabilidade após o aquecimento em protocolos de transferência direta (Ferré et al., 2020b).

A criopreservação de embriões (PIV) pode ser um alicerce para a expansão comercial da PIV, visto que a crescente busca pelo uso de embriões PIV amplifica a necessidade de biotecnologias que facilitem o manejo e aperfeiçoem os custos (Ferré et al., 2020b; Marsico et al., 2019). Nos últimos dados de produção embrionária global, divulgados pela IETS, pode se observar um aumento no número de embriões PIV bovinos criopreservados de 26,8% em 2018 para 43,9% em 2019 (Viana, 2019a). Entretanto embriões PIV submetidos a essa biotecnologia ainda não apresentam bons índices de prenhez devido à baixa criotolerância (B. V. Sanches et al., 2017)



No Brasil, a maioria dos embriões produzidos *in vitro* ainda é transferida a fresco, porém o percentual de congelados segue tendência de crescimento (Fig. 3), e dentre os embriões produzidos *in vivo*, o congelamento é a opção preferencial (Vianna, 2020). Apesar de, o congelamento lento ser o método mais utilizado para embriões produzidos *in vivo*, a vitrificação mostra-se uma alternativa para embriões PIV. Quando são comparados os resultados de criotolerância e prenhez de ambos os procedimentos, considerando-se o método de produção, embriões *in vivo* apresentam resultados similares, tanto para congelamento lento quanto vitrificação (Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 1997). Contudo, embriões PIV apresentam resultados mais satisfatórios com a vitrificação (Mucci et al., 2006).

**Figura 3.** Proporção de transferências de embriões bovinos criopreservados no período de 2000-2019, de acordo com a origem do embrião (derivado *in vivo* [DIV] ou produzido *in vitro* [PIV]). Dados disponibilizados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) [https://www.iets.org/comm\\_data.asp?autotry](https://www.iets.org/comm_data.asp?autotry) Acesso em fevereiro, 2020).



A menor criotolerância de embriões PIV é a principal razão para a maioria das transferências embrionárias serem realizadas a fresco (Ferré et al., 2020b). Essa fragilidade a criopreservação é fortemente associada a fatores intrínsecos de sistemas de cultivo utilizados. Alguns componentes protéicos, presentes nas formulações, interferem

no metabolismo embrionário prejudicando a qualidade celular. Além disso, não fornecem segurança sanitária suficiente para a comercialização internacional (Abe et al., 2002a; Rizos et al., 2008a, 2003).

A crioinjúria é altamente variável e dependente da espécie, estágio de desenvolvimento e origem do embrião (produzido *in vivo* ou *in vitro*) no momento da criopreservação (Dalcin, L; Lucci, 2010). Recentemente o trabalho de Ferré et al. (2020b) demonstrou uma grande variabilidade sobre a sobrevivência de embriões PIV criopreservados e o sucesso na prenhez, entre os dados disponíveis na literatura.

As diferenças no comportamento celular e molecular, entre embriões PIV e embriões produzidos *in vivo*, podem explicar a baixa criotolerância da PIV. Visto que condições subótimas na produção *in vitro* afetam o oócito e o embrião não apenas morfológicamente, mas também fisiologicamente. Alguns fatores são apontados como responsáveis pela fragilidade ao congelamento de embriões: (a) sistema de produção (formulação de meio semi-definido ou definido, presença de fatores de crescimento, aditivos naturais e/ou sintéticos, presença de monocamada de células somáticas heterólogas ou autólogas) e (b) ambiente de produção (densidade embrionária, condições atmosféricas, cultivo sequencial ou frequência na mudança de meio). Nesse sentido algumas estratégias em estudo como o metabolismo embrionário, o conteúdo lipídico do citoplasma, a velocidade de divisão celular, a compactação da mórula e a expressão gênica são utilizados como ferramenta de definição para a qualidade do embrião, a competência de desenvolvimento e a criotolerância (Ferré et al., 2020b).

## **2.2.A influência do meio de cultivo na qualidade embrionária**

No oviduto materno ocorre a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, devido à capacidade desse microambiente suportar a embriogênese, oferecendo nutrientes, fatores de crescimento, antioxidantes, proteases e outros fatores importantes para a viabilidade de gametas e embriões. A estrutura celular desse órgão reprodutivo permite o transporte de embriões até o útero e auxilia em mecanismos de proteção

embrionária frente ao sistema imune materno (Li and Winuthayanon, 2017; Rizos et al., 2002).

Dessa maneira, o sistema de cultivo embrionário, utilizado na reprodução assistida, mostra-se um divisor no estabelecimento da competência embrionária, pois tem efeito significativo no metabolismo celular (Khurana and Niemann, 2000; Rizos et al., 2002), na composição, qualidade e sinalização lipídica (Sudano et al., 2016), na expressão gênica (Lonergan et al., 2006b). Contudo a diversidade de meios utilizados, comercialmente, remete a uma característica embrionária que protagoniza sua utilização nas biotecnologias reprodutivas: a plasticidade, ou seja, a capacidade de buscar a “competência”, a “sobrevivência” mesmo em meios que não suprem ou exacerbam suas necessidades fisiológicas (Khurana and Niemann, 2000; Lonergan et al., 2003a).

