



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO VALENTE SANCHES

**OBTENÇÃO DE PRENHEZES EM REBANHOS BOVINOS
APARTIR DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*
CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICAÇÃO OU
TRANSFERÊNCIA DIRETA**

Londrina
2015

BRUNO VALENTE SANCHES

**OBTENÇÃO DE PRENHEZES EM REBANHOS BOVINOS
APARTIR DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*
CRIOPRESERVADOS POR VITRIFICAÇÃO OU
TRANSFERÊNCIA DIRETA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Produção Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S211o Sanches, Bruno Valente.

Obtenção de prenhez em rebanhos bovinos a partir de embriões produzidos *in vitro* criopreservados por vitrificação ou transferência direta / Bruno Valente Sanches. – Londrina, 2015.
57 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Bovino – Reprodução – Teses. 2. Transferência de embriões – Teses. 3. Embrião – Teses. 4. Fertilização *in vitro* – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

BRUNO VALENTE SANCHES

**OBTENÇÃO DE PRENHEZES EM REBANHOS BOVINOS A PARTIR
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* CRIOPRESERVADOS POR
VITRIFICAÇÃO OU TRANSFERÊNCIA DIRETA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Produção Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes
Seneda
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Wanessa Blaschi
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Prof. Dr. Gustavo Martins Gomes dos Santos
Sheep Embryo Reprodução Animal

Dra. Fabiana Fernandes Bressan
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais Edson (*in memoriam*) e Ângela, com todo o meu amor e gratidão, por sempre me apoiarem e incentivarem em todos os meus sonhos e decisões. À Cassia, minha companheira de todas as horas e à Maria Vitória, que trouxe sentido às nossas vidas e me ensina algo novo todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Ser veterinário foi algo natural na minha vida. Sem perceber, desde muito pequeno já fazia estágio em suinocultura e avicultura na granja da família.

Isto porque, minha brincadeira preferida sempre foi ir pra granja assistir aos partos das porcas, ajudar a puxar aqueles leitões “enroscados”, embora hoje eu saiba que eles já estavam bem posicionados no canal do parto e o Dr. Edson Sanches (meu pai) me deixava auxiliar no parto apenas para ver a minha felicidade em tirar o leitão de dentro do útero da mãe.

Outra lembrança muito forte na minha memória são aquelas noites quando íamos para a granja “catar frango”. Após semanas de engorda, chegava a hora de entregar os frangos para o frigorífico. O mais divertido (para uma criança de 6 anos) era ter que correr atrás dos frangos no escuro, já que as luzes eram apagadas para diminuir o estresse das aves e facilitar a captura. Hoje também sei que não adiantava apagar as luzes se eu corria e gritava atrás dos frangos.

De qualquer maneira, meu pai fazia questão de me ensinar o porque das coisas, a importância da medicina veterinária na vida das pessoas e da sociedade, a responsabilidade social que temos ao sermos capazes de ajudar a aumentar a oferta de alimentos no mundo e usava estas viagens até a granja para me ensinar alguma coisa, inclusive a dirigir o carro, com nove anos de idade.

Outros tempos, mas hoje vejo a importância que o meu pai veterinário teve na escolha da profissão que eu decidi seguir, embora ele dissesse para todo mundo que preferiria que eu tivesse escolhido ser banqueiro...

Esteja onde estiver, saiba que não fiquei rico, muito menos abri um banco. Apenas tento ser um bom homem, veterinário correto e honesto, conforme você me ensinou.

Minha infância foi realmente excelente e tranquila...pelo menos para mim...Já para a minha mãe Ângela, creio que não tenha sido tão tranquila assim...

Como consequência das minhas estripulias, foram 2 braços e 2 pernas quebradas, onze vezes no hospital para suturar o queixo, algumas outras vezes a testa...

Em todos os momentos, ela estava lá. Uma mãe presente e exemplar. Trabalhadora, profissional dedicada, mãe amorosa e guerreira, sempre nos ensinando que poderíamos ser o que quiséssemos, bastava ter vontade e correr atrás.

Mãe, agradeço por ter dedicado sua vida à nossa família. Não tenho muito mais o que escrever a seu respeito, mas tenho a certeza de que a senhora é responsável por 80% do que sou hoje...talvez 90% (incluindo também meus defeitos)

Não poderia deixar de agradecer á minha irmã Karla por ter sido exemplo de força de vontade nos estudos, mas também por ter me delatado aos nossos pais todas as vezes que fiz coisa errada.....faz parte, coisas de irmã mais velha, mas talvez os castigos (pós-delações não premiadas) foram importantes na formação do meu caráter. Hoje, como pai, dou valor a isso e sei da responsabilidade de educar um filho.

