

LAILA SUCCAR TEIXEIRA DO ROSÁRIO RAHME

**EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO NA SOBREVIVÊNCIA
PÓS CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciência
Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Co-orientadores: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária- UFMG
2012**

R147e Rahme, Laila Succar Teixeira do Rosário, 1984-
Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Laila Succar Teixeira do Rosário Rahme. – 2012.
42 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

Co-orientadores: Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Marc Roger Jean Marie Henry

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Bovino – Embriões – Criopreservação – Teses.
3. Reprodução animal – Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida. III. Henry, Marc Roger Jean Marie. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 926

Dissertação defendida e aprovada em 12 de abril de 2012, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Alan Maia Borges
Orientador

Prof. Moysés dos Santos Miranda

Prof. Vicente Ribeiro do Valle Filho

“Estou certo que somos os senhores do nosso destino, de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das nossas forças; de que suas dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada.”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Álan Maia Borges, pelo apoio e confiança depositada em mim.

Aos meus co-orientadores Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo e Dr. Marc Roger Jean Marie Henry pela ajuda na compra dos materiais de consumo para desenvolvimento do projeto e dos conselhos durante todo o período do estudo.

À Escola de Veterinária da UFMG por possibilitar a realização deste trabalho.

Aos professores Otávio Mitto Ohashi e Moysés dos Santos Miranda pelo apoio e valiosas contribuições oferecidas durante o experimento.

Ao amigo, Prof. Gábor Vajta, por não medir esforços em ajudar e pelos valiosos ensinamentos.

À Prof^a. Ângela Lana e Danilo Bastos pelas análises estatísticas e atenção dispensada.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação e do Departamento de Clínica e Cirurgia pela atenção dispensada.

A toda equipe da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora pelo apoio durante este projeto, em especial ao amigo João Gabriel.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À amiga Fabiana, pela ajuda e incentivo.

Ao matadouro Frigobet, por disponibilizar os ovários para este trabalho.

À Raquel, pela amizade, compreensão e apoio.

Aos amigos e colaboradores Bárbara, Cairo e Frederico pela grande ajuda.

Aos estagiários por ajudarem na coleta de ovários e à técnica de laboratório Eliane pelo apoio.

Ao Bruno por toda paciência, compreensão e amor.

À minha família por acreditarem em mim e me apoiarem sempre. Em especial a minha mãe pela paciência.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| RESUMO | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| 1. Introdução | 11 |
| 2. Revisão de literatura | 12 |
| 2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos | 12 |
| 2.2. Efeito da adição de soro fetal bovino em meios de cultura utilizados na PIV | 12 |
| 2.3. Fatores que influenciam a resistência à criopreservação de embriões PIV | 14 |
| 2.4. Vitrificação | 16 |
| 2.5. Ácido linoléico conjugado (isômero <i>trans 10 - cis 12</i>) | 17 |
| 3. Material e Métodos | 18 |
| 3.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões | 19 |
| 3.1.1. Coleta dos ovários | 19 |
| 3.1.2. Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cummulus-oophurus</i> (CCOs) | 20 |
| 3.1.3. Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos | 20 |
| 3.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões | 20 |
| 3.2. Análise do conteúdo lipídico do citoplasma das células embrionárias | 21 |
| 3.2.1. Coloração da amostra | 21 |
| 3.2.2. Quantificação da fluorescência | 21 |
| 3.3. Vitrificação e sobrevivência dos embriões após aquecimento | 21 |
| 3.4. Avaliação da concentração de peróxidos (H ₂ O ₂) no meio de cultivo dos tratamentos | 22 |
| 3.5. Análises Estatística | 23 |
| 4. Resultados e Discussão | 23 |
| 4.1. Taxas de clivagem e de produção de blastocistos | 23 |
| 4.2. Avaliação do conteúdo lipídico intracitoplasmático dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> | 25 |
| 4.3. Taxas de reexpansão e de eclosão de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e vitrificados | 28 |
| 4.4. Avaliação da concentração de radicais livres nos meios de cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos | 31 |
| 5. Conclusões | 33 |
| 6. Referências bibliográficas | 33 |
| 7. Anexos | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Grupos experimentais | 19 |
| Tabela 2. Classificação da qualidade dos complexos <i>cummulus oophorus</i> (CCOs) aspirados de ovários de bovinos, segundo metodologia proposta por Viana et al. (2004) | 20 |
| Tabela 3. Taxas de clivagem de oócitos e de produção <i>in vitro</i> de blastocistos bovinos em relação aos embriões clivados segundo os diferentes grupos experimentais | 23 |
| Tabela 4. Taxas de reexpansão e de eclosão dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental | 28 |
| Tabela 5. Taxas de eclosão de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e vitrificados, após período de 72 horas após aquecimento | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Cronograma das atividades laboratoriais após colocação dos embriões bovinos no meio de cultivo <i>in vitro</i> | 22 |
| Figura 2. Intensidade média de fluorescência (média \pm desvio padrão) em unidades arbitrárias, das mórulas (D5) produzidas nos diferentes grupos experimentais e coradas pelo <i>Nile Red</i> | 26 |
| Figura 3. Imagem de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> e corados com <i>Nile Red</i> , no quinto dia de cultivo. (A) Embrião do grupo controle - grupo com soro; (B) embrião cultivado no grupo com soro + CLA; (C) embrião cultivado no grupo sem soro; e (D) embrião cultivado no grupo sem soro + CLA. | 27 |
| Figura 4. Embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> durante o processo de eclosão (A) e reexpansão (B), após vitrificação e aquecimento | 29 |
| Figura 5. Concentração de peróxido (H ₂ O ₂) no meio de cultivo dos quatro grupos experimentais após 168 horas de incubação; valores representados em μ M | 31 |

RESUMO

O congelamento dos embriões bovinos produzidos *in vitro* ainda é um ponto crítico para a melhoria dos resultados da biotécnica, uma vez que permite o aproveitamento comercial dos embriões excedentes. A maior quantidade de lipídeos no citoplasma das células embrionárias implica em redução na qualidade embrionária e no potencial de congelabilidade dos mesmos. O presente experimento teve por objetivo testar a influência da adição do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) e/ou soro fetal bovino ao meio de cultivo sobre a concentração de lipídeos intracitoplasmáticos em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram usados quatro meios de cultivo: tratamento 1 (T1 - controle, 443 oócitos) – meio SOF com soro fetal bovino; tratamento 2 (T2 - 439 oócitos) - meio SOF com soro fetal bovino associado ao CLA; tratamento 3 (T3- 500 oócitos) - meio SOF sem soro fetal bovino; e tratamento 4 (T4 - 496 oócitos) - meio SOF acrescido de CLA. Doze mórulas de cada tratamento foram fixadas no quinto dia de cultivo (D5) para análise da concentração de lipídios citoplasmáticos utilizando-se o corante *Nile Red*. No sétimo dia de cultivo (D7), blastocistos expandidos foram vitrificados utilizando-se a *Open Pulled Straw* (OPS) e o meio de cultivo congelado para análise da concentração de peróxidos (H_2O_2) liberados no meio, utilizando-se o kit QuantiChrom™ Peroxide Assay Kit (DIOX-250). Após 15 dias vitrificados, os embriões foram aquecidos e as taxas de reexpansão e eclosão foram analisadas. Não houve diferença estatística nas taxas de clivagem (46,0%; 51,2%; 49,8%; 51,9% para T1; T2; T3 e T4, respectivamente). Embriões cultivados na presença de soro fetal bovino apresentaram taxa de produção de blastocistos superior (T1=24,2% e T2=24,2%) em relação aos embriões cultivados em meio sem soro (T3=16,6% e T4=15,0%). As mórulas cultivadas na presença de soro (T1) apresentaram aumento significativo de gotas lipídicas em relação aos demais tratamentos ($P < 0,05$). As taxas de reexpansão e eclosão foram iguais para os quatro tratamentos após vitrificação. Não houve diferença na concentração de peróxidos (H_2O_2) liberados no meio de cultivo dos quatro tratamentos. Conclui-se que a presença de soro fetal bovino aumenta a taxa de produção de blastocistos, mas eleva a concentração de gotas lipídicas nos embriões. A adição de CLA no meio de cultivo diminui a concentração de lipídeos nos embriões, mas não aumenta a taxa de eclosão dos mesmos após vitrificação. A presença de CLA no meio não aumentou a concentração de H_2O_2 .

Palavras chave: ácido linoléico conjugado *trans-10 cis-12*, embriões bovinos produzidos *in vitro*, soro fetal bovino, vitrificação.

ABSTRACT

Cryopreservation of bovine embryos produced *in vitro* is a critical point for the improvement of biotechnical techniques, since it allows the commercial use of embryos. The greatest amount of lipids in the cytoplasm of embryonic cells implies a reduction in quality and freezability of embryos. The present experiment aimed to test the influence of the addition of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) and / or fetal calf serum to the culture medium on the concentration of intra-cytoplasmic lipids in bovine embryos produced *in vitro*. It was tested four different culture medium: treatment 1 (T1 - control, 443 oocytes) - SOF medium with fetal calf serum; treatment 2 (T2 - 439 oocytes) - SOF medium with fetal calf serum associated with CLA; treatment 3 (T3-500 oocytes) - SOF medium without fetal calf serum; and treatment 4 (T4 - 496 oocytes) - SOF medium supplemented with CLA. Twelve morulae of each treatment were fixed in the fifth day of culture (D5) for analyzing the concentration of cytoplasmic lipid using the dye Nile Red. On day seven of culture (D7), expanded blastocysts were vitrified using the Open Pulled Straw (OPS), and the culture medium was frozen for analyzing the concentration of peroxide (H_2O_2) released into the medium, using the kit QuantiChrom™ Peroxide Assay Kit (DIOX-250). After 15 days, vitrified embryos were warmed and re-expansion and hatching rates were analyzed. There was no statistical differences ($P>0.05$) in cleavage rates (46.0%, 51.2%, 49.8%, 51.9% for T1, T2, T3 and T4, respectively). Embryos cultured in the presence of fetal calf serum presented higher rates of blastocysts production (T1 = T2 = 24.2% and 24.2%, respectively) than embryos cultured in serum free medium (T3 and T4 = 16.6% = 15,0%). Embryos cultured in the presence of serum (T1) had higher ($P<0.05$) increase of lipid droplets in relation to other treatments. The re-expansion and hatching rates were similar among treatments after vitrification. There was no differences ($P>0.05$) in the concentration of peroxide (H_2O_2) in the medium among treatments. In conclusion, the presence of fetal calf serum increased the blastocyst yield, but increased the concentration of lipid droplets in the cytoplasm of embryos. The addition of CLA in the medium reduced the concentration of lipids in embryos, but did not increase the hatching rates after vitrification. The presence of CLA in the medium did not increase the concentration of H_2O_2 .

Keywords: bovine embryos produced *in vitro*, fetal calf serum, *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tem se firmado como uma biotécnica importante para o melhoramento genético bovino, pois possibilita rápida multiplicação e disseminação de genótipos desejáveis (Varago, 2005; Viana, 2009).

O Brasil apresenta posição de destaque no cenário mundial. Atualmente, o rebanho nacional é estimado em mais de 190 milhões de animais (IBGE, 2011), o que coloca o país como maior exportador mundial de carne bovina, e o classifica como um dos maiores produtores mundiais de leite. Em parte, isso foi possível graças ao uso da produção dos animais pelas técnicas *in vitro* (Batista, 2009). Dados da *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registraram valores de mais de 245.257 embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo no ano de 2007. O Brasil foi responsável por aproximadamente 195.811 (79,83%) do total das transferências de embriões produzidos *in vitro* (Thibier, 2008; Pereira, 2010).