A capacidade de mudança nos parâmetros de consumo energético, conforme a fonte de nutriente disponível é um exemplo de plasticidade (Gardner et al., 2000; Gardner and Leese, 1988). Contudo essa característica pode acarretar alguns prejuízos à prole, através de anomalias. Em bovinos a síndrome da prole grande (McEvoy et al., 2000) e em humanos o sobrepeso ao nascimento (Li and Winuthayanon, 2017). Em bovinos essa anomalia é associada a uma fonte protéica utilizada durante o cultivo, o SFB, sendo caracterizada pelo tamanho anormal fetal e da placenta, aumento da miogênese, distocia, atividade pulmonar neonatal anormal e aumento da mortalidade pós neonatal (McEvoy et al., 2000; Walker et al., 1996).

O SFB também é associado ao aumento de gotas lipídicas citoplasmáticas e redução na criotolerância (Abe et al., 2002b). Acredita-se que as lipoproteínas presentes possam ser absorvidas pelas células embrionárias (Sata et al., 1999), e que o SFB altera o funcionamento da  $\beta$ -oxidação mitocondrial (Abe et al., 2002b). A utilização dessa fonte protéica tem forte correlação com altas taxas de produção de blastocistos (Holm et al., 1999). Contudo, recentemente meios livre de SFB vem mostrando resultados de produção similares, encorajando o aprimoramento de meios de cultivo substitutos ao SFB que viabilizem uma produção embrionária de qualidade e com menos aspectos negativos e a incorporação embrionária a novos mercados (Ferré et al., 2020b; Moreno et al., 2015; Stroebech et al., 2015).

A qualidade e a habilidade de desenvolvimento em embriões são variáveis importantes associadas à criotolerância e ao estabelecimento da prenhez, as quais podem ser compreendidas pela competência molecular e morfofuncional embrionária (Marsico et al., 2019). Em embriões PIV essas variáveis sofrem forte influência após a fertilização nas condições de cultivo e na composição do meio de cultivo (Tabela 1) (Enright et al., 2000; Lonergan et al., 2006b; Ramos-Ibeas et al., 2019; Thompson et al., 2007).

**Tabela 1. Prováveis efeitos de diferentes estressores durante o cultivo de embriões produzidos *in vitro* em diferentes espécies. Fonte: Ramos-Ibeas et al., 2019.**

<b>Estressores</b>	<b>Espécies</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referências</b>
Amônia	Camundongo	Taxas e qualidade de blastocisto reduzida, metabolismo e expressão gênica alterados	Gardner, Hamilton, McCallie, Schoolcraft, and Katz-Jaffe (2013); Lane and Gardner (2003)
	Vaca	Taxas de blastocistos reduzidas	Hammon, Wang, and Holyoak (2000)
	Humano	Atraso na clivagem, alterações no metabolismo taxa de blastocistos e expressão gênica	Gardner et al. (2013); Virant-Klun et al. (2006)
Soro	Camundongo	Redução na implantação, alterações na expressão gênica, desenvolvimento fetal anormal e transgeracional efeitos	Calle, Miranda et al. (2012); Fernandez-Gonzalez et al. (2004); Fernández-González et al. (2009)
	Vaca	Alterações na expressão gênica, síndrome da prole grande	Heras et al. (2016); Young Sinclair and Wilmut (1998)
	Humano	Alterações lipídicas nos blastômeros	Gardner and Kelley (2017)

Oxigeno Atmosférico	Camundongo	Redução na velocidade de desenvolvimento, taxa de blastocisto, número de células embrionárias, taxa de implantação e aumento de espécies reativas de oxigênio e marcadores apoptóticos e efeitos no transcriptoma	Ciray et al. (2009); Ma et al. (2017); Rinaudo et al. (2006)
	Vaca	Redução na taxa de blastocistos e número de células e efeitos no transcriptoma e epigenoma	Li et al. (2016); Rodina, Cooke, Hansen, and Ealy (2009); Thompson, Simpson, Pugh, Donnelly, and Tervit (1990)
	Humano	Redução na taxa de blastocisto, número de células e gestação e efeitos no transcriptoma	Catt and Henman (2000); Dumoulin et al. (1999); Kirkegaard, Hindkjaer and Ingerslev (2013); Kovacic and Vlaisavljevic (2008); Mantikou et al. (2016); Waldenstrom et al. (2009)
Cultivo de único embrião	Camundongo	Redução na taxa de blastocisto, número de células embrionárias	Dai, Xu, Wang, Sun, and Chian (2012); Melin et al. (2009)
	Vaca	Redução na taxa de blastocistos e numero de celulas embrionarias, aumento de apoptose	Wydooghe et al. (2014)
	Humano	Efeitos na formação e qualidade do blastocisto e	Ebner et al. (2010); Moessner and Dodson

		taxa gestacional	(1995); Rebollar-Lazaro and Matson (2010)
--	--	------------------	---

Por essa razão algumas estratégias não invasivas para aumentar a qualidade embrionária (e a criotolerância) incluem: adequada tensão de oxigênio (Bavister, 2004), baixas concentrações de SFB (Gómez et al., 2008; Murillo et al., 2017); formulações de meios definidos (Duque et al., 2003; Moreno et al., 2015); o uso de agentes delipidantes (Held-Hoelker et al., 2017; Sanches et al., 2013; Takahashi et al., 2013); o uso de células epiteliais do oviduto bovino (CEOB) (Lopera-Vasquez et al., 2017);

Essas abordagens remetem aos motivos de resultados de produção embrionária *in vitro* ainda se mostrarem aquém do que produzimos *in vivo*, pois não se tem estabelecido condições *in vitro* compatíveis com todas as necessidades fisiológicas de gametas e embriões. E nesse sentido a caracterização dos fatores que interferem na competência embrionária auxilia a sustentação da produção de meios de cultivo compatíveis com a produção em larga escala de blastocistos capazes de estabelecer a prenhez e de ampliar o uso de biotecnologias, como a criopreservação (Ferré et al., 2020a; Marsico et al., 2019; Wrenzycki, 2016).