Aliás, todas as vezes que eu fazia uma arte muito grande, meu pai dizia: minha vingança, é que um dia você será pai...

Mas pra isso, eu teria que encontrar a pessoa certa. E achei.

Em 2006 fui convidado para montar e assumir a primeira filial da empresa In Vitro Brasil, no estado de Goiás. A princípio pensei que fosse em Goiânia, mas depois fui parar em Nerópolis/GO. Após 6 meses de trabalho solitário (era o único funcionário da filial) recebi um telefonema e um pedido de estágio. No primeiro dia de estágio já vi que a estudante Cassia Leão não poderia mais fazer estágio ali....se ela quisesse, poderia ser minha namorada (eu queria).

Algum tempo se passou, o estágio acabou e o pedido de namoro aconteceu.

Nunca imaginei que a aquela menina, com 19 anos na época, pudesse vir a ser esta companheira maravilhosa e a melhor mãe que eu poderia escolher para a nossa filha.

Cassia, sei que você abdicou temporariamente da sua vida profissional e o quanto foi difícil morar distante da sua família. Isto tudo para poder me acompanhar em todos os momentos e superarmos juntos todos os desafios.

Além disso, agradeço muito por compreender a minha ausência, as longas viagens, o trabalho aos finais de semana. Você provou ser uma companheira para todas as horas.

Porém nossa jornada juntos está apenas começando...estamos unidos por um laço eterno e maravilhoso. A Maria Vitória veio ao mundo para nos ensinar a sermos pessoas melhores e deu verdadeiro sentido às nossas vidas. Agradeço muito por ter me dado este presente.

Fazer faculdade em Londrina sempre foi meu sonho...meu pai não entendia porque eu prestava vestibular em Londrina e não na Unesp – Araçatuba, que estava a 10 km de casa. Depois, acho que ele entendeu.

Durante a faculdade fiz bons e verdadeiros amigos, tinha uma banda e tocava na noite. Também estudava de vez em quando...

Porém, ainda não tinha certeza de qual área seguir....piscicultura, suinocultura, avicultura, inspeção, etc...

Até que no quarto ano da faculdade conheci um professor chamado Marcelo Marcondes Seneda e ele nos apresentou a “nobre área”. Pronto, agora sabia o que queria fazer da vida...

Aquele professor calmo e gente boa me chamou a atenção...Ele se importava com a formação das pessoas, no sentido mais amplo da palavra, e não apenas na formação técnica dos aspirantes a veterinários que ali estavam. Eu precisava conseguir um estágio com ele...

Mas várias pessoas pensaram a mesma coisa e a sala dele ficou lotada.

Como sempre, ele contornou a situação e acolheu a todos. Montamos um grupo de estudos em horários alternativos e passamos a nos reunir para estudar reprodução animal.

O quarto ano da faculdade acabou e com ele as aulas com o prof. Marcelo. Mas continuávamos a ter contato e eu ia à sua sala frequentemente pedir conselhos, pedir ajuda ou mesmo apenas conversar.

Nestas conversas surgiu a possibilidade de fazer mestrado...mas, antes disso, eu queria trabalhar um pouco.

Foi então que resolvi prestar a prova da residência na área de grandes animais da UEL. Desta maneira, poderia ter alguma experiência prática e fazer o mestrado futuramente.

Mas ao final do primeiro ano da residência, fui convidado pelo Jose Henrique para vir trabalhar na In Vitro Brasil. Não sabia como fazer para deixar a residência e, mais uma vez, fui parar no “divã” do Seneda...

Para quem gostava de reprodução, a IVB era a “Disneylândia do embrião”...Aceitei o emprego na hora, mas com o compromisso firmado com o professor Marcelo de não perdermos o contato e fazermos algo juntos no futuro...e fizemos.

De lá pra cá o Professor Dr. Marcelo Marcondes Seneda esteve presente em TODOS os momentos importantes da minha vida (formatura, mestrado, casamento, perda do meu pai, e outros). Por tudo isso, agradeço todos os dias por ter um amigo especial como o senhor.

Comecei a trabalhar na IVB no final de 2004 e já se foram mais de 10 anos. Foi e continua sendo o meu primeiro e único emprego. Em tempos de geração Y, posso dizer que me orgulho muito disso.