A PIV evita o descarte precoce de fêmeas de alto valor genético que possuem infertilidade adquirida, tais como aquelas portadoras de obstrução e aderências tubárias e, portanto, inviáveis para programas de inseminação artificial (IA) e transferência de embrião (TE), além das fêmeas que não respondem mais à superovulação, animais doentes ou recém-mortos (Reichenbach, 2003).

No Brasil, a técnica tem sido amplamente utilizada com propósitos comerciais, respaldada pela valorização dos zebuínos no mercado nacional e internacional, além da característica favorável do Zebu em produzir grande número de oócitos para a PIV (Pereira e Marques, 2008).

Desta forma, a PIV de embriões bovinos ganha papel de destaque como técnica de reprodução assistida, justificando as inúmeras pesquisas realizadas em busca de meios e/ou sistemas de cultura que propiciem aumento na taxa de produção de embriões de qualidade e que resultem em maior taxa de gestação após transferência para receptoras.

O congelamento dos embriões obtidos por PIV é de fundamental importância para a melhora da eficiência do processo, além de oferecer maior flexibilidade à aplicação da biotécnica.

Vários estudos indicam que embriões produzidos *in vitro* não sobrevivem bem à criopreservação quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (Hasler et al. 1995; Fair et al. 2001; Martinez et al. 2006). Atualmente, os resultados da criopreservação de embriões zebuínos de PIV estão muito aquém do desejado. Faz-se necessário a busca e o aperfeiçoamento de técnicas de criopreservação que tragam resultados satisfatórios para a utilização comercial eficiente desta tecnologia, e que represente redução dos custos para os proprietários.

Segundo Pereira et al. (2007) a sensibilidade dos embriões produzidos *in vitro* à criopreservação está ligada à alta concentração de lipídeos no citoplasma dos blastômeros, originada, principalmente, pela presença de soro fetal bovino no meio de cultivo.

Uma estratégia para diminuir a taxa de gordura intracelular dos embriões seria a adição do ácido linoléico conjugado *trans-10 cis-12* (CLA) no meio de cultura. Foi demonstrado que o CLA influencia positivamente na aterosclerose, modula a resposta imune e tem capacidade de mudar a composição corporal reduzindo a gordura

corporal (Pereira et al., 2008). Assim, a adição deste isômero de CLA pode ser uma alternativa para evitar o excesso de deposição lipídica nos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Sugere-se que embriões zebuínos cultivados em meio contendo CLA poderiam gerar melhores resultados em relação às taxas de reexpansão e eclosão, quando vitrificados no sétimo dia de cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Desde o início do século XX, vários pesquisadores começaram a tentar cultivar embriões *in vitro* com o objetivo de estudar fenômenos fisiológicos. Muitas espécies foram testadas, e em 1950 foi registrado o nascimento do primeiro animal (coelho) gerado através da PIV. No entanto, apenas no final dos anos de 1970 é que foi relatada a maturação (MIV) e a fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos que resultou, no início dos anos 80, no nascimento do primeiro bezerro originado de PIV (Brackett et al., 1982). A partir deste marco, vários estudos foram voltados à PIV de bovinos, ovinos e caprinos e, no início dos anos de 1990, houve grande incremento mundial da PIV, devido ao aperfeiçoamento da técnica de aspiração folicular (OPU) de vacas vivas (Gonçalves et al., 2008).

Várias vantagens podem ser encontradas na utilização da PIV. Esta biotécnica reduz o intervalo de gerações e possibilita que os embriões sejam congelados para a criação de bancos de germoplasma (Andrabi e Maxwell, 2007). Também, embriões produzidos *in vitro* podem ser gerados para fins de pesquisas com células-tronco, que são importantes na biomedicina para fins

terapêuticos para doenças degenerativas (Galli e Lazzari, 2008; Pereira, 2010).

Se comparada com a produção *in vivo* de embriões, mediante indução de múltiplas ovulações e TE, a PIV por aspiração folicular de vacas vivas é capaz de produzir pelo menos três vezes mais embriões. Esta técnica permite ainda a associação com outras biotécnicas, em particular o diagnóstico pré-natal, como a sexagem de embriões, a bissecção, a transferência nuclear e a transgenia (Gonçalves et al., 2008).

Como limitações da produção *in vitro* de embriões, destacam-se o alto custo de montagem e manutenção do laboratório, necessidade de mão de obra especializada, variação das taxas de gestação, alto custo de sincronizar receptoras para transferência a fresco dos embriões produzidos em alta escala, além do tempo consumido para executar a rotina, que vai da punção folicular *in vivo* até o desenvolvimento *in vitro* dos embriões. Quando esses fatores são superados, surge como principal limitação a inexistência de protocolos eficazes de criopreservação para oócitos e, principalmente, para embriões de PIV que, muitas vezes, são descartados por não haver receptoras em número adequado no momento da transferência (Montagner, 1999).

2.2. Efeito da adição de soro fetal bovino em meios de cultura utilizados na PIV

O sistema *in vitro* tenta mimetizar o ambiente presente no animal vivo. No entanto, nem todos os componentes necessários para o crescimento dos embriões *in vitro* são conhecidos. Sendo assim, utiliza-se meios não definidos nos quais são adicionados soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica bovina (BSA).

Sabe-se que meios definidos na presença de *polyvinyl alcohol* (PVA) geram menores taxas de blastocistos em relação aos meios acrescidos de SFB e BSA (Holm et al., 1999).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam citoplasma mais escuro, desenvolvimento mais lento e elevada sensibilidade térmica em relação aos embriões produzidos *in vivo* (Leibo e Loskutoff, 1993). Estes fatores resultam na maior sensibilidade à criopreservação e em menor taxa de gestação.

O soro fetal bovino é comumente utilizado em meios de cultivo *in vitro*, pois contribui com fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, componentes antioxidantes e possibilita aumento das taxas de blastocistos em comparação com embriões cultivados no meio livre de soro (Bavister, 1995; Holm et al., 1999). Além dessas funções, o soro pode agir como quelante de metais pesados no meio de cultivo. No entanto, a adição do SFB ao meio leva ao aumento de gordura intracelular que dificulta o sucesso da criopreservação (Gomez et al., 2008). Foi demonstrado que o soro no meio de cultivo aumenta significativamente a quantidade de lipídeos no citoplasma dos embriões PIV, quando comparados com embriões cultivados na ausência de soro (Abe et al., 1999a,b; 2002). O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está completamente conhecido. Segundo Abd El Razeq et al. (2000), o aumento de lipídeos no embrião é dado principalmente pela síntese de triglicérides. Para Ferguson e Leese (1999) e Sata et al. (1999), isso ocorre devido à presença de lipoproteínas no soro que são internalizadas nas células, aumentando o conteúdo lipídico intracelular. Já para Abe e Hoshi (2003), a presença do soro no meio de cultivo altera o metabolismo mitocondrial dos lipídeos, conduzindo a maior armazenamento citoplasmático. A combinação desses três

mecanismos também não é descartada (Batista, 2009).

A ausência de soro fetal no meio de cultura diminui significativamente a quantidade de gotas lipídicas do citoplasma e, conseqüentemente, aumenta a resistência dos embriões de PIV ao congelamento, visto que a taxa de produção de blastocistos eclodidos, após vitrificação, é maior quando embriões são cultivados em meio contendo albumina sérica bovina (BSA) em substituição ao soro fetal bovino (Gomez et al., 2008).

Mesmo que o efeito do soro nos embriões PIV não seja totalmente conhecido, é sabido que ele pode inibir as clivagens iniciais e acelera o desenvolvimento de mórula até blastocisto (Lonergan et al., 1999). Diferentes lotes de soro fetal bovino variam na sua composição, o que pode comprometer os meios de cultivo *in vitro* (Van Langendonck et al., 1997). Além disso, embriões cultivados na presença de soro apresentam alterações ultraestruturais, blastulação anormal, expressão de RNA mensageiro aberrante, e síndrome de bezerro grande que leva à maior incidência de abortos e mortes após o nascimento (Abe et al., 2002). Ainda, existe o risco do lote de soro estar contaminado e, conseqüentemente, prejudicar o desenvolvimento embrionário. Por estes motivos, tem se tentado substituir o soro por outras proteínas, tais como a BSA ou outras proteínas sintéticas.

A atmosfera gasosa também é um ponto importante a ser observado quando se adiciona o soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultivo. Existem duas maneiras principais de se cultivar embriões bovinos *in vitro*: co-cultivo com células somáticas em atmosfera de 5% de CO₂, 90% de N₂ e 20% de O₂ ou cultivo com meios simples, como o *synthetic oviduct fluid médium* (SOF), em atmosfera controlada com 5% de

CO₂, 90% de N₂ e 5% de O₂. Os sistemas de cultivo *in vitro* tentam mimetizar a produção *in vivo* de embriões. É sabido que as tubas uterinas apresentam baixa tensão de oxigênio (aproximadamente 5%). As células somáticas presentes no sistema de co-cultivo celular possuem a capacidade de reduzir a concentração de O₂ da atmosfera gasosa, além de ser uma técnica efetiva e econômica (Bavister, 1995). No entanto, as células somáticas podem levar fatores contaminantes ao meio de cultivo. Atualmente, o co-cultivo dos embriões com células somáticas para o desenvolvimento embrionário precoce tem sido substituído pelos sistemas que utilizam atmosfera controlada com 5% de O₂ e meios simples, como o meio SOF. As principais vantagens deste sistema seriam: a praticidade durante a rotina laboratorial e a redução da ocorrência de contaminação na placa de cultivo, porém, eleva o custo do processo (Gonçalves et al. 2008).

Para evitar os problemas causados pela presença do soro nos meios de cultivo, a estratégia utilizada por muitos pesquisadores é a redução da concentração de SFB acompanhada do controle de O₂ atmosférico. O efeito da concentração de oxigênio atmosférico no desenvolvimento de embriões bovinos está bem definido, altas concentrações de oxigênio podem ser tóxicas para os embriões. Embora com alguns resultados conflitantes, existem evidências de que a redução na concentração atmosférica de O₂ para níveis abaixo de 10% esteja associada com um aumento na taxa de desenvolvimento embrionário e reflita os níveis fisiológicos *in vivo*. Entretanto, níveis inferiores a 1% determinam bloqueio do desenvolvimento, já que essas estruturas não são anaeróbicas (Gonçalves et al. 2008).

2.3. Fatores que influenciam a resistência à criopreservação de embriões PIV

A técnica de PIV envolve alguns passos no campo e no laboratório. A punção dos oócitos imaturos pode ser feita a campo (OPU) em vacas vivas através de um ultrassom transvaginal, ou em laboratório utilizando-se ovários provenientes de abatedouro ou de animais recém-mortos. Em projetos de pesquisa, é muito comum a utilização de ovários de abatedouro devido ao grande número de ovários disponíveis por dia e ao baixo custo envolvido no processo. No laboratório, os folículos puncionados são classificados com auxílio de microscópio estereoscópico em aumento de 30x, de acordo com Leibfried e First (1979), e logo colocados em meio de maturação (MIV). No dia seguinte, esses oócitos são transferidos para placa de fecundação *in vitro* (FIV) e, então, inseminados com espermatozoides previamente selecionados. Os presumíveis zigotos são cultivados (CIV) por no mínimo sete dias. Após este período, os embriões de boa qualidade são transferidos para as receptoras. Quando não há receptoras suficientes, e como o sistema de criopreservação ainda não apresenta resultados satisfatórios, esses embriões são descartados. Para tornar o processo de PIV mais eficiente, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem melhorar as taxas de sobrevivência embrionária após a criopreservação.

Diferentemente do que acontece com embriões produzidos *in vivo*, que rendem 50 a 60% de prenhes, os embriões PIV criopreservados são mais sensíveis, principalmente aos métodos que apresentam redução gradual da temperatura (0,5°C/minuto°C) (Gonçalves et al., 2008).