## **2.3. Avaliação celular e molecular de viabilidade embrionária.**

### **2.3.1. Número total de células e Porcentagem de apoptose em embriões PIV**

A viabilidade/qualidade embrionária na PIV são características importantes para o sucesso da criopreservação e ao estabelecimento da prenhez. A compreensão de características moleculares e morfofuncionais de blastocistos auxilia no aprimoramento de biotecnologias reprodutivas (Maddox-Hyttel et al., 2019; Marsico et al., 2019; Sudano et al., 2011). Os efeitos da criopreservação em embriões reduzem as taxas de

sobrevivência após o aquecimento devido aos danos morfológicos e funcionais ocorridos durante o processo (Valente et al., 2020).

Dentre as características morfofuncionais utilizada para seleção embrionária à avaliação recomendada pela International Embryo Transfer Society - IETS é amplamente utilizada na rotina da PIV (Bó and Mapletoft, 2013). Contudo sabe-se que apenas essa avaliação não é capaz de diagnosticar problemas durante o cultivo (L Vandaele and Van Soom, 2011). Outra ferramenta utilizada para avaliar a qualidade embrionária é a contagem do número total de células e porcentagem de células em apoptose (Jacobson et al., 1997; Maddox-Hyttel et al., 2019; Rätty et al., 2011). O número de células embrionárias durante o desenvolvimento inicial sustenta o desenvolvimento fetal normal, pois é correlacionado com o estabelecimento e manutenção da gestação (Lane, 1997). Além disso, em embriões PIV criopreservados o número total de células pode ser utilizado como ferramenta na seleção de embriões com capacidade de eclosão após aquecimento (Valente et al., 2020).

A morte celular por apoptose é observada como uma característica normal em embriões PIV e embriões derivados *in vivo* (Hardy, 1997). Condições subótimas de cultivo, durante a PIV, podem gerar danos celulares incompatíveis com o desenvolvimento embrionário (L. Vandaele and Van Soom, 2011). O processo de criopreservação apresenta desafios térmicos, mecânicos, tóxicos e osmóticos ao embrião, que em resposta pode ativar mecanismos reguladores da sobrevivência celular (Byrne et al., 2004; Marsico et al., 2019; Sudano et al., 2014). Sendo a porcentagem de apoptose após o aquecimento importante indicador de qualidade embrionária, visto que aponta danos celulares. Além disso, influencia a capacidade de re-expansão de blastocistos bovinos (Valente et al., 2020).

#### **2.4.Prenhez em embriões PIV**

O melhor método para determinar a competência embrionária no desenvolvimento de uma prole viável é a taxa de prenhez após a transferência embrionária (Hansen et al., 2010). O diagnóstico gestacional em ruminantes é a ferramenta utilizada para direcionar o melhor manejo reprodutivo em fazendas e geralmente é realizado por ultrassonografia aos 28-32 dias da transferência embrionária (Hansen et al., 2017). A presença de resultados de taxa de prenhez em estudos de sistemas de produção *in vitro* auxilia o aprimoramento da biotecnologia, tornando a pesquisa mais próxima dos objetivos reprodutivos da pecuária. Contudo, é um resultado escasso em trabalhos disponíveis, pois a utilização do resultado gestacional demanda um número suficiente de ensaios para se mostrar confiável, o que necessita maior investimento técnico e econômico (Hansen et al., 2010; Serapião et al., 2005). Na literatura observa-se que embriões PIV a fresco apresentam uma taxa de prenhez entre 30-40% (Block et al., 2009; Murillo et al., 2017). Quando a taxa de prenhez é avaliada após o aquecimento, diferentes variáveis presentes nos estudos, não permitem a comparação, mas evidencia o quanto a falta de dados homogêneos sobre a taxa de prenhez de embriões PIV criopreservados pode desacelerar o sucesso da criopreservação (Ferré et al., 2020b).

#### **2.5.Análise transcricional em embriões PIV**

A análise molecular auxilia na caracterização e seleção de embriões de qualidade, pois reflete o estado funcional e fisiológico embrionário (Marsico et al., 2019). Em embriões PIV o padrão transcricional é drasticamente alterado devido ao sistema de produção *in vitro* (Lonergan et al., 2006a; Rizos et al., 2008b). A análise da expressão gênica possibilita a identificação de genes importantes para o desenvolvimento inicial. Além disso, pode transparecer as alterações que um ambiente subótimo de cultivo oferece aos embriões, visto que a plasticidade embrionária possibilita ao embrião tentar se adaptar ao ambiente estressor. Em longo prazo alterações fetais e pós-natal são frequentemente associadas a distúrbios no padrão de



expressão gênica e de metabolismo, durante a fase de blastocisto (Leese, 2002; Lonergan et al., 2006a; Rizos et al., 2008b).

A expressão gênica tem importante função na coordenação de mecanismos homeostáticos e metabólicos durante a vida. O controle rigoroso durante a fase de pré-implantação é fundamental devido aos importantes processos biológicos que ocorrem no período (Lonergan et al., 2006a). Análise transcricional de blastocistos, competentes ao desenvolvimento da prenhez, mostra-se diferente de não competentes, sendo vias relacionadas à resposta celular ao estresse e a sobrevivência celular bastante afetada em embriões pouco competentes (Zolini et al., 2020). Zolini et al. (2020) demonstraram 617 genes diferencialmente expressos em embriões que sobreviveram até o primeiro diagnóstico gestacional (30 dias) em relação aos que não sobreviveram. A caracterização de um perfil transcricional favorável ao estabelecimento e manutenção da gestação tem potencial para ser utilizado como marcador de competência embrionária (Marsico et al., 2019).