Na IVB aprendi um ofício e a como trabalhar duro para alcançar um objetivo. Devo este aprendizado ao Dr. Jose Henrique Fortes Pontes.

Agradeço muito também aos meus outros sócios André, Andrea, Andreia, Antonio, Emerson, Juliana, Lucas, Perla e Rodrigo que, com o trabalho incansável de cada um, ajudaram a construir uma empresa séria, competitiva e respeitada em nível mundial.

Hoje em dia, costumamos dizer entre nós, que o papel da IVB nao é mais fazer embriões. É formar pessoas.

Neste sentido, tenho certeza de que conseguimos trazer para nosso time pessoas muito competentes e comprometidas com os nossos objetivos.

Na execução do presente trabalho, tive a honra de contar com a ajuda de muitas pessoas, principalmente das equipes de Mogi Mirim e Uberaba. Não posso citar nomes, pois tenho certeza de que a lista ficaria imensa e eu poderia ainda esquecer de alguém.

Agradeço aos meus colegas Andrea, Namíbia e Daniel Arnold, que na hora de finalizar a tese, se prontificaram a ajudar, mesmo que o meu pedido de ajuda tenha vindo na semana do natal....

Para aprender mais sobre a congelação lenta, busquei o vasto conhecimento dos meus colegas mais experientes, com mais tempo de curral...sempre fui muito bem recebido por eles e gostaria de agradecer aos veterinários José Renato Chiari, Sidney Uvo, Carlos Marins, Luiz Philipe Porto, João Carneiro e Tom Rea pela paciência e pelos ensinamentos.

Este trabalho também não seria possível sem o comprometimento da equipe da Fazenda Santa Luzia, representados aqui pelo Dr. Marcos Henrique e o Dr. Mauricio Coelho. Muito obrigado a vocês.

Acabam aqui 4 anos de muito aprendizado, mas ainda falta agradecer muita gente. Deixo meu mais sincero obrigado à equipe do Reproa. Todas as minhas colegas de pós-graduação (me desculpem Gustavo Martins e Fábio Morotti) foram muito atenciosas com o 'tal Bruno - aluno fantasma', ajudando nas matrículas fora do prazo, no agendamento das disciplinas, na revisão de resumos e artigos, dando recados pro "Big Boss" e em tudo o que eu precisava. Minhas colegas de Reproa, vocês tiveram importância fundamental na conclusão do meu Doutorado.

A todos vocês, que de alguma maneira contribuíram, de perto ou de longe, trabalhando ou torcendo por mim, muito obrigado!

SANCHES, Bruno Valente. **Obtenção de prenhez em rebanhos bovinos a partir de embriões produzidos *in vitro* criopreservados por vitrificação ou transferência direta.** 2015. 57 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos eficientes para a utilização de embriões produzidos *in vitro* (PIV) e criopreservados, em programas comerciais e em larga escala. No primeiro capítulo, comparou-se as taxas de eclosão de 213 embriões *indicus* PIV submetidos ao agente Forskolin (n=112) ou não (controle n=101) e a taxa de concepção de 145 embriões PIV, cultivados na presença (n=80) ou ausência (n=65) de Forskolin. No segundo capítulo comparou-se as taxas de concepção de embriões bovinos PIV transferidos a fresco (n=259), vitrificados (n=234) ou congelados pelo método de transferência direta (n=228). Analisando os resultados do primeiro capítulo, não houve diferença na taxa de clivagem dos embriões expostos ou não ao Forskolin (70.5% vs 63.3%, $P \leq 0,05$, respectivamente), mas a taxa de concepção dos embriões cultivados na presença do Forskolin foi superior ($P \leq 0,05$) quando comparada à de embriões cultivados na ausência de Forskolin (48.8% vs 18.5%, respectivamente). Quanto ao segundo capítulo, as taxas de concepção de embriões PIV transferidos a fresco (51.3%) foram superiores ($P \leq 0,05$) à de embriões vitrificados (34.6%) ou congelados para transferência direta (42.1%). Não houve diferença ($P \leq 0,05$) entre as taxas de concepção dos grupos vitrificados e transferência direta. Conclui-se que é possível obter taxas de concepção acima de 34% na transferência de embriões bovinos PIV criopreservados por vitrificação ou transferência direta, o que torna a técnica comercialmente viável em muitos países. Esta última técnica, por permitir a transferência direta dos embriões, apresenta-se como recurso estratégico para ampliar a utilização de embriões produzidos *in vitro* em larga escala.