Vários estudos sustentam a hipótese que a alta sensibilidade à criopreservação dos

embriões bovinos está relacionada principalmente à grande quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos (Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2003; Batista, 2009). Para Abe et al. (2003) e Rizos et al. (2003), o acúmulo anormal de lipídeos nos embriões de PIV está relacionado especialmente às condições de cultivo *in vitro*, notoriamente devido à inclusão de soro fetal bovino. Segundo McEvoy et al. (2000), embriões PIV contêm mais triglicérides e menos lipídeos das outras classes. Essa diferença, aliada as baixas concentrações dos ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidos da membrana dos oócitos e embriões, pode ser responsável pela baixa tolerância à criopreservação dos produtos oriundos desta técnica (Wilmot, 1972; Polge et al., 1974; Nagashima et al., 1992).

Para melhorar o aproveitamento dos embriões PIV é necessário protocolo de cultivo eficaz, que gere menos lipídeos intracelulares e, conseqüentemente, melhore a resistência dos embriões ao congelamento (Pereira e Marques, 2008). Sabe-se que a maior parte dos embriões PIV é transferida a fresco. Isto devido às baixas taxas de sobrevivência após o descongelamento (Viana e Camargo, 2007).

Segundo Mahmoudzadeh et al. (1994), a criopreservação leva ao endurecimento da zona pelúcida. No entanto, o principal problema no congelamento de qualquer célula é a formação de cristais de gelo intracelulares. Durante o congelamento, a estratégia é alcançar equilíbrio em remover quantidade de água suficiente para que ocorra mínima formação de gelo intracelular e evitar aumento excessivo da osmolaridade intracelular, chamado de efeito solução. Como estratégia, para melhorar os resultados da congelação, são utilizados os agentes crioprotetores (Rowe, 1966). Os protocolos de congelamento utilizam crioprotetores permeáveis à

membrana celular (intracelulares) tais como: glicerol, DMSO, propanediol, etileno glicol, juntamente com crioprotetores não permeáveis à membrana celular (extracelulares): sacarose, glicose, trealose (Palasz e Mapletoft, 1996).

Os crioprotetores permeáveis atuam diminuindo o ponto de congelamento da água e prevenindo a exposição das células à alta concentração de soluto (eletrólitos) ligando-se a esses eletrólitos (Rowe, 1966; Miyamoto et al., 1986; Leibo, 1989). Crioprotetores impermeáveis à célula iniciam a saída de água das células por desidratação osmótica. O fator mais importante no resfriamento lento é a passagem de água através da membrana celular (Seidel, 1996). Esta passagem é dependente das características da membrana, tamanho e volume celular. Caso essa passagem não ocorra de forma adequada, ocorrerá formação de cristais de gelo intracelulares, responsáveis pelo rompimento das membranas celulares. Este fato leva à baixa sobrevivência dos embriões após o descongelamento (Mazur, 1970; Seidel, 1996). As técnicas de criopreservação vêm sendo aprimoradas há muitos anos, principalmente após o relato do nascimento do primeiro bezerro nascido a partir da transferência de um embrião congelado (Wilmot e Rowson, 1973).

A qualidade e o estágio de desenvolvimento do embrião PIV também interferem no sucesso do congelamento. Vajta et al. (1996) observaram que blastocistos iniciais bovinos, quando vitrificados, resultaram em taxas de eclosão inferiores (34%) aos blastocistos e blastocistos expandidos (63%), e ainda, os blastocistos expandidos que atingiram esse estágio no sétimo dia de cultivo resultaram em maiores taxas de eclosão, após criopreservação, se comparados com blastocistos que chegaram a este estágio no oitavo dia de cultivo.

2.4. Vitrificação

A criopreservação de embriões permite o aproveitamento de receptoras com estro natural, reduzindo os custos com a sincronização de estros, além de permitir o transporte de embriões congelados e a programação de nascimentos adequada ao manejo de cada fazenda. Oferece, ainda, condições de armazenamento dos embriões durante o período de teste de progênie e viabiliza a criação de bancos de embriões originados de animais geneticamente superiores (Pereira et al., 2008). Estes bancos permitem a troca internacional de embriões, evitando o transporte de animais e os riscos sanitários envolvidos no processo (Pereira e Marques, 2008).

Embriões produzidos *in vitro* possuem maior sensibilidade ao resfriamento lento. Além disso, são mais sensíveis aos efeitos tóxicos e osmóticos dos crioprotetores, bem como aos cristais de gelo, quando comparados aos embriões obtidos *in vivo* (Vajta e Nagy, 2006).

Atualmente, dois procedimentos de criopreservação são utilizados: lento ou convencional e ultra-rápido. No lento, a velocidade de congelamento é de 0.3°C a 1°C por minuto antes da indução da cristalização da solução crioprotetora (*seeding*) na temperatura de -7°C, seguido de queda de temperatura até -79°C, na qual os embriões são diretamente imersos em N₂. Este é um método de criopreservação demorado, que requer uma máquina de congelamento para ser executado e que apresenta resultados insatisfatórios para embriões PIV. No entanto, a vantagem deste procedimento é que é possível obter repetibilidade no processo independentemente do técnico que está executando o procedimento (Gonçalves et al. 2008).

No procedimento ultra-rápido ou vitrificação é possível obter boas taxas de sobrevivência de embriões PIV e não é necessária a obtenção de equipamentos caros, como a máquina de congelamento. No entanto, os resultados variam entre os diferentes laboratórios e dependem de pessoal treinado para execução do procedimento. Por causar menos efeitos deletérios e gerar melhores resultados após o aquecimento, tem sido indicada na preservação de embriões mais sensíveis, como os de bovinos (Pereira e Marques, 2008).

O congelamento dos embriões PIV é de fundamental importância para a melhora da eficiência do processo, sendo a vitrificação o método mais eficaz e que apresenta melhores resultados (Carnevale et al., 2009). Nessa metodologia, o meio se solidifica em estado amorfo (vítreo), conservando as propriedades mecânicas do líquido. Embora o método tenha ganhado notoriedade a partir de 1985, a teoria da vitrificação data de 1898, sendo seu precursor o físico alemão Tammann. No entanto, somente a partir da sobrevivência de embriões de camundongos, a vitrificação passou a ser empregada de forma crescente na preservação de embriões e oócitos de diferentes espécies (Rall e Fahy, 1985).

Neste método, os embriões são expostos a altas concentrações de crioprotetores que em temperatura muito baixa, ficam em estado amorfo sem ocorrer formação de cristais de gelo. Além disso, o procedimento é extremamente simples e rápido, não sendo necessária a aquisição de aparelhos de congelação, o que se traduz na redução significativa dos custos e do tempo empregado no processo (Carnevale et al., 2009). Para se obter bons resultados na vitrificação e evitar os efeitos tóxicos das soluções, faz-se necessário reduzir o tempo de exposição dos embriões aos crioprotetores.

Devido à alta velocidade de congelação e a ausência da formação de cristais de gelo intra e extracelulares, a vitrificação foi sugerida como o método de criopreservação mais promissor para embriões bovinos de PIV (Vajta e Nagy, 2006).

No entanto, mesmo com um método de congelação mais eficaz, os embriões zebuínos de PIV ainda não apresentam resultados favoráveis para a comercialização após descongelação. Esta susceptibilidade à congelação parece estar relacionada com as condições de cultivo *in vitro*, notadamente a inclusão de soro fetal bovino nos meios de cultura, que leva ao acúmulo de lipídeos no citoplasma dos embriões. Em bovinos, a grande quantidade de lipídeos no citoplasma do embrião produzido *in vitro* apresenta influência negativa na sua resposta à congelação (Pereira e Marques, 2008).

2.5. Ácido Linoléico Conjugado (isômero *trans-10, cis-12*)

Como alternativa para tentar diminuir a alta concentração de lipídeos nos embriões PIV provinda principalmente da adição do SFB no meio de cultivo, alguns autores tentam adicionar o ácido linoléico conjugado, (isômero *trans-10, cis-12*) (CLA) no meio de cultivo. O CLA possui a capacidade de inibir a síntese lipídica nos embriões e aumentar, em até duas vezes, a viabilidade dos embriões de PIV após a descongelação (Pereira e Marques, 2008).

O CLA foi primeiramente identificado por Ha et al. em 1987. A partir desta época vários estudos foram conduzidos focados na potencial atividade anticarcinogênica *in vivo* e *in vitro*. Após algum tempo, outras propriedades do CLA foram definidas em vários experimentos com animais.

Baumgard et al. (2002) demonstraram que a infusão do isômero *trans-10, cis-12* no abomaso de vacas lactantes reduziu a abundância dos transcritos acetil-CoA e de ácido graxo sintase, envolvidos na lipogênese, e levando à redução de 42% na gordura do leite e 82% na capacidade lipogênica desse tecido, quando comparado com o grupo controle.

Pereira et al. (2007) demonstraram que a adição do isômero de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo não afeta as taxas de clivagem e de blastocistos. Também, aumenta significativamente as taxas de reexpansão após o descongelamento, quando comparado com embriões cultivados em meio na presença de soro e sem o isômero de CLA.

Através da análise da intensidade de fluorescência dos embriões utilizando-se o corante *Nile Red*, Batista (2009) demonstrou que embriões cultivados na presença de CLA apresentavam concentração de lipídeos superiores em relação aos embriões cultivados em meio sem este isômero. No entanto, o resultado da sobrevivência após criopreservação foi igual em ambos os tratamentos.

Mesmo sem o completo entendimento do comportamento do CLA no metabolismo celular, Pereira et al. (2008) demonstraram, pela primeira vez, o cultivo de embriões bovinos de PIV em meio contendo soro fetal bovino, e que este isômero leva à redução de gotas lipídicas no citoplasma dos blastômeros, sem afetar a taxa de clivagem e de blastocistos, além de aumentar a taxa de sobrevivência após a vitrificação.

Estudos realizados recentemente demonstraram, pela primeira vez, que a adição de CLA no meio de maturação não interfere na taxa de oócitos maturados e

clivados e aumenta a qualidade morfológica dos blastocistos formados (Lapa et al., 2011).

O completo entendimento da ação do CLA ainda não é possível e alguns autores sugerem possíveis mecanismos. Segundo Baumgard et al. (2002), o CLA pode reduzir o acúmulo de lipídeos por meio da redução dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) das enzimas lipogênicas. Park et al. (2000) também acreditam na redução da atividade da lipoproteína lipase e da abundância do RNAm da esteroil coenzima A dessaturase após a adição de CLA no meio de cultivo (Lee et al., 1998; Batista, 2009).

Sugere-se que o CLA pode afetar diferentes caminhos metabólicos, sendo que isômeros individuais de CLA podem agir diferentemente. Uma importante modulação do metabolismo lipídico pode ser um dos impactos provocados por este isômero. Uma hipótese sugere influência do CLA no metabolismo do ácido araquidônico, provavelmente competindo com o ácido linoleico (Pereira et al., 2008).

Além de diminuir a quantidade de lipídeos no citoplasma dos embriões PIV, este isômero de CLA pode trazer efeitos positivos na capacidade de sobrevivência ao congelamento, já que aumenta a fluidez da membrana (níveis insaturados) devido à incorporação direta do CLA. Este isômero de CLA é responsável por induzir modificações na composição de ácidos graxos de tecidos, reduzindo o conteúdo de triacilglicerol, ou interferindo nos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados (Park et al., 1999; Alasnier et al., 2002; Park et al. 2004).

Segundo Horton et al. (2002), o isômero de CLA *trans-10, cis-12*, tem efeito no metabolismo energético, levando a

alterações na quantidade de lipídeos intracelulares, através da modulação na expressão gênica e na atividade enzimática sob o comando da família de fatores de transcrição chamada SREBPs (*sterol regulatory element-binding proteins*) e genes relacionados ao transporte de glicose para o interior da célula.