A compreensão das vias moleculares afetadas auxilia na identificação e no controle de estressores durante a produção *in vitro*, melhorando a produção de embriões de qualidade e proles saudáveis (Lonergan et al., 2006a; Marsico et al., 2019; Ramos-Ibeas et al., 2019). O metabolismo lipídico embrionário é bastante afetado durante o cultivo. O perfil transcricional em conjunto com outras ferramentas de avaliação lipídica (conteúdo lipídico, morfometria lipídica e análise da qualidade lipídica) pode evidenciar alterações em genes envolvidos no metabolismo lipídico. Essa análise conjunta auxilia na compreensão de importantes mecanismos celulares que podem afetar a competência e criotolerância de embriões PIV (Lanzarini et al., 2021; Sudano et al., 2014; Sudano et al., 2016). Recentemente foi demonstrado que o bloqueio transitório da expressão da ELOVL5 reduz a expressão de espécies específicas de lipídios e aumenta a deposição de gotas lipídicas no citoplasma embrionário, o que pode influenciar na criotolerância (Lanzarini et al., 2021).

A criopreservação altera a expressão gênica devido ao desafio celular (osmótico, térmico, químico-físico) (Gupta et al., 2017). Dessa forma a literatura apresenta genes diferencialmente expressos entre embriões PIV frescos e vitrificados (de Oliveira Leme et al., 2016). A eficiência da análise molecular é sugerida por meio da comparação da

expressão gênica entre embriões congelados e vitrificados. Apesar da avaliação morfológica não demonstrar importantes diferenças entre os embriões, os genes diferencialmente expressos apontam os diferentes desafios moleculares entre as técnicas e sugerem melhores resultados associados à vitrificação em embriões PIV (Stinshoff et al., 2011). Recentemente Marsico et al. (2020) demonstraram através da análise do perfil transcricional que embriões com alta e baixa criotolerância apresentam distinto perfil transcricional, pois provavelmente desenvolvem diferentes estratégias para superar os desafios durante a criopreservação.

## **2.6.O papel dos lipídios na qualidade embrionária à criopreservação**

Os lipídios são importante fonte de energia, durante o desenvolvimento celular, participam ativamente de vias de metabolismo energético embrionário (Hu and Yu, 2017). Ademais, são biomoléculas celulares essenciais na composição da membrana plasmática de varias organelas (Di Paolo and De Camilli, 2006). Na reprodução os lipídios participam do “*cross-talk*” durante o estabelecimento da prenhez, pois possuem importante papel na sinalização e coordenação de eventos biológicos por meio de lipídios mediadores como fosfatidilinositóis, esfingolipídios e eicosanoides (Di Paolo and De Camilli, 2006; Wang and Dey, 2005).

Devido à complexibilidade da função lipídica, no desenvolvimento celular, mostra-se importante a utilização de diferentes ferramentas para a análise lipídica celular, averiguando então, a quantidade e qualidade dessas biomoléculas para a obtenção de resultados satisfatórios no esclarecimento de suas ações durante o desenvolvimento embrionário e a criopreservação (Abe et al., 2002a; Ferreira et al., 2010; López-Damián et al., 2018a; Sudano et al., 2012).

As gotas lipídicas são componentes celulares que mantém a viabilidade celular durante a criopreservação (López-Damián et al., 2018b). E em embriões PIV, produzidos na presença de SFB, observa se um acúmulo lipídico exacerbado o qual é fortemente correlacionado com a menor criotolerância (Abe et al., 2002b). Recentemente, estudos têm demonstrado que não apenas a quantidade, mas sim a morfometria (quantidade,

tamanho, morfologia e composição) e organização das gotas lipídicas confere diferente propriedade celular e sensibilidade a criopreservação (López-Damián et al., 2018b; Seidel, 2006; Suzuki et al., 2011). Esses achados refletem o papel fisiológico das gotas, visto que são organelas ativas, que respondem as mudanças celulares, alterando seu número, tamanho e composição para garantir a manutenção da homeostase lipídica (Khor et al., 2013; Thiam and Beller, 2017).

O perfil lipídico (composição e estruturação de fosfolípidios) estabelece as propriedades físico-químicas da membrana celular determinantes para a viabilidade após a criopreservação: fluidez, permeabilidade e comportamento térmico (Leão et al., 2014; Sudano et al., 2012; Tata et al., 2013; Van Meer et al., 2008). Em embriões bovinos o sucesso na criopreservação é afetado pela composição lipídica. Os lipídios de membrana: fosfatidilcolinas (PCs) e esfingomielinas (SMs) possuem importante função na manutenção da membrana durante o congelamento (Leão et al., 2017; Sudano et al., 2012). Os constituintes proteicos das formulações de meio de cultivo podem afetar negativamente a composição da membrana plasmática embrionária, através da incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol, resultando em uma membrana menos permeável e mais rígida, explicando a susceptibilidade do embrião PIV à criopreservação (Barceló-Fimbres and Seidel, 2007; Rizo et al., 2008b). Dessa forma a análise do perfil lipídico em embriões PIV pode ser utilizada como potencial marcador de criotolerância em embriões bovinos (Leão et al., 2017).