Palavras-chave: Embriões. Bovinos. Vitrificação. Congelamento lento. Transferência direta.

SANCHES, Bruno Valente. **Pregnancies in bovine using *in vitro* produced embryos or cryopreserved by vitrification or direct transfer** . 2015. 57 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop efficient protocols for the use of bovine in vitro produced embryos (IVP) and cryopreserved in commercial programs and largescale. In the first chapter, were compared the hatching rates of 213 indicus embryos PIV submitted to Forskolin agent (n=112) or not (control n=101) and conception rate of 145 IVP embryos, cultured in the presence (n=80) or absence (n=65) of Forskolin. In the second chapter, were compared the conception rates of bovine IVP embryos transferred fresh (n=259), vitrified (n=234) or frozen by direct transfer method (n=228). Analyzing the results of the first chapter, there was no difference in the cleavage rate of embryos exposed or not to Forskolin (70.5% vs. 63.3%, $P \leq 0.05$, respectively), but the conception rate of embryos cultured in the presence of Forskolin was higher ($P \leq 0.05$) when compared to embryos cultured in the absence of Forskolin (48.8% vs. 18.5%, respectively). In the second chapter, the conception rates of IVP embryos transferred fresh (51.3%) were higher ($P \leq 0.05$) of vitrified embryos (34.6%) or frozen for direct transfer (42.1%). No differences ($P \leq 0.05$) between the conception rate of vitrified groups and direct transfer. In conclusion, it is possible to achieve conception rates above 34% transferring IVP bovine embryos cryopreserved by vitrification or direct transfer, which makes commercially viable technique in many countries. The latter technique, by enabling direct transfer of embryos, is presented as a strategic resource to expand the use of embryos produced in vitro on a large scale.

Keywords: IVF Embryo. Bovine. Vitrification. Direct transfer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Mecanismo de ação do forskolin, um potente ativador da adenilato ciclase, que estimula a atividade da lípase atuando no ciclo da Proteína Kinase/ cAMP25
- Capítulo 2** – **Comparação das taxas de concepção após transferência de embriões *in vitro* frescos, vitrificados ou criopreservados após transferência direta**
- Figura 2** – Esquema de envase dos embriões congelados para a transferência direta45

LISTA DETABELAS

Capítulo1	– Cryosurvival and pr egnancy rates after exposure of IVF-derived <i>Bos indicus</i> embryos to forskolin before vitrification	
Table1	– Cryosurvival and hatching abilities of IVP <i>Bo sindicus</i> blastocysts after treatment with or without forskolin for 48 hours inculture	35
Table 2	– Pregnancy rates of IVP <i>Bos indicus</i> embryos after treatment with or without forskolin for 48 hours in culture, before vitrification.....	35
Table 3	– Pregnancy rates of IVP <i>Bos indicus</i> embryos treated with forskolin for48 hours in culture and submitted to vitrification.....	35
Capítulo 2	– Comparação das taxas de con cepção após transferência de embr iões <i>in vitro</i> frescos, vitrificados ou criopreservados após transferência direta.	
Tabela 1	– Taxa de concepção de embriões transferidos a fresco, cultivados com ou sem SFB	37
Tabela 2	– Comparação entre as taxas de concepção aos 30 e 60 dias de gestação de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta e a porcentagem de perda gestacional ocorrida nos 3 grupos, no mesmo período	47

LISTA DE ABREVIATURAS ESIGLAS

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – solução salina fosfato-tamponada Dulbecco
ET/TE	<i>embryo transfer</i> - transferência de embriões
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i> – sociedade internacional
IGF-I	<i>insulin-like growth factor</i> – fator de crescimento semelhante à insulina
IVC/CIV	<i>in vitro culture</i> - cultivo <i>in vitro</i>
IVF/FIV	<i>in vitro fertilization</i> - Fecundação <i>in vitro</i>
IVM/MIV	<i>in vitro maturation</i> - maturação <i>in vitro</i>
IVP/PIV	<i>in vitro embryo production</i> - produção <i>in vitro</i> de embriões
OPU	ovum pickup – aspiração folicular guiada por ultrassonografia
PHE	<i>epinephrine</i> –epinefrina
SD	<i>standard deviation</i> - desvio padrão
TG/TAG	triacilglicerol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. A importância da criopreservação na produção in vitro de embriões	16
2.2. Diferenças entre embriões produzidos in vivo e in vitro	16
2.3. Uso do soro fetal bovino no cultivo in vitro dos embriões e sua influência na criotolerância dos embriões	17
2.4. Diferentes métodos para criopreservação de embriões bovinos	18
2.5. Agentes crioprotetores	21
2.6. Uso do forskolin para diminuir o teor lipídico dos embriões	23
REFERÊNCIAS.....	25
3. HIPÓTESES	34
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo geral.....	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO 1. - Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of ivf-derived <i>bos indicus</i> embryos to forskolin before vitrification.....	35
Abstract.....	35
Introduction	35
Materials and methods	35
Results	35
Discussion	35
Acknowledgments.....	35
References	35
CAPITULO 2 – Comparação das taxas de concepção o após transferência de em briões in vitro frescos, vitrificados ou criopreservados após transferência Direta	36
Resumo	37
Abstract.....	38
Introdução.....	39
Material e métodos	40