Resultados encontrados por Batista (2009) sugerem que os mecanismos pelos quais o isômero *trans-10, cis-12* inibe a síntese de lipídios seriam através da redução na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas no consumo de ácidos graxos circulantes, além do transporte dos mesmos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fecundação *in vitro* do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, durante o período de maio a dezembro de 2011. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 291/2010).

Objetivou-se avaliar as taxas de reexpansão e de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios de cultivo contendo ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA), associado ou não ao soro fetal bovino (SFB) e posteriormente vitrificados.

Todos os reagentes utilizados neste experimento foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a não ser que esteja especificado.

Foram utilizados 1932 oócitos, divididos em quatro tratamentos contendo o *synthetic oviduct fluid medium* (SOF) (Holm et al., 1999) como meio base (tabela 1):

Tabela 1: Grupos experimentais

| Tratamento | 2% soro fetal bovino (SFB) | 100µM de CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 | n total |
|-------------------------|----------------------------|--|---------|
| 1- Grupo com soro | + | - | 443 |
| 2- Grupo com soro + CLA | + | + | 493 |
| 3- Grupo sem soro | - | - | 500 |
| 4- Grupo sem soro + CLA | - | + | 496 |

Os oócitos foram obtidos de ovários provenientes de vacas mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* coletados em abatedouro e fecundados com sêmen de touro da raça Guzerá, de uma mesma partida e previamente avaliado quanto a fertilidade em sistema de produção *in vitro*.

Após a maturação e fecundação *in vitro*, os possíveis zigotos foram divididos nos quatro tratamentos (grupo com soro; grupo com soro + CLA; grupo sem soro; grupo sem soro + CLA). No segundo dia de cultivo (D2) foi verificada a taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados em relação ao total dos possíveis zigotos colocados no cultivo). No quinto dia de cultivo (D5) algumas mórulas (n = 12), provenientes dos quatro grupos experimentais, foram fixadas para posterior quantificação do conteúdo lipídico, por meio do corante *Nile Red*, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2. No sétimo dia de cultivo (D7), blastocistos de graus I e II (n = 36 para Grupo soro); (n = 41 para Grupo soro + CLA); (n = 34 para Grupo sem soro) e (n = 35 para Grupo sem soro + CLA) foram vitrificados e estocados em nitrogênio líquido (-196°C) por duas semanas, visando as avaliações das taxas de reexpansão e eclosão após o

descongelamento (item 3.3). Ainda no D7, o meio de cultivo dos quatro tratamentos foi retirado e congelado para posterior análise da concentração de peróxidos (H₂O₂) (item 3.4).

3.1. Produção *in vitro* de embriões

3.1.1 Coleta dos ovários

Os ovários foram coletados em abatedouro local e transportados para o laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida à 30°C, no período máximo de quatro horas após o abate. No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica, e folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com auxílio de agulha (40x12) acoplada a seringa de 10 ml. Os complexos *cumulus-oophorus* (CCOs), foram rastreados e classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus* (tabela 2) com auxílio de microscópio estereoscópico, de acordo com Viana et al. (2004). Os CCOs de graus I e II (n= 1932) foram selecionados para maturação *in vitro* e, em seguida, lavados duas vezes em meio TALP-Hepes (Gibco, E.U.A.), uma vez em TCM-199 (Gibco,

E.U.A.) e, posteriormente, colocados em meio de maturação.

Tabela 2: Classificação da qualidade dos complexos *cummulus-oophorus* (CCOs) aspirados de ovários de bovinos, segundo metodologia proposta por Viana et al. (2004).

| |
|--|
| Grau I: Complexo <i>cummulus-oophorus</i> compacto, mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo. |
| Grau II: Complexo <i>cummulus-oophorus</i> compacto com número de camadas de células do <i>cummulus</i> igual ou menor a três, e citoplasma levemente heterogêneo. |
| Parcialmente desnudo: oócitos apresentando completa remoção das células do <i>cummulus-oophorus</i> em até 1/3 da superfície da zona pelúcida. |
| Desnudo e/ou degenerado: oócitos sem células do <i>cummulus-oophorus</i> cobrindo a maior parte da zona pelúcida e/ou vacuolização do citoplasma. |
| <i>Cummulus-oophorus</i> expandido: Complexo <i>cummulus-oophorus</i> apresentando expansão das células do <i>cummulus</i> . |

3.1.2 Maturação *in vitro* dos complexos *cummulus-oophorus* (CCOs)

A maturação *in vitro* (MIV) dos CCOs foi realizada em meio TCM 199 (Gibco, E.U.A.) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 0,5 µg/mL de FSH, 5µg/ml de LH, 22µg/ml de piruvato e 50µg/ml de gentamicina. Os oócitos foram maturados por 24 horas em gotas de 100µl de meio de maturação cobertas sob óleo mineral em placas de petri de 60x16mm (TPP, Suíça), em estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

3.1.3 Fecundação *in vitro* dos oócitos

Após 24 horas de maturação, os CCOs foram inseminados, utilizando mesma partida de sêmen da raça Guzerá previamente testado para PIV. Os espermatozoides foram preparados

utilizando-se o método do gradiente descontínuo de Percoll (SIGMA, P-1644). A fecundação (considerada como dia 0, D0) foi realizada em gota de 100µL de meio Talp (Parrish et al., 1995) suplementado com gentamicina (50µg/ml), penicilamina (2,7µg/ml), hipotaurina (1µg/ml), epinefrina (0,3µg/ml), albumina sérica bovina (5µg/ml), piruvato (22µg/ml) e heparina (10µg/ml). Foram utilizados dois milhões de espermatozoides/ml. As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas nas mesmas condições da MIV por um período de aproximadamente 18 a 20 horas.

3.1.4 Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a FIV, os presumíveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para a retirada das células dos *cummulus* e, posteriormente, divididos (n = 1932) aleatoriamente para o cultivo *in vitro* (CIV) em duas gotas de cada tratamento como descrito anteriormente na tabela 2.

Os embriões foram cultivados *in vitro* (CIV) por sete dias, em gotas de 100µl cobertas por óleo mineral, em ambiente de incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 95% de umidade. Após 48 horas (D2) do início do cultivo, a taxa de clivagem foi avaliada. No D7 foi observada a taxa de produção de blastocistos em relação aos embriões clivados.

3.2. Análises do conteúdo lipídico no citoplasma das células embrionárias

3.2.1 Coloração das amostras

No D5, foi escolhida, aleatoriamente, uma das gotas de cada tratamento para retirada das mórulas (12 mórulas totais por grupo experimental) livres das células do *cummulus* para serem fixadas em solução de 500 µl de 2% glutaraldeído e 2% formaldeído. As amostras foram estocadas em geladeira por 30 dias. Após esse período, as mórulas foram lavadas cinco vezes em meio *Dulbecco* (DPBS) com 1mg/ml de polivinilpirrolidona (PVA) e, posteriormente, transferidas para tubos plásticos de 1,5 ml (uma mórula/frasco plástico) contendo 30 µL de solução corante de *Nile Red* - 10 µg/ml (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, E.U.A.) dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl) e 1mg/ml de PVA. Toda manipulação e coloração das amostras foram realizadas no escuro à temperatura ambiente. As mórulas ficaram na solução de *Nile Red* por 24 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram recuperadas, lavadas em DPBS por duas vezes e cada mórula foi colocada em lâmina de 25x55mm contendo 10 µl de ProLong® Gold Antifade Invitrogen (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, E.U.A.). Cada lâmina foi preparada com uma única mórula. A gota de Prolong® foi cuidadosamente coberta com lamínula e selada com esmalte de unha incolor (Batista, 2009).

3.2.2 Quantificação da fluorescência

As gotículas lipídicas foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido (Excitação: 400-500nm e Emissão: 515LP) utilizando-se objetiva de 10X. A quantidade de luz fluorescente emitida por toda amostra (mórula) foi avaliada em comprimento de onda de 582 ± 6 nm. A fluorescência foi quantificada utilizando o Software QUANTPORO (Universidade Federal de Viçosa). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (Batista, 2009).

3.3. Vitrificação e sobrevivência dos embriões após aquecimento

Os blastocistos de sete dias, de acordo com o respectivo tratamento e classificados como de graus I e II, segundo a *International Embryo Transfer Society* (IETS) (Robertson e Nelson, 1999), foram lavados em solução de DPBS acrescida de 5% SFB (Holding Medium – HM) e, então, desidratados por um minuto em solução a 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO em HM (Vajta et al., 1996). Posteriormente, os embriões foram desidratados novamente em 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO por 20 segundos, e envasados em *Open Pull Straw* (OPS) segundo Vajta et al. (1996).

Os embriões vitrificados foram separados nas OPS segundo o estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial – Bi, blastocisto – B1, blastocisto expandido – Bx e blastocisto eclodido – Be) e tratamento (máximo de dois embriões por OPS), para posterior observação individual do desenvolvimento embrionário após aquecimento.

Os embriões ficaram estocados em nitrogênio líquido, de duas a oito semanas. Após este período, os embriões foram

aquecidos por meio da passagem em solução de sacarose (0,3M) em HM por cinco minutos e, posteriormente, por mais cinco minutos em solução 0,15M de sacarose em HM (Vajta et al., 1996). Após esta etapa, os embriões foram lavados em meio SOF contendo soro fetal bovino (meio controle) e colocados em cultivo em gotas individuais por 72 horas na estufa incubadora à 38,5°C, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 95% de umidade. As taxas de re-expansão e eclosão foram avaliadas 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo.

3.4. Avaliação da concentração de peróxidos (H₂O₂) no meio de cultivo dos tratamentos

No sétimo dia de cultivo, após a retirada dos embriões, o meio de cultura dos quatro tratamentos foi congelado (40µl de cada tratamento) para posterior quantificação de peróxidos (H₂O₂). Os meios ficaram congelados à -20°C por 60 dias. Foram utilizadas cinco amostras de cada grupo experimental e estas foram descongeladas imediatamente antes das análises utilizando-se o leitor de ELISA, segundo orientação do protocolo do kit utilizado (QuantiChrom™ Peroxide Assay Kit (DIOX-250), para quantificar peroxidase (Giao et al., 2007; Yu et al. 2008; Deshimane et al., 2009).

A descrição das atividades laboratoriais, após a fecundação dos oócitos, seguiu o cronograma de atividades esquematizado na figura 1.

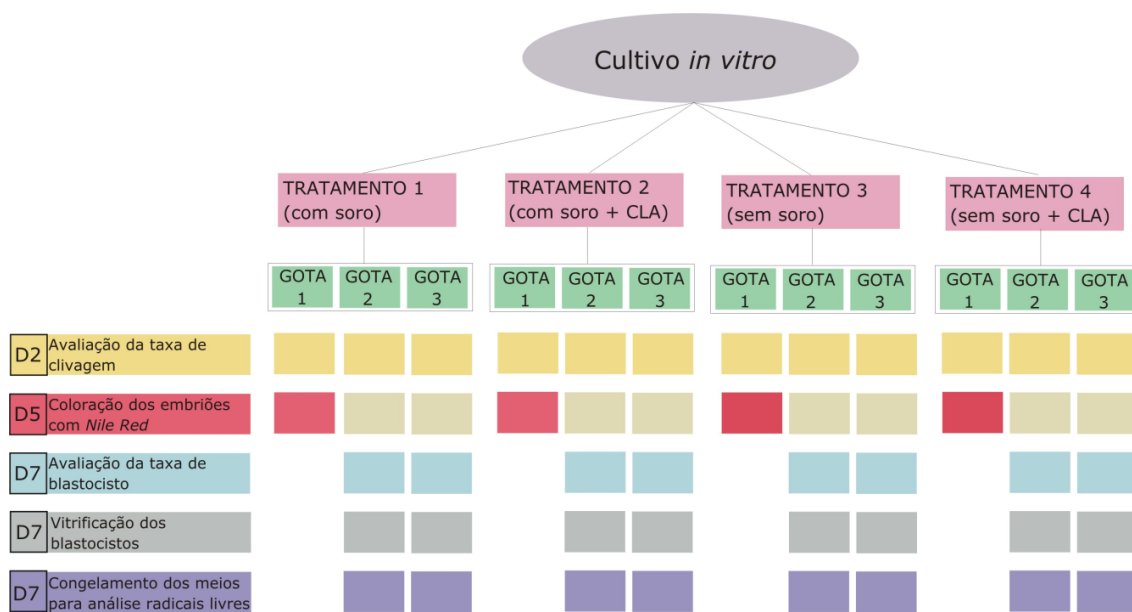


Figura 1: Cronograma das atividades laboratoriais após colocação dos embriões bovinos no meio de cultivo *in vitro*.