### **3.HIPÓTESE**

Esta dissertação tem por hipótese que as formulações de meio de cultivo A e B, livres de SFB, produzem embriões com melhor viabilidade celular, características lipídicas e perfil transcricional, refletindo positivamente na produção e criotolerância de embriões e taxa de prenhez de embriões PIV transferidos.

### **4.OBJETIVOS**

Objetivo geral: Avaliar o efeito de diferentes formulações de meios de cultivo livres de SFB e suplementadas com meio A ou B, sobre a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV).

#### **4.1.Objetivos específicos:**

1. Avaliar os efeitos de diferentes formulações de meios de cultivo na produção embrionária bovina *in vitro*.
2. Quantificar o conteúdo lipídico de embriões oriundos dos diferentes grupos experimentais com a utilização da coloração de Sudan Black.
3. Avaliar a morfometria de gotas lipídicas de embriões oriundos dos diferentes grupos experimentais com a utilização da avaliação morfométrica com o Image J.
4. Avaliar o perfil lipídico dos diferentes grupos experimentais produzidos *in vitro* utilizando como perfil referência embriões produzidos *in vivo*.
5. Avaliar número total de células (Image J) e porcentagem de células em apoptose pela técnica de TUNEL (Image J) dos referidos grupos após a vitrificação/aquecimento dos embriões.
6. Avaliar a criotolerância embrionária dos referidos grupos após a vitrificação/aquecimento dos embriões por meio da observação da taxa de eclosão 12h após o aquecimento.

7. Identificar genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, apoptose, metabolismo lipídico e a estrutura de membrana plasmática.

8. Avaliar a competência embrionária, do meio controle e meio MB, através do estabelecimento da prenhez com o diagnóstico de gestacional aos 45 dias após transferência embrionária.

## **5.CAPÍTULO 1- ARTIGO CIENTÍFICO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções: material e métodos, resultados, discussão e referências estão descritas no próprio manuscrito, o qual será submetido para publicação no periódico *Theriogenology*.

O manuscrito “*In vitro* evaluation of a novel culture medium for the enhanced cryo-survival of embryos in a large-scale *in vitro* bovine embryo production program”, já preparado na língua inglesa, foi adequado conforme sugestões da banca examinadora, desse documento de dissertação.

A subtração do manuscrito no documento, em PDF, foi para se precaver de conflitos com editora. O formato impresso, entregue a Universidade Federal do Pampa-Urugaiana –RS, apreciará do manuscrito, após o período de cinco anos a partir da data de entrega da dissertação.

## 6.CONCLUSÃO

A maior sensibilidade de embriões PIV a criopreservação pode ser compreendida através da caracterização lipídica em conjunto com outras técnicas de biologia molecular, como as utilizadas neste trabalho. Dessa forma, destacam a importância da compreensão dos mecanismos lipídicos envolvidos na criotolerância, em consequência ao meio de cultivo. Esse direcionamento na pesquisa auxilia no aprimoramento das formulações utilizadas na PIV e impulsiona outras biotecnologias como a criopreservação, a qual é capaz de exponenciar a produção e a exploração comercial da PIV.

O presente trabalho investigou a eficácia de formulações (MA e MB) aprimoradas para a produção de embriões criotolerantes e competentes no estabelecimento da prenhez. Constatou-se que o uso da formulação MB favorece a produção de embriões PIV, com características lipídicas próximas a embriões produzidos *in vivo*, com morfometria lipídica favorável a criopreservação, contudo sem demonstrar diferença no conteúdo lipídico em relação aos demais. O que ressalta a importância de um estudo multidirecional em relação aos lipídios embrionários para facilitar a compreensão da ação de formulações de cultivo em características importantes para a qualidade e competência embrionária.

Além disso, o perfil transcricional de embriões MB apresenta poucas alterações, sugerindo um menor dano ao metabolismo lipídico causado pelas condições da formulação. O meio MB mostrou sua eficiência na produção, na viabilidade celular, na criotolerância e na competência em estabelecer a prenhez em relação ao grupo controle. E por essa razão acreditamos que a formulação MB melhora a criopreservação sem

afetar a competência no desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da prenhez podendo ser utilizado em larga escala na PIV.



## 7.REFERÊNCIAS

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 2002a. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H., 2002b. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- Ashry, M., Smith, G.W., 2015. Application of embryo transfer using in vitro produced embryos: Intrinsic factors affecting efficiency. *Cattle Pract.*
- Barceló-Fimbres, M., Seidel, G.E., 2007. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.20699>
- Bavister, B., 2004. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod. Biomed. Online.* [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61630-6](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61630-6)
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P.J., 2010. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium1. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3443>
- Block, J., Bonilla, L., Hansen, P.J., 2009. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.007>
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J., 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F., Dressel, M.A., 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.1.147>
- Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J., 2004. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Reproduction.* <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170097>
- Dalcin, L; Lucci, C., 2010. Criopreservação de embriões de animais de produção : princípios criobiológicos e estado atual. *Rev. bras. Reprod. Anim.*
- de Oliveira Leme, L., Dufort, I., Spricigo, J.F.W., Braga, T.F., Sirard, M.A., Franco, M.M., Dode, M.A.N., 2016. Effect of vitrification using the Cryotop method on the

gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.016>

Del Collado, M., Saraiva, N.Z., Lopes, F.L., Gaspar, R.C., Padilha, L.C., Costa, R.R., Rossi, G.F., Vantini, R., Garcia, J.M., 2016. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD15067>

Dey, S.K., Matsumoto, H., Daikoku, T., Wang, H., Ko, M.S.H., Hamatani, T., Carter, M.G., 2004. Global gene expression analysis identifies molecular pathways distinguishing blastocyst dormancy and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0402597101>