Obtenção dos oócitos e maturação in vitro	40
Preparo do sêmen e fecundação in vitro	40
Experimento i – Embriões PIV transferidos a fresco após cultivo na presença ou ausência de Soro Fetal Bovino (SFB)	41
Cultivo in vitro dos embriões	41
Experimento ii – Comparação das taxas de concepção de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta	42
Cultivo in vitro dos embriões	42
Vitrificação dos embriões	43
Descongelção dos embriões vitrificados	44
Congelção lenta dos embriões	44
Descongelção e transferência direta	45
Análise estatística	46
Resultados	46
Discussão	47
Referências	52
7. CONCLUSÕES	57

1. INTRODUÇÃO

A crescente exigência mundial para produção de alimentos seguros e de forma sustentável tem forçado a pecuária bovina a sofrer adaptações, buscando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Ainda que numericamente expressiva, a pecuária brasileira tem grande potencial de aumentar a sua produtividade e eficiência em termos percentuais e isto torna-se mais evidente quando comparamos as médias de produção brasileiras com as de outros países mais eficientes.

Por exemplo, a produtividade do rebanho leiteiro brasileiro é de 1.471 litros de leite/vaca/ano (Embrapa, 2013). No entanto, esta média é bastante inferior àquela registrada no rebanho americano, o atual maior produtor de leite do mundo, com aproximadamente 11.000 litros de leite/vaca/ano.

As biotécnicas da reprodução animal têm contribuído para a produção de animais com genótipos superiores, com eficiência produtiva destacada (Lopes et al., 2012) e têm sido fortemente incorporadas à rotina de fazendas comerciais.

Dentre as biotécnicas disponíveis, a produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta eficaz para otimizar o processo de seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores. A PIV de embriões bovinos apresenta como vantagens favorecer a determinação e controle do sexo dos produtos, elevar a eficiência dos sistemas de produção impondo rapidez aos programas de melhoramento genético, facilitar o comércio de embriões, maximizar a utilização do sêmen congelado oriundo de animais de alto valor produtivo, além de permitir o desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas. Por isso, esta técnica tem se mostrado uma ferramenta em franca ascensão, sendo cada vez mais divulgada e utilizada em nível nacional.

A partir dos anos 2000, a iniciativa privada vislumbrou a perspectiva favorável de disponibilizar a PIV de embriões aos pecuaristas. Desta forma, a PIV vem sendo exercida por um número crescente de profissionais, com resultados promissores (Viana & Camargo, 2007).

No Brasil, foram inseminadas apenas 5,54% do total de matrizes, o que representa 13 milhões de doses de sêmen no ano (Asbia, 2013).

Em termos de produção de embriões bovinos ao redor do mundo, em 2013, 874.257 embriões foram transferidos (Perry, 2014), dentre estes, 390.745 foram obtidos por PIV. Dentre o total embriões PIV transferidos no mundo em 2013, apenas 35.185 foram previamente criopreservados, diferentemente daqueles produzidos *in vivo*, onde o número de embriões criopreservados foi superior aos transferidos a fresco. Esta diferença nas proporções reflete a dificuldade existente em se obter resultados eficientes com os protocolos de criopreservação quando os embriões são produzidos *in vitro* (Perry, 2013).

Por outro lado, a PIV de embriões tem se tornado cada vez mais eficiente em termos de taxas de sucesso ao longo dos últimos anos. Assim, uma adequada e eficiente metodologia de criopreservação de embriões PIV torna-se fundamental na proteção e manutenção de espécies e populações animais, além de possibilitar o comércio internacional destes oócitos e embriões. Com isso, seria evitado o transporte de animais vivos, com seus riscos e barreiras sanitárias.