3.5. Análises Estatísticas

Os resultados de taxas de clivagem e de produção de blastocistos, assim como a viabilidade embrionária (taxas de reexpansão e eclosão) foram considerados como unidades de observação. Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Cochran e Bertlett para verificação da normalidade e homogeneidade respectivamente, antes de serem submetidos à análise por meio da tabela de contingência, e as possíveis diferenças comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2), utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analyses System, 1999). O nível de significância foi de 5%. A taxa de eclosão, por período de tempo de cada tratamento, foi analisada pelo teste de Mc Nemar.

Os resultados da análise lipídica, em relação à intensidade de fluorescência emitida por cada mórula, foram examinados para normalidade e independência dos erros, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk do PROC UNVARIATE. Diferenças entre as médias de intensidade de fluorescência

das mórulas, dos quatro tratamentos, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon do PROC, com nível de significância de 5% (SAS version 9.1.3, Institute Inc., Cary, NC, USA).

A concentração de radicais livres no meio de cultura, segundo o grupo experimental utilizado, foi submetida aos testes de Lilliefors e Bartlett para verificação da normalidade e homogeneidade respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância a 5% de significância.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Taxas de clivagem e de produção de blastocistos

As taxas de clivagem (D2) e de produção *in vitro* de blastocistos (D7) bovinos, de acordo com o respectivo grupo experimental, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Taxas de clivagem de oócitos e de produção *in vitro* de blastocistos bovinos em relação aos embriões clivados segundo os diferentes grupos experimentais

| Tratamento | Número de oócitos inseminados | Taxa de clivagem | Taxa de blastocistos |
|-------------------------|-------------------------------|------------------|----------------------|
| | | n; (%) | n; (%) |
| 1- Grupo com soro | 443 | 191; (46,0) a | 43; (24,2) a |
| 2- Grupo com soro + CLA | 439 | 204; (51,2) a | 46; (24,2) a |
| 3- Grupo sem soro | 500 | 249; (49,8) a | 37; (16,6) b |
| 4- Grupo sem soro + CLA | 496 | 248; (51,9) a | 36; (15,0) b |

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste Tukey (P<0,05).

Como verificado na tabela 3, o cultivo dos embriões na presença ou ausência de soro fetal bovino (SFB) e/ou ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA), ou sua associação, não interferiu na taxa de clivagem. No entanto, a presença de SFB aumentou significativamente ($P < 0,05$) a taxa de produção de blastocistos no sétimo dia de cultivo (D7), quando comparado com os grupos experimentais sem SFB, independente da presença ou ausência de CLA.

Goméz et al. (2008) e George et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes, cujos embriões cultivados na presença de SFB não tiveram taxa de clivagem comprometida em relação aos embriões cultivados na ausência de SFB, porém, a taxa de produção de blastocistos foi significativamente superior ($P < 0,05$) no grupo experimental que possuía soro fetal bovino incluído no meio de cultivo *in vitro*.

Alguns autores demonstram que a ausência do SFB no meio de cultivo melhora a qualidade embrionária, por reduzir a quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma celular, apesar de, muitas vezes, comprometer o número de blastocistos produzidos em cada rotina de produção *in vitro* de embriões (Abe e Hoshi, 2003; Goméz et al., 2008). Para laboratórios de produção comercial de embriões bovinos, a melhoria nos resultados da produção *in vitro* está vinculada com a taxa de produção de blastocistos por rotina, pois, somente embriões neste estágio de desenvolvimento são transferidos para receptoras, e os demais embriões clivados são, normalmente, descartados.

Pelos resultados apresentados na tabela 3, é possível confirmar a importância da presença do SFB no meio de cultivo visando a obtenção de boas taxas de produção de blastocistos. Apesar da variação de lotes e de possíveis fatores

contaminantes que podem estar presentes no SFB, este componente ainda é muito importante para o desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* (Bavister, 1995; Leivas et al., 2011).

A presença do isômero de ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultivo não interferiu nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos, no presente estudo. Da mesma forma, Batista (2009) também verificou que a adição de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo não afetou as taxas de clivagem ($P = 0,06$) e de produção de blastocistos ($P = 0,20$). Lapa et al. (2011) também não verificaram diferenças nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos em meios de cultivo contendo CLA.

Rizos et al. (2003), verificaram que a expressão do gene regulador de apoptose (BAX) não foi afetada em blastocistos produzidos na presença de CLA *trans-10, cis-12*, em comparação com o grupo controle, indicando que estes embriões são de mesma qualidade.

Resultados semelhantes em relação à taxa de produção de blastocistos (22%), em meios de cultivo contendo soro fetal bovino, foram relatados por Pereira et al. (2008). No entanto, resultados superiores (46%) foram verificados por Vajta et al. (1997a). Ao contrário, resultados inferiores quanto à taxa de clivagem (44%) e de produção de blastocistos (16%) foram encontrados por Dinnyés et al. (1999) utilizando-se o mesmo meio SFB.

Vários fatores podem interferir nas taxas de clivagem e, principalmente, de produção de blastocistos durante as rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV). Esta variação de resultados pode estar atribuída a: a origem dos oócitos, a fonte de água utilizada para confecção dos meios, a

qualidade dos reagentes, o controle de temperatura da incubadora, a atmosfera de gás, a umidade e temperatura do ambiente do laboratório, a habilidade técnica, a qualidade do material descartável, a esterilização adequada da vidraria, dentre outros (Bavister, 1995; Cohen et al., 1997). O presente experimento foi realizado em laboratório recentemente montado para a produção *in vitro* de embriões bovinos, o que pode justificar índices mais baixos de produção de blastocistos. Por isso, é importante a continuidade das rotinas de produção embrionária para que outros estudos possam ser beneficiados deste ambiente.

Além da montagem recente do laboratório, a origem dos ovários também pode comprometer os resultados de produção embrionária. Para o presente estudo, foram utilizados ovários provenientes de vacas abatidas em abatedouro, que, muitas vezes, são animais sem controle de idade, fertilidade, raça e nutrição. Em experimentos com vacas jovens e férteis, Leivas et al. (2011) obtiveram boas taxas de clivagem (73%) e de produção de blastocistos (41%). Mesmo com a recém montagem do laboratório de PIV, foi possível obter blastocistos de boa qualidade para serem submetidos à vitrificação. Outros pontos que podem ser ajustados visando a melhoria da taxa de produção *in vitro* de embriões, no mesmo laboratório em que o presente estudo foi realizado,

pode-se relacionar filtro de ar no laboratório, punção dos ovários de abatedouro em local mais afastado da sala de cultivo, evitar utilizar a estufa incubadora para realização simultânea de diferentes ensaios, seleção mais criteriosa dos oócitos, retirada de equipamento de ar condicionado para outra sala que não seja a de cultivo e restrição do acesso de pessoas ao laboratório. Apesar destas mudanças sugeridas ao laboratório, todo o presente estudo foi realizado de forma cautelosa e, por isso, foi possível obter bons embriões para vitrificação, sem ter sido verificada qualquer tipo de contaminação dos meios de cultivo durante o período de execução do experimento.

4.2. Avaliação do conteúdo lipídico intracitoplasmático dos embriões bovinos produzidos *in vitro*

O conteúdo lipídico intracitoplasmático nos blastômeros embrionários, segundo coloração pelo *Nile Red*, para os diferentes grupos experimentais contendo soro fetal bovino e/ou isômero de CLA *trans-10, cis-12*, está demonstrado nas figuras 2 e 3. Este corante é solúvel e fortemente fluorescente em lipídeos e inicialmente foi testado para corar macrófagos (Greenspan e Fowler, 1985). A quantidade de luz fluorescente emitida corresponde ao conteúdo lipídico (Leroy et al., 2005).

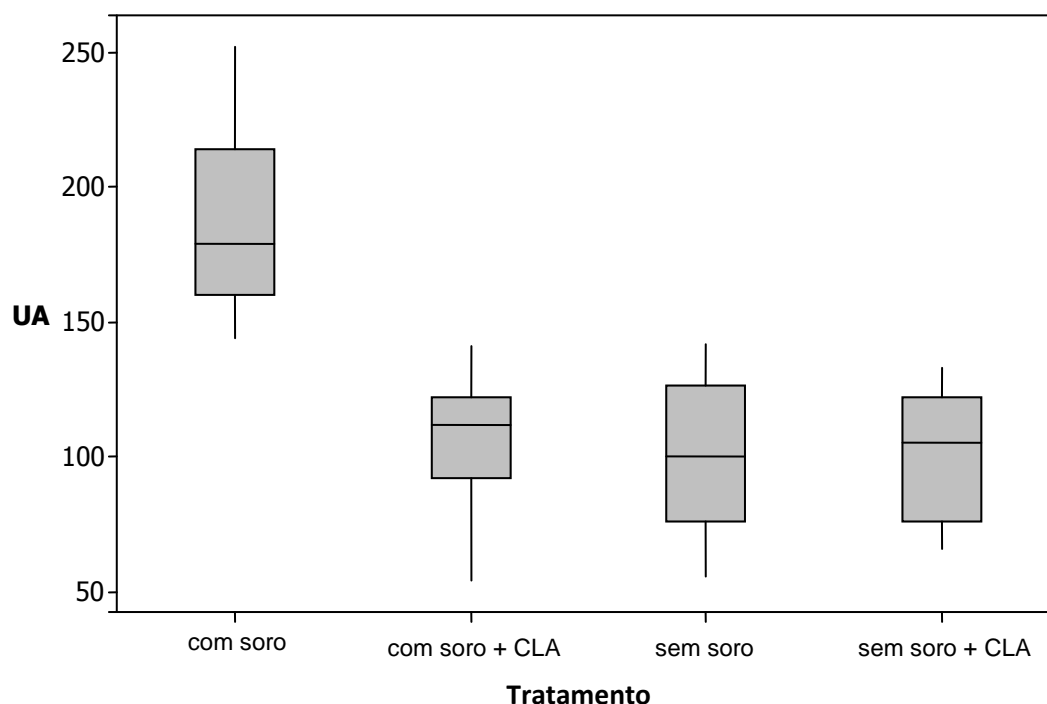


Figura 2: Intensidade média de fluorescência (média \pm desvio padrão) em unidades arbitrárias, das mórulas (D5) produzidas nos diferentes grupos experimentais e coradas pelo *Nile Red*.

Na figura 2 é possível verificar a intensidade média de fluorescência, em unidades arbitrárias, das mórulas (D5) cultivadas em meio SOF (1- Grupo com soro), em meio SOF suplementado com 100 μ M de CLA *trans-10, cis-12* (2- Grupo com soro + CLA), em meio sem SFB (3- Grupo sem soro) e em meio sem SFB e com adição de 100 μ M de CLA *trans-10, cis-12* (4- Grupo sem soro + CLA), após coloração com *Nile Red*. A média da intensidade de fluorescência foi de 188,05; 110,31; 101,95 e 100,27 para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o Grupo com soro e os demais grupos experimentais, indicando quantidade superior de lipídeos no grupo contendo soro, sem a presença de CLA. Resultados

semelhantes foram encontrados por Batista et al. (2009), no qual embriões cultivados em meio acrescido de soro fetal bovino e CLA *trans-10, cis-12* apresentaram redução significativa na quantidade de lipídeos em relação ao controle (grupo contendo SFB e sem CLA).