Di Paolo, G., De Camilli, P., 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05185>

Duque, P., Gómez, E., Díaz, E., Facal, N., Hidalgo, C., Díez, C., 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01134-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01134-2)

Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., Boland, M.P., 2000. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00381-2)

Ferré, L. B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P.J., 2020. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>

Ferré, Luis B., Kjelland, M.E., Taiyeb, A.M., Campos-Chillon, F., Ross, P.J., 2020. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/rda.13667>

Ferreira, C.R., Saraiva, S.A., Catharino, R.R., Garcia, J.S., Gozzo, F.C., Sanvido, G.B., Santos, L.F.A., Lo Turco, E.G., Pontes, J.H.F., Basso, A.C., Bertolla, R.P., Sartori, R., Guardieiro, M.M., Perecin, F., Meirelles, F. V., Sangalli, J.R., Eberlin, M.N., 2010. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J. Lipid Res.* <https://doi.org/10.1194/jlr.D001768>

Fontes, P.K., Castilho, A.C.S., Razza, E.M., Nogueira, M.F.G., 2020. Bona fide gene expression analysis of samples from the bovine reproductive system by microfluidic platform. *Anal. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113641>

Gardner, D.K., Leese, H.J., 1988. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development*.

- Gardner, D.K., Pool, T.B., Lane, M., 2000. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin. Reprod. Med.* <https://doi.org/10.1055/s-2000-12559>
- Ghetler, Y., Yavin, S., Shalgi, R., Arav, A., 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/dei236>
- Goddard, M.E., Hayes, B.J., Meuwissen, T.H.E., 2010. Genomic selection in livestock populations. *Genet. Res. (Camb)*. <https://doi.org/10.1017/S0016672310000613>
- Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J.N., Hidalgo, C.O., Morán, E., Facal, N., Díez, C., 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.015>
- Gupta, A., Singh, J., Dufort, I., Robert, C., Dias, F.C.F., Anzar, M., 2017. Transcriptomic difference in bovine blastocysts following vitrification and slow freezing at morula stage. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187268>
- Hansen, P.J., Block, J., Loureiro, B., Bonilla, L., Hendricks, K.E.M., 2010. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD09212>
- Hansen, T.R., Sinedino, L.D.P., Spencer, T.E., 2017. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0315>
- Hardy, K., 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Mol. Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/molehr/3.10.919>
- Held-Hoelker, E., Klein, S.L., Rings, F., Salilew-Wondim, D., Zidane, M., Neuhoff, C., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M., 2017. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.014>
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callesen, H., 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- Hu, K., Yu, Y., 2017. Metabolite availability as a window to view the early embryo microenvironment in vivo. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.22868>
- International Embryo Transfer Society - IETS, 2017. 2016 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals, Embryo Transfer Newsletter. <https://doi.org/10.1071/RD13259>

- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C., 1997. in *Animal Development* 88, 347–354.
- Kao, W.W.Y., Funderburgh, J.L., Xia, Y., Liu, C.Y., Conrad, G.W., 2006. Focus on molecules: Lumican. *Exp. Eye Res.* <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.08.012>
- Khor, V.K., Shen, W.J., Kraemer, F.B., 2013. Lipid droplet metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283651106>
- Khurana, N.K., Niemann, H., 2000. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.*
- Lane, M., 1997. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* <https://doi.org/10.1007/BF02766148>
- Lanzarini, F., Pereira, F.A., de Camargo, J., Oliveira, A.M., Belaz, K.R.A., Melendez-Perez, J.J., Eberlin, M.N., Brum, M.C.S., Mesquita, F.S., Sudano, M.J., 2021. ELOVL5 participates in embryonic lipid determination of cellular membranes and cytoplasmic droplets. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22031311>
- Leão, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Cabral, E.C., Franco, M.F., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Filgueiras, P.R., Mingoti, G.Z., 2014. Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote.* <https://doi.org/10.1017/S0967199414000380>
- Leão, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Nogueira, É., Cabral, E.C., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Accorsi, M.F., Neves, T. V., Mingoti, G.Z., 2017. Membrane lipid profile of in vitro-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD15414>
- Leese, H.J., 2002. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays.* <https://doi.org/10.1002/bies.10137>
- Li, S., Winuthayanon, W., 2017. Oviduct: Roles in fertilization and early embryo development. *J. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A.C.O., 2006a. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A.C.O., 2006b. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.028>
- Lonergan, P., Fair, T., Forde, N., Rizos, D., 2016. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>

- Lonergan, P., Rizos, D., Guitiérrez-Adán, A., Boland, M.P., 2003a. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - Experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62088-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62088-3)
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P., 2003b. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns, in: *Reproduction in Domestic Animals*. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00437.x>
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Lloreda, V., Coy, P., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., 2017. Effect of bovine oviductal fluid on development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD15238>
- López-Damián, E.P., Jiménez-Medina, J.A., Lammoglia, M.A., Pimentel, J.A., Agredano-Moreno, L.T., Wood, C., Galina, C.S., Fiordelisio, T., 2018a. Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* <https://doi.org/10.1111/ahe.12382>
- López-Damián, E.P., Jiménez-Medina, J.A., Lammoglia, M.A., Pimentel, J.A., Agredano-Moreno, L.T., Wood, C., Galina, C.S., Fiordelisio, T., 2018b. Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* <https://doi.org/10.1111/ahe.12382>
- Maddox-Hyttel, P., Gjørret, J., Vajta, G., Alexopoulos, N., Lewis, I., Trounson, A., Viuff, D., Laurincik, J., Müller, M., Tveden-Nyborg, P., Thomsen, P., 2019. Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Biosci. Proc.* <https://doi.org/10.1530/biosciproc.5.009>
- Mamo, S., Carter, F., Lonergan, P., Leal, C.L.V., Al Naib, A., McGettigan, P., Mehta, J.P., Evans, A.C.O., Fair, T., 2011. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: Potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-151>
- Márquez-Alvarado, Y.C., Galina, C.S., Castilla, B., León, H., Moreno-Mendoza, N., 2004. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the Tunel technique. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00492.x>
- Marsico, T. V., Caetano, D.P., Rodrigues, R., Valente, R.S., Fontes, P.K., Mesquita, F.S., Andrade, S.C. d. S., Basso, A.C., Nogueira, M.F.G., Sudano, M.J., 2020. Transcriptional profiling of embryo cryotolerance. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.23436>
- Marsico, T. V., de Camargo, J., Valente, R.S., Sudano, M.J., 2019. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features. *Anim. Reprod.* <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0072>

- McEvoy, T.G., Sinclair, K.D., Young, L.E., Wilmut, I., Robinson, J.J., 2000. Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: Relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum. Fertil.* <https://doi.org/10.1080/1464727002000199061>
- Moreno, D., Neira, A., Dubreil, L., Liegeois, L., Destrumelle, S., Michaud, S., Thorin, C., Briand-Amirat, L., Bencharif, D., Tainturier, D., 2015. In vitro bovine embryo production in a synthetic medium: Embryo development, cryosurvival, and establishment of pregnancy. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.014>
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H., 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>
- Murillo, A., Muñoz, M., Martín-González, D., Carrocera, S., Martínez-Nistal, A., Gómez, E., 2017. Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reprod. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.04.002>
- Park, S.Y., Kim, E.Y., Cui, X.S., Tae, J.C., Lee, W.D., Kim, N.H., Park, S.P., Lim, J.H., 2006. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote.* <https://doi.org/10.1017/s0967199406003649>
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., First, N.L., 1988. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin1. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Schwarz, K.R.L., Maziero, R.R.D., Guastali, M.D., Crocomo, L.F., Magalhães, L.C.O., Martins, A., Leal, C.L.V., Landim-Alvarenga, F. da C., 2017. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.011>
- Pinyopummintr, T., Bavister, B.D., 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology.* [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90481-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90481-W)
- Ponsart, C., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T., Lacaze, S., Charreaux, F., Schibler, L., Dupassieux, D., Mullaart, E., 2014. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD13328>
- Pontes, J.H.F., Melo Sterza, F.A., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B. V., Rubin, K.C.P., Seneda, M.M., 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos

- indicus) donors. Theriogenology.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>
- Ramos-Ibeas, P., Heras, S., Gómez-Redondo, I., Planells, B., Fernández-González, R., Pericuesta, E., Laguna-Barraza, R., Pérez-Cerezales, S., Gutiérrez-Adán, A., 2019. Embryo responses to stress induced by assisted reproductive technologies. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.23119>
- Räty, M., Ketoja, E., Pitkänen, T., Ahola, V., Kananen, K., Peippo, J., 2011. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology.* <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.09.134>
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De La Fuente, J., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., 2008a. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
- Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., De La Fuente, J., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., 2008b. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Pérez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M.P., Lonergan, P., 2003. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M.P., Lonergan, P., 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>
- Sanches, Bruno Valente, Zangirolamo, A.F., da Silva, N.C., Morotti, F., Seneda, M.M., 2017. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: Challenges for commercial implementation. *Anim. Reprod.* <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR995>
- Sanches, B. V., Marinho, L.S.R., Filho, B.D.O., Pontes, J.H.F., Basso, A.C., Meirinhos, M.L.G., Silva-Santos, K.C., Ferreira, C.R., Seneda, M.M., 2013. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bosindicus embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.026>
- Sanches, B. V., Zangirolamo, A.F., Silva, N.C., Morotti, F., Seneda, M.M., 2017. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Anim. Reprod.* <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar995>
- Santos, V.G., Machado, R., Sudano, M.J., Ferreira, C.R., Buratini, J., Tata, A.,

- Paschoal, D.M., Eberlin, M.N., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2012. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897>
- Sata, R., Tsujii, H., Abe, H., Yamashita, S., Hoshi, H., 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serumfree and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.* <https://doi.org/10.1262/jrd.45.97>
- Seidel, G.E., 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.025>
- Sena-Netto, S.B., Sprícigo, J.F.W., Leme, L.O., Guimarães, A.L.S., Caixeta, F.M.C., Dode, M.A.N., Pivato, I., 2020. The Replacement of Fetal Bovine Serum with Bovine Serum Albumin During Oocyte Maturation and Embryo Culture Does Not Improve Blastocyst Quality After Slow Freezing Cryopreservation. *Biopreserv. Biobank.* <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0059>
- Serapião, R.V., Sá, W.F. de, Ferreira, A. de M., Camargo, L.S. de A., Gilardi, S.G.T., Viana, J.H.M., Ramos, A. de A., Nogueira, L.A.G., 2005. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev. Bras. Ciência Veterinária* 12, 58–61. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.303>
- Souza, J.F., Lienou, L.L., Rodrigues, A.P.R., Alexandrino, E., Cavalcante, T. V., Santos, R.R., Figueiredo, J.R., Dias, F.E.F., 2018. Cryosurvival after exposure of IVF-derived Nellore embryos to different cryoprotectants and exposure times during vitrification. *Cryobiology.* <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.009>
- Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., Wrenzycki, C., 2011. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology.* <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.013>
- Stroebech, L., Mazzoni, G., Pedersen, H.S., Freude, K.K., Kadarmideen, H.N., Callesen, H., Hyttel, P., 2015. In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Anim. Reprod.*
- Sudano, M., Paschoal, D., Maziero, R., Rascado, T., Crocomo, L., Magalhães, L., Monteiro, B., Martins Jr, A., Machado, R., Landim-Alvarenga, F., 2013. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Anim. Reprod.*
- Sudano, Mateus J., Caixeta, E.S., Paschoal, D.M., Martins, A., Machado, R., Buratini, J., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2014a. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD13099>
- Sudano, Mateus J., Caixeta, E.S., Paschoal, D.M., Martins, A., Machado, R., Buratini,