Segundo Pereira et al. (2006), a presença de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo embrionário leva à redução da síntese de lipídeos, através da redução na expressão de enzimas que participam da síntese dos mesmos, como o acilglicerol 3-fosfato aciltransferase responsável por catalisar a síntese de triglicérides.

A marcação de lipídeos pelo *Nile Red* é uma técnica que permite a quantificação dos lipídeos presentes em oócitos e

embriões (Greenspan e Fowler, 1985; Genicot et al., 2005). Trabalhos realizados com oócitos suínos (Romek et al., 2010), utilizando metodologia semelhante, demonstraram que a fluorescência esteve restrita as gotas lipídicas intracelulares, que são constituídas principalmente por

colesterol, triglicerídeos (em maior concentração) e fosfolipídios (Grázia, 2010).

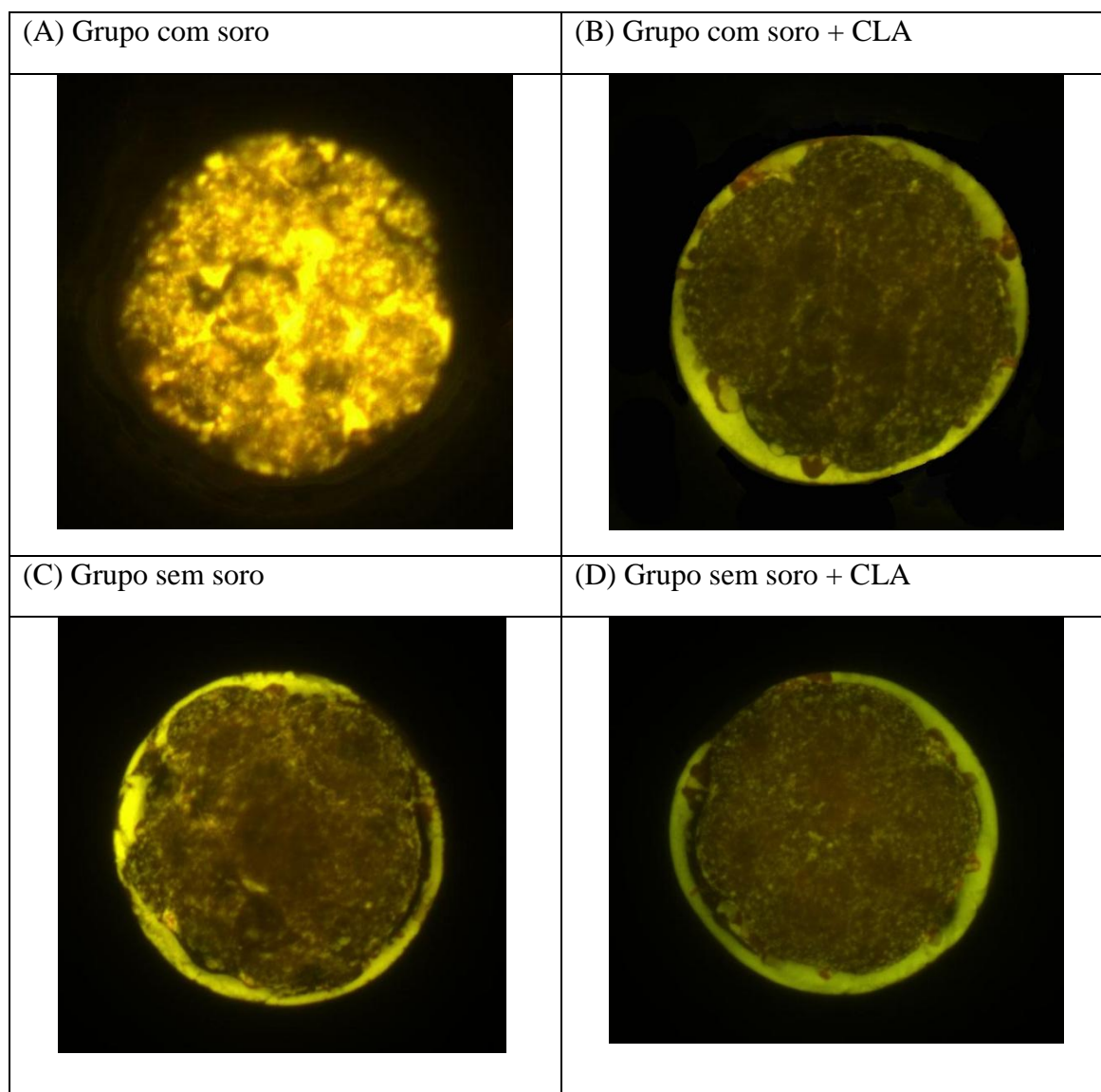


Figura 3: Imagem de embriões bovinos produzidos *in vitro* e corados com *Nile Red*, no quinto dia de cultivo. (A) Embrião do grupo controle - grupo com soro; (B) embrião cultivado no grupo com soro + CLA; (C) embrião cultivado no grupo sem soro; e (D) embrião cultivado no grupo sem soro + CLA.

É possível observar nas figuras 2 e 3 maior intensidade de fluorescência no grupo com

soro em relação aos demais tratamentos. De acordo com as médias das unidades

arbitrárias (UA), a adição de ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* no grupo sem soro + CLA, diminuiu significativamente ($P < 0,05$) o acúmulo intracitoplasmático de lipídeos. Na ausência de soro fetal bovino, verifica-se redução semelhante no acúmulo de lipídeos, com ou sem a adição de CLA *trans-10, cis-12*. Nos grupos sem soro e sem soro + CLA a média das UA foi numericamente inferior ao grupo com soro + CLA. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$). A retirada do SFB pode ser uma forma eficiente de diminuir o acúmulo lipídico nos embriões, porém, isso implicaria na redução significativa ($P < 0,05$) na taxa de produção de blastocistos, como pôde ser verificado na tabela 3. Resultados semelhantes foram relatados por Leivas et al. (2011), no qual o cultivo de embriões bovinos, na ausência de soro fetal bovino, resultou em taxas inferiores (38,6%) de produção de blastocistos em relação ao grupo contendo soro no meio de cultivo (48,2%).

A redução na expressão da enzima catalisadora da síntese de triglicérides, acilglicerol 3-fosfato aciltransferase, associada à redução do acúmulo de lipídeos, sugere que a principal via pela qual o embrião sintetiza triglicérides, componente fundamental das gotículas lipídicas no citoplasma dos embriões, é por

meio do arranjo dos ácidos graxos e lipoproteínas presentes no soro (Ferguson et al., 1999; Sata et al., 1999; Batista, 2009). O completo entendimento da ação do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* ainda não está elucidado. Pouco se sabe dos possíveis efeitos prejudiciais que ele exerce no embrião. Até o presente momento sabe-se, tal como comprovado no presente estudo, que este isômero é capaz de reduzir a quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas nos blastômeros embrionários. Estudos adicionais precisam ser feitos para verificar as reais necessidades da adição de CLA no meio de cultivo.

4.3. Taxas de reexpansão e de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados

No presente estudo, os embriões de graus I e II segundo a *International Embryo Transfer Society* (IETS) (Robertson e Nelson, 1999) foram submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo. As taxas de reexpansão e de eclosão podem ser verificadas na tabela 4.

Tabela 4: Taxas de reexpansão e de eclosão dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental.

| Tratamento | Número de embriões aquecidos | Taxa de reexpansão n; (%) | Taxa de eclosão n; (%) |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1- Grupo com soro | 35 | 24; (68,6) a | 22; (62,9) a |
| 2- Grupo com soro + CLA | 40 | 31; (77,5) a | 24; (60,0) a |
| 3- Grupo sem soro | 33 | 25; (75,7) a | 21; (63,6) a |
| 4- Grupo sem soro + CLA | 32 | 23; (71,8) a | 18; (56,2) a |

As taxas de reexpansão e eclosão foram semelhantes ($P > 0,05$) após a vitrificação

dos embriões dos quatro tratamentos (Tabela 4 e Figura 4).

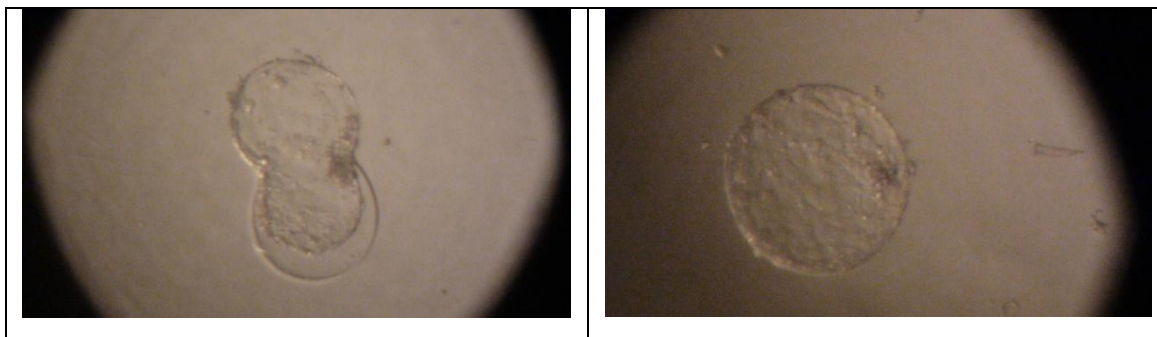


Figura 4: Embriões bovinos produzidos *in vitro* durante o processo de eclosão (A) e reexpansão (B), após vitrificação e aquecimento.

Resultados semelhantes ao presente experimento, com relação às taxas de reexpansão e eclosão, utilizando-se CLA no meio de cultivo foram apresentadas por Pereira et al. (2008), de 64,6 e 86,0%, respectivamente. Para Vajta (2011, contato pelo embryomail), a técnica de vitrificação é bastante simples e pode chegar a quase 100% de sobrevivência após reaquecimento. Segundo este autor, os meios de vitrificação estão bem definidos e, o que diferencia os resultados entre laboratórios é a habilidade técnica, o treinamento, a agilidade e a precisão entre as etapas do processo (Comunicação pessoal com Vajta, 2011).

A menor concentração de lipídeos nos embriões produzidos pelos tratamentos 2, 3 e 4 não implicou em superior taxa de eclosão dos blastocistos vitrificados em relação ao tratamento 1, que continha mais ($P < 0,05$) lipídeos intracitoplasmáticos. Mesmo não havendo diferença em relação à taxa de eclosão entre os grupos experimentais, não é possível afirmar que estes embriões possuem mesma capacidade de gerarem prenhes. Sabe-se que taxas de produção de blastocistos semelhantes em tratamentos diferentes, não está relacionada a taxas iguais de prenhes (Gonçalves et al., 2008). Estudos adicionais, incluindo a

transferência dos embriões vitrificados para o útero das receptoras, precisam ser realizados para verificar se há vantagem em diminuir a concentração de lipídeos no citoplasma dos embriões produzidos *in vitro* visando aumentar as taxas de prenhes.

Para este experimento, foi escolhida a técnica de vitrificação para o congelamento dos embriões utilizando-se a *open pulled straw* (OPS) (Vajta, 1997b). Além desta técnica de congelamento apresentar resultados superiores ao congelamento lento, a vitrificação ainda é econômica pois não requer equipamentos caros como a máquina de congelamento convencional (lento), além de ser uma técnica simples e rápida de ser executada (Dinnyés et al., 2000). As OPSs foram eleitas para este trabalho por serem palhetas simples e de fácil manuseio se comparadas com outras palhetas de vitrificação, tais como: *cryotop*, *cryoloop*, *hemi-straw*, *cryotip* entre outras. Além da palheta ser simples, o protocolo utilizado para OPS é prático e econômico (Vajta e Kuwayama, 2006).