- J., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2014b. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD13099>
- Sudano, Mateus José, Paschoal, D.M., Da Silva Rascado, T., Crocomo, L.F., Magalhães, L.C.O., Junior, A.M., Machado, R., Da Cruz Landim-Alvarenga, F., 2014. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000196>
- Sudano, M.J., Paschoal, D.M., da Silva Rascado, T., Magalhães, L.C.O., Crocomo, L.F., de Lima-Neto, J.F., da Cruz Landim-Alvarenga, F., 2011. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>
- Sudano, M.J., Rascado, T.D.S., Tata, A., Belaz, K.R.A., Santos, V.G., Valente, R.S., Mesquita, F.S., Ferreira, C.R., Araújo, J.P., Eberlin, M.N., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2016. Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.025>
- Sudano, M.J., Santos, V.G., Tata, A., Ferreira, C.R., Paschoal, D.M., Machado, R., Buratini, J., Eberlin, M.N., Landim-Alvarenga, F.D.C., 2012. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts1. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897>
- Suzuki, M., Shinohara, Y., Ohsaki, Y., Fujimoto, T., 2011. Lipid droplets: Size matters. *J. Electron Microsc.* (Tokyo). <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfr016>
- Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T., Manabe, N., 2013. Supplementation of culture medium with class L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD11262>
- Tata, A., Sudano, M.J., Santos, V.G., Landim-Alvarenga, F.D.C., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., 2013. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. *J. Mass Spectrom.* <https://doi.org/10.1002/jms.3231>
- Tedeschi, J.N., Kennington, W.J., Berry, O., Whiting, S., Meekan, M., Mitchell, N.J., 2015. Increased expression of Hsp70 and Hsp90 mRNA as biomarkers of thermal stress in loggerhead turtle embryos (*Caretta Caretta*). *J. Therm. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.11.006>
- Thiam, A.R., Beller, M., 2017. The why, when and how of lipid droplet diversity. *J. Cell Sci.* <https://doi.org/10.1242/jcs.192021>
- Thompson, J.G., Mitchell, M., Kind, K.L., 2007. Embryo culture and long-term consequences. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD06129>

- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H., 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199809\)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V)
- Vajta, G., Kuwayama, M., 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>
- Valente, R.S., Almeida, T.G. de, Alves, M.F., Paschoal, D.M., Basso, A.C., Sudano, M.J., 2020. Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.026>
- Valente, R.S., de Almeida, T.G., Alves, M.F., de Camargo, J., Basso, A.C., Belaz, K.R.A., Eberlin, M.N., da Cruz Landim-Alvarenga, F., Fontes, P.K., Nogueira, M.F.G., Sudano, M.J., 2019. Modulation of long-chain Acyl-CoA synthetase on the development, lipid deposit and cryosurvival of in vitro produced bovine embryos. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220731>
- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W.G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., Gstraunthaler, G., 2018. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
- Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Van Wagendonk-de Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., Rall, W.F., 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00340-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00340-3)
- Vandaele, L., Van Soom, a, 2011. Intrinsic factors affecting apoptosis in bovine in vitro produced embryos., *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België*.
- Vandaele, L., Van Soom, A., 2011. Intrinsic factors affecting apoptosis in bovine in vitro produced embryos. *Verh. K. Acad. Geneeskd. Belg.*
- Viana, J., 2019a. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol. Newsletter-IETS*.
- Viana, J., 2019b. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol. Newsletter-IETS*.
- Visintin, J.A., Martins, J.F.P., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R.B., Nicácio, A.C., Assumpção, M.E.O.A., 2002. Cryopreservation of bos taurus vs bos indicus embryos: Are they really different?, in: *Theriogenology*.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00675-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00675-6)

- Walker, S.K., Hartwich, K.M., Seamark, R.F., 1996. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges. *Theriogenology*. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00360-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00360-K)
- Wang, H., Dey, S.K., 2005. Lipid signaling in embryo implantation, in: *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.09.013>
- Wrenzycki, C., 2016. In vitro culture systems: how far are we from optimal conditions? *Anim. Reprod.* <https://doi.org/10.21451/1984-3143-ar869>
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carnwath, J.W., Niemann, H., 1999. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K)
- Wrenzycki, C., Stinshoff, H., 2013. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/rda.12204>
- Zolini, A.M., Block, J., Rabaglino, M.B., Tríbulo, P., Hoelker, M., Rincon, G., Bromfield, J.J., Hansen, P.J., 2020. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancy. *Biol. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz190>
- Zolini, A.M., Carrascal-Triana, E., Ruiz de King, A., Hansen, P.J., Alves Torres, C.A., Block, J., 2019. Effect of addition of L-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.005>