Estudos que utilizam o ácido linoléico conjugado *trans-10*, *cis-12* no meio de cultivo de embriões bovinos são muito recentes (Pereira et al. 2007; Batista, 2009; Lapa et al. 2011), e os resultados

encontrados ainda diferem entre os diversos laboratórios.

A vitrificação apresenta bons resultados na sobrevivência embrionária. No entanto, a transferência direta desses embriões (descongelamento direto nas receptoras a campo, sem passar pelo laboratório) ainda é um obstáculo para se conseguir melhores taxas de fertilidade (Inaba et al. 2011).

Alguns autores obtiveram bons resultados de fertilidade utilizando a transferência direta de embriões vitrificados, sem passar pelo processo de descongelamento no laboratório de PIV (Vajta et al., 1999; Inaba et al., 2011). Se esta barreira for superada, embriões produzidos *in vitro* poderão ganhar ainda mais espaço no mercado agropecuário, uma vez que a venda desses embriões será facilitada e sua transferência poderá ocorrer em qualquer lugar, sem a necessidade de laboratório e de meios de cultura especiais para serem reaquecidos, pois esta etapa será realizada diretamente no útero das receptoras de embrião.

A transferência direta de embriões PIV é tão simples quanto a inseminação intrauterina a campo (Inaba et al., 2011). Porém, poucos autores utilizam desta técnica, e mais estudos precisam ser realizados para garantir o sucesso do procedimento. Inaba et al. (2011) relataram taxas de prenhes semelhantes aos 60 dias de gestação, quando comparada com embriões transferidos à fresco (40,0%) ou vitrificados (29,4%).

A rápida dispersão da técnica de vitrificação, juntamente com o sucesso que ela apresenta, pode gerar problemas futuros. A tendência é que vários laboratórios no mundo comecem a comercializar embriões vitrificados e, se a técnica não for bem executada pelo responsável, as taxas de sobrevivência embrionária serão afetadas

no momento do seu reaquecimento (Vajta, 2010; comunicação pessoal). Brill et al. 1999 verificaram que o grande número de blastômeros apoptóticos pode levar à morte embrionária precoce, anomalias fetais e abortos precoces.

A melhoria dos resultados de vitrificação implicará na possibilidade de aspiração folicular guiada por ultrassom durante todo o ano, criando-se bancos de embriões congelados para posterior transferência em épocas e condições mais satisfatórias, o que maximizará resultados que gerem lucro ao sistema de produção (Vajta, 2011; comunicação pessoal).

Embriões produzidos *in vitro* são, normalmente, muito sensíveis à vitrificação devido aos efeitos deletérios da exposição aos crioprotetores e das técnicas de congelamento e descongelamento, que causam estresse osmótico para as células embrionárias (Dinnyés et al., 1999; Pugh et al., 2000).

A temperatura e o tempo de exposição aos crioprotetores são de extrema importância para a vitrificação (Vajta e Kuwayama, 2006), que deve ser realizada à temperatura ambiente e de forma rápida (Rall e Fahy, 1985). Sabe-se que na vitrificação há grande concentração de crioprotetores no meio e altas temperaturas podem gerar efeitos tóxicos dos crioprotetores aos embriões. A vitrificação é delicada e exige habilidade e, por isso, é fundamental que o profissional seja previamente treinado e capacitado para executar a técnica. No presente experimento todo o processo de vitrificação foi realizado à temperatura ambiente, e o tempo de exposição ao meio de vitrificação não ultrapassou 20 segundos. Outro fator de extrema importância durante o processo de vitrificação é a quantidade de meio que irá junto ao embrião na palheta. É importante que não haja mais que 1µl de

meio na palheta contendo o embrião para que o processo de vitrificação seja o mais rápido possível e, conseqüentemente, evite possíveis oscilações de temperatura durante o processo (Inaba et al. 2011).

As taxas de eclosão foram significativamente superiores ($P < 0,05$) após 48h de cultivo dos embriões aquecidos, em todos os tratamentos, quando comparadas com 24h e 72h (Tabela 5).

Tabela 5: Taxas de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados, após período de 72 horas após aquecimento

| Tratamento | Número de embriões aquecidos | Número; (%) de embriões eclodidos | | |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | | 24h | 48h | 72h |
| 1 Grupo com soro | 35 | 5; (14,2) c | 13; (43,3) a | 4; (23,5) b |
| 2 Grupo com soro + CLA | 40 | 6; (15,0) b | 18; (52,9) a | 0; (0,0) c |
| 3 Grupo sem soro | 33 | 4; (12,1) c | 14; (48,2) a | 3; (20,0) b |
| 4 Grupo sem soro + CLA | 32 | 6; (18,7) b | 9; (34,6) a | 3; (17,6) c |

Médias seguidas de letras distintas, na mesma linha, diferem pelo Teste de Mc Nemar ($P < 0,05$).

Lim et al. (2007) também verificaram redução na taxa de sobrevivência embrionária às 48h de cultivo após descongelamento. No entanto, a taxa de sobrevivência após 24h de cultivo foi superior em relação às 48h e 72h. Uma possível explicação para o resultado observado no presente estudo, com relação à maior taxa de eclosão nos quatro tratamentos às 48h de cultivo pós aquecimento, é o aumento de células apoptóticas induzidas pelos efeitos tóxicos e mecânicos da criopreservação. Durante o processo de vitrificação, algumas células não resistem ao processo e morrem (Tachikawa et al., 1993). Com menor número de células viáveis no embrião após reaquecimento, o tempo de reexpansão e eclosão podem ser maiores que 24h. Neste trabalho, as taxas de eclosão dos quatro tratamentos foram superiores com 48h de cultivo, após o aquecimento dos embriões. Importante salientar que, como verificado por profissionais que atuam diretamente em

laboratórios comerciais, os embriões vitrificados podem ser transferidos diretamente para as receptoras após serem aquecidos em laboratório. É comum, em alguns laboratórios comerciais esperar duas horas em cultivo para transferência dos embriões pós aquecimento. No entanto, este tempo não é necessário e os embriões podem ser transferidos imediatamente após o aquecimento sem comprometer as taxas de gestação (*informação fornecida por técnicos de laboratórios comerciais*).

4.4. Avaliação da concentração de radicais livres nos meios de cultivo *in vitro* de embriões bovinos

A figura 5 contém os valores da concentração de radicais livres (H_2O_2) liberados no meio de cultivo embrionário, segundo os diferentes grupos experimentais e o meio controle (branco).

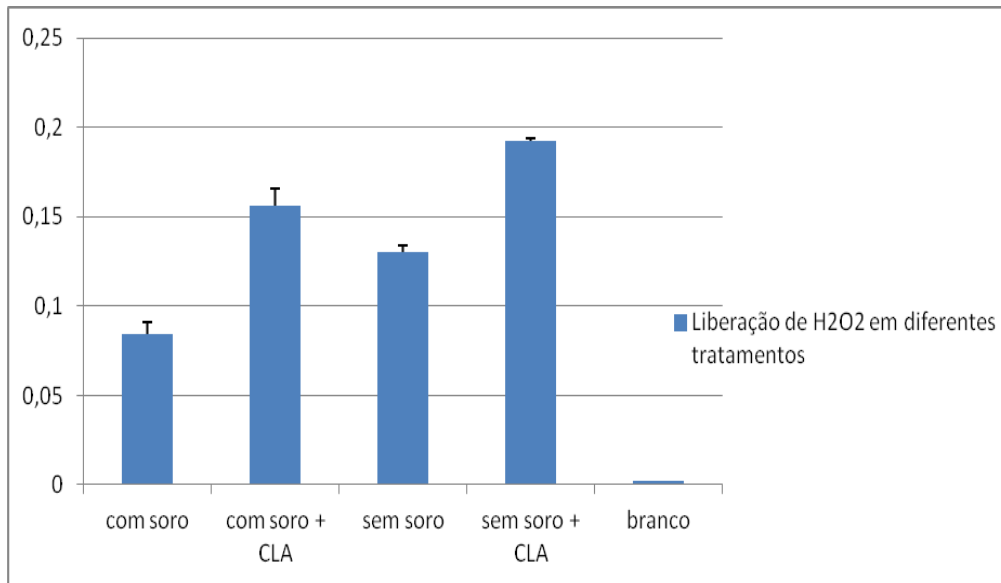


Figura 5: Concentração de peróxido (H_2O_2) no meio de cultivo dos quatro grupos experimentais após 168 horas de incubação; valores representados em μM .

Como observado na figura 5, não houve diferença ($P > 0,05$) na concentração de radicais livres (H_2O_2) presentes nos meios de cultivo dos quatro tratamentos, após 168 horas de incubação. Mesmo não havendo diferença estatística entre os tratamentos, verifica-se tendência de aumento de H_2O_2 para os grupos 2 e 4 em que foi adicionado o isômero CLA *trans-10, cis-12*.

Não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizaram o kit de QuantiChrom™ Peroxide Assay Kit (DIOX-250) para o estudo da liberação de H_2O_2 no meio de cultivo embrionário. Todos os trabalhos encontrados utilizaram o kit DIOX-250 para medir a concentração de H_2O_2 em meios de cultivo contendo outros organismos que não embriões, tais como: bactérias, vírus HIV-1 e plantas (Giao et al., 2007; Yu et al. 2008; Deshimane et al., 2009). Como o kit apresenta grande sensibilidade para meios de cultivo e não requer tratamento prévio das amostras, este foi escolhido para o presente estudo.

Estudos adicionais precisam ser realizados para verificar a interferência destes radicais livres no desenvolvimento embrionário. Mesmo não apresentando diferença estatística entre os tratamentos, é possível notar que componentes do meio de cultivo, juntamente com o metabolismo celular, levam ao aumento de radicais livres no meio, tendo em vista que o meio sem cultivo embrionário apresentou baixos níveis de H_2O_2 . Este aumento de radicais livres no meio pode comprometer o metabolismo normal das células (Banni et al., 2004).

As concentrações elevadas de H_2O_2 são responsáveis por defeitos mitocondriais nos embriões, subsequente ativação da caspase e, finalmente, apoptose celular (Velez-Pardo et al., 2007). Se o H_2O_2 exógeno não for inativado, este é convertido em *reactive oxygen species* (ROS) altamente reativas, tais como radicais de hidroxil e espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrato (Klauning e Kamendulies, 2004). Estudos demonstram que a presença elevada de

H₂O₂ em cultivos *in vitro* de embriões bovinos pode acarretar em altos níveis de fragmentação e apoptose celular (Morales et al., 1999; Liu e Keefe, 2000; Feugang et al., 2004). No presente trabalho, mesmo havendo aumento nos níveis de H₂O₂ nos meios contendo CLA, este aumento não foi suficiente para comprometer as taxas de produção de blastocistos, como apresentado na tabela 2.

Estudos adicionais precisam ser realizados para entender as reais necessidades do uso do CLA no meio de cultivo *in vitro*, tendo em vista que neste estudo este isômero não melhorou a taxa de eclosão após vitrificação e elevou o custo dos meios produzidos *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

A presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo é importante para aumentar a taxa de produção de blastocistos;

A transferência dos embriões vitrificados, dos quatro tratamentos apresentados no presente estudo, para receptoras de embriões é necessária para certificar, através da análise da taxa de prenhes, a real necessidade da utilização do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultivo embrionário. A presença de CLA no meio de cultivo não aumentou as taxas de reexpansão e eclosão dos blastocistos após vitrificação e ainda elevou o custo do processo;

A maior concentração de lipídeos encontrada nos embriões cultivados no grupo com soro (grupo controle) não interferiu nas taxas de reexpansão e eclosão após aquecimento. A utilização de 2% de SFB no meio de cultivo pareceu ser ideal para a produção *in vitro* de embriões e posterior vitrificação, pois este grupo apresentou maior taxa de blastocistos antes

da vitrificação e mostrou resultados semelhantes após aquecimento dos mesmos em relação aos demais tratamentos. Além disso, este meio foi mais econômico pois não utilizou o CLA;

Para observação da taxa de eclosão em laboratório, o tempo ideal foi de 48 horas para todos os tratamentos. Parece que a adição de CLA no meio contendo SFB acelerou a taxa de eclosão após o aquecimento dos embriões cultivados em meio contendo soro + CLA, pois todos os embriões que sobreviveram à vitrificação foram eclodidos em até 48h.

A adição de CLA no meio de cultivo não aumentou a concentração de peróxidos (H₂O₂) após 168 horas de incubação. Mais estudos precisam ser realizados utilizando-se CLA no meio de cultivo embrionário para investigar os possíveis efeitos maléficos que ele pode causar no embrião.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S. et al. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 53, p. 346, 2000.

ABE, H. & HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction Development*, v. 49, p. 93-202, 2003.

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S. et al. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*. v.199, p.519-527, 1999a.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T. et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and-fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos

cultured either in serumfree medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v.53, p. 325–335, 1999b.

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

ALASNIER, C.; BERDEAUX, O.; CHARDIGNY, J.M. et al. Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols. *Journal Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 337–345, 2002.

ANDRABI, S.M.H. & MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 223-243, 2007.

BANNI, S.; PETRONI, A.; BLASEVICH, M. et al. Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. *Biochemica and Biophysica Acta*, v. 1682, p. 120-127, 2004.

BATISTA, R.I.T.P. Efeito do ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 na regulação do acúmulo de lipídios e expressão gênica em embriões produzidos *in vitro*. 2009. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia). Escola de Ciências Biológicas da UFJF, Juiz de Fora, MG.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A. et al. Identification of the

conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. *American Journal Physiology Regulatory Comparative Physiology*, v. 278, p. 179-184, 2000.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 2155, 2002.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, v. 2, p. 91-148, 1995.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 27, p. 147-158, 1982.

BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H. et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, v. 16, p. 512-519, 1999.

CARNEVALE, E.M.; CAMPOS-CHILLÒN, L.F.; SUH, T.K. et al. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology*, v. 71, p. 349-354, 2009.

CHANG, M.C. The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the fallopian tubes. *Journal of Experimental Zoology*, v. 128, p. 379-406, 1955.

COHEN, J.; GILLIGAM, A.; ESPOSITO, W. et al. -Ambient air and its potential effects on conception *in vitro*. *Human Reproduction*, v. 12, p. 1742-1749, 1997.

YU, C. L.; KALE, Y.; GOPISHETTY, S.; A Novel Caffeine Dehydrogenase in *Pseudomonas* sp. Strain CBB1 Oxidizes

Caffeine to Trimethyluric Acid. *Journal of Bacteriology*, p. 772–776, 2008.

DESHMANE, S. L.; MUKERJEE, R.; FAN, S. et al. Activation of the Oxidative Stress Pathway by HIV-1 Vpr Leads to Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 Expression. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 284, No 17, p. 11364–11373, 2009.

DINNYÉS, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T. et al. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced “in vitro” in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology*, v.46, p.1425-1439, 1999.

DINNYÉS, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T. et al. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 318–324, 1999.

DINNYÉS, A.; DAI, Y.; JIANG, S. et al. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology Reproduction*, v. 63 p.513-518, 2000.

DOBRINSKI, J. R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology*, v.56, p.1333-1334, 2001.

FAIR T.; LONERGAN, P.; DINNYÉS, A. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, v.58, p.186–195, 2001.

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

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A. et al. Addition of beta-

mercaptoethanol or Trolox (R) at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, v. 61, p. 71–90, 2004.

GALLI, C. & LAZZARI, G. The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 1-7, 2008.

GENICOT, G.; LEROY, J. L.; SOOM, A. V. et al. The use of a fluorescent dye, *Nile Red*, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 63, n. 4, p.1181-1194. 2005.

GEORGE, F.; DANIAUX, C.; GENICOT, G. et al. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, v. 69, p. 612–623, 2008.

GIAO, N.N.; HAILSTONES, D.; WILKES, M. et al. Water Deficit Induced Pollen Sterility Associated with a Programmed Cell Death and Oxidative Stress in Rice Anthers. *BioAsia*, 2007.

GOMEZ, E.; RODRIGUES, A.; MUÑOZ, M. et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, v. 69, p.1013-1021, 2008.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 395p.

GRÁZIA, J.G.V. Avaliação do acúmulo lipídico em oócitos de vacas das raças Gir (Bos Taurus Indicus) e Holandês (Bos Taurus Taurus). 2010. 36p. Dissertação (Monografia de graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, MG.

- GREENSPAN, P. & FOWLER, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red. *The Journal of Lipid Research*, v. 26, n. 7, p.781-789, 1985.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141–152, 1995.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol or without serum-proteins. *Theriogenology*, v. 52, p.683-700, 1999.
- HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M. et al. Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal Clinical Investigation*, v. 109, p. 1125-1131, 2002.
- INABA, Y.; AIKAWA, Y; HIRAI, T. et al. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. *Journal of Reproduction and Development*, v. 57, n.4, 2011.
- LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P. et al. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p. 904-910, 2011.
- LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 248, p. 817-821, 1998.
- LEIBFRIED, L. & FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature “in vitro”. *Journal of Animal Science*, v.48, p.76-86, 1979.
- LEIBO, S.P. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.31, p.85-93, 1989.
- LEIBO, S.P. & LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology*, v. 39, p. 81-94, 1993.
- LEIBO, S.P.; POLLARD, J.W.; MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of reassembled in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v. 43, n. 1, p. 265, 1995.
- LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; FIALHO, S.S. et al. Fetal calf serum enhances in vitro production of Bos Taurus indicus embryos. *Theriogenology*, v.75, p. 429-433, 2011.
- LEROY, J.L.M.R.; GENICOT, G; DONNAY, I. et al. Evaluation of the Lipid Content in Bovine Oocytes and Embryos with Nile Red: a Practical Approach. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p.76-78, 2005.
- LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H. et al., Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*, 2007.
- LIU, L. & KEEFE, D.L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1828–1834, 2000.
- LONERGAN, P.; O’KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, v.51, p. 1565-1576, 1999.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J. et al. Temporal sensitivity of bovine

embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, v.126, p. 337-346, 2003.

MAHMOUDZADEH, A.R.; VAN SOOM, A.; BOLS, P. et al. Optimization of simple vitrification procedure for bovine embryos produced "in vitro": effect of developmental stage, two steps addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.103, p.33-39, 1995.

MARTINEZ, A.G.; VALCACEL, A.; FURNUS, C.C. et al. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. *Small Ruminant Research*, v. 63, p.288–296, 2006.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v.168, p.939-949, 1970.

MIYAMOTO, H.; MIYAMOTO, Y.; ISHIBASHI, T. The importance of equilibration time to glycerol prior to freezing I the cryopreservation of mouse embryos. *Japanese Journal of Zootechnic Science*, v.57, p. 250-256, 1986.

MONTAGNER, M.M. Produção in vitro de embriões bovinos com meios congelados, HEPES e retinol. Santa Maria, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria.

NAGASHIMA, H.; CAMERON, R.D.A.; KUWAMA, M. et al. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing and vitrification. *Journal of Reproduction Development*, v. 45, p.167–176, 1999.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, v. 14, n.2, p.127-149, 1996.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; LIU, W. et al. Structure–activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 561–569, 2004.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J. et al. Evidence that the *trans-10,cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Journal of Lipid Research*, v. 34, p. 235–241, 1999.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; NTAMBI, J.M. et al. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochemical et Biophysical Acta*, v. 1486, p. 285-292, 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.

PEREIRA, M.M. Efeito de diferentes sistemas de maturação *in vitro* no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos. 2010. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

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

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J. et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10, cis12* conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo

- culture. *Animal Reproduction Science*, v.106, p. 322-332, 2008.
- PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12c* CLA). *Animal Reproduction Science*, v. 98, p. 293-301, 2007.
- POLLARD, J.W. & LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p. 287, 1993.
- PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 9-22, 2000.
- RALL, W.F. & FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos in microdrops. *Folia Biologica*, v.36, p.153-158, 1985.
- REICHENBACH, H.D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.15-50, 2003.
- RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNALO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology Reproduction*, v. 68, p. 236-243, 2003.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, 3. ed, p. 180, 1999.
- ROWE, A.W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. *Cryobiology*, v.3, n.1, p.12-18, 1966.
- ROMEK, M., GAJDA, B., KRZYSZTOFOWICZ, E. et al. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using *Nile Red* fluorescent probe. *Theriogenology*, 2010.
- SAHA, S. & SUZUKI, T. Vitrification of "in vitro" produced bovine embryos at different ages using one and three-step addition of cryoprotective additives. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, p.741-746, 1997.
- SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H. et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *Journal of Reproduction Development*, v. 45, p. 97- 103, 1999.
- SEIDEL, G. E. Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America*, v. 12, p. 85-99, 1996.
- STEFANELLO, J. R.; BARRETA, M.H.; PORCIUNCULA, P.M. et al. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-1 or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology*, 2006.
- STEINHART, C. Conjugated Linoleic Acid—The Good News about Animal Fat. *Journal of Chemical Education*, v. 73, n. 12, 1996.
- TACHIKAWA, S.; OTOI, T.; KONDO, S. et al. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, v. 34, p. 266-271, 1993.
- TAVARES, L.M.T.; FEITOSA, W.B.; MELLO, M.R.B. et al. Is the early reduction of fetal calf serum concentration

in bovine *in vitro* embryo culture beneficial? *Animal Reproduction.*, v. 5, p. 34-38, 2008.

THIBIER, M. More than half a million of bovine embryos transferred in 2002: a report of the IETS. Data Retrieval Committee. *Internacional Embryo Society Newsletter*, v.21, n. 4, p. 12-19, 2003.

THIBIER, M. Data retrieval committee annual report. *Internacional Embryo Transfer Society Newsletter*, v. 26, n. 4, p. 4-9, 2008.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A. et al. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* preelongation development of ovine embryos. *Biology Reproduction*, v. 53, p. 1385-1391, 1995.

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. and CALLESEN, H. The submarine incubation system. A new tool for *in vitro* embryo culture: A technique report. *Theriogenology*, v. 48, p. 1379-1385, 1997a.

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P. et al. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with open pulled straw ("OPS") method. *Cryo-Letters*, v. 18, p. 191-195, 1997b.

VAJTA, G.; MURPHY, C.N.; MACHATY, Z. et al. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open pulled straw method. *Veterinary Record*, v.144, p.180-181, 1999.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T. et al. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine

blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v. 52, p. 939-48, 1999.

VAJTA, G. & NAGY ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproduction Biomed Online*, v. 12, n. 6, p. 779-796, 2006.

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

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHURBIERS, N. et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 87-93, 1997.

VAN SOOM, A.; MATEUSEN, B.; LEROY, J. et al. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reproductive BioMedicine Online*, v. 7, p. 104-110, 2003.

VARAGO, F. C. Efeito da adição da sacarose ao meio para vitrificar embriões zebuínos produzidos *in vitro*. 2005. 46p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG.

VELEZ-PARDO, C.; MORALES, A.T.; DEL RIO, M.J. et al. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappa B and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology*, v. 67, p. 1285-1296, 2007.

VIANA, J.H.M. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. *O embrião*, v. 42, p. 05-07, 2009.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil:

Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. 915-919, 2007.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but not prevent establishment of dominant follicle in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1-12, 2004.

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

7. ANEXOS