Em nível nacional, existe forte interesse econômico na criopreservação de embriões PIV, visto que os custos do processo seriam diminuídos, com melhor aproveitamento das receptoras e a criação de bancos de embriões congelados, que poderiam ser comercializados futuramente, ao invés de serem descartados, como tem acontecido na maior parte das vezes.

O sucesso crescente da técnica de vitrificação de embriões PIV tem sido reportado por diferentes grupos de pesquisa nos últimos anos (Block et al, 2010; Morató & Mogas, 2014; Salzano et al, 2014), embora tais grupos tenham relatado principalmente experimentos somente em condições de laboratório, ou testes a campo em pequena escala. Outro aspecto importante refere-se a peculiaridades dos embriões *Bos indicus*, cuja capacidade de suportar os processos de criopreservação podem diferir dos embriões *taurus* (Visintin et al., 2002).

A vitrificação vem sendo aplicada no Brasil como complemento ao processo de transferência a fresco. No capítulo 1 do presente trabalho, apresentamos os resultados das taxas de concepção de embriões PIV transferidos para as receptoras

após serem vitrificados. No entanto, é necessário reconhecer as limitações operacionais da técnica de vitrificação. A necessidade de um treinamento rigoroso, além de acurada habilidade técnica, mais o tempo necessário para manipular cada embrião imediatamente antes da transferência, são circunstâncias peculiares que restringem a utilização mais ampla deste método de criopreservação.

Para sanar tais limitações, no capítulo 2, embriões bovinos foram criopreservados pela técnica de transferência direta. Embora a transferência direta venha sendo utilizada há muitos anos e com excelentes resultados em embriões produzidos *in vivo*, no caso daqueles produzidos *in vitro*, apenas um trabalho obteve prenhez utilizando embriões FIV com transferência direta, ainda que o número de embriões transferidos tenha sido pequeno (Ríha et al., 2002).

Ambas as técnicas de criopreservação, associadas aos embriões transferidos a fresco, permitiriam a otimização dos programas de transferência em larga escala por viabilizarem o aporte de embriões suficientes para a demanda de fêmeas receptoras. No caso da transferência direta, acrescenta-se a facilidade no momento da transferência dos embriões, pois esta técnica não requer alta especialização para a descongelação dos embriões. Além disso, é a técnica preconizada pelos órgãos de fiscalização sanitária, facilitando programas de exportação de embriões, particularmente de genética *Bos indicus*, mercado em grande expansão no momento.

O objetivo do presente trabalho é demonstrar a viabilidade do uso de embriões PIV congelados por vitrificação ou transferência direta, na rotina comercial de grandes fazendas e em projetos de larga escala.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Importância da Criopreservação na Produção *In Vitro* de Embriões

Principalmente no Brasil, existe uma crescente demanda por melhoramento genético, o qual ocorre de modo mais eficiente e rápido quando é utilizada a PIV de embriões. Nos últimos 15 anos, as biotécnicas de embriões de mamíferos apresentaram grande progresso científico, especialmente na espécie bovina (Hasler, 2014) e no caso da PIV, o Brasil é o que mais produz embriões no mundo (Viana et al., 2012).

A criopreservação é essencial para difundir o uso de embriões nesta crescente indústria. Para isso, é necessário otimizar sistemas que produzam taxas estáveis e maior sobrevivência embrionária pós congelamento, comparáveis aos embriões transferidos a fresco (Engelmann, 2011). Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de se remover o máximo possível de água do interior das células, antes de realizar a sua congelamento. Se esta desidratação não ocorrer corretamente, cristais de gelo se formam dentro da célula, lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (Seidel Jr., 1986).

2.2. Diferenças entre embriões produzidos *In vivo* e *In Vitro*

Segundo POLLARD and LEIBO (1993), os embriões PIV são diferentes daqueles produzidos *in vivo* e mais sensíveis ao resfriamento e congelamento, principalmente devido à proporção de lipídeos e proteínas nestes dois tipos de embriões. No mesmo trabalho, foi observado também que os embriões PIV tem maior permeabilidade ao EG, menor densidade e maior susceptibilidade da zona pelúcida à ação da pronase.

Outros autores também relataram maior quantidade de vacúolos, menor número de células totais e maior fragilidade da zona pelúcida nos embriões PIV, quando comparados aos produzidos *in vivo* (Crosier et al., 2001).

A influência do lipídeo intracelular na congelação dos embriões bovinos PIV foi demonstrada a partir da extração destes componentes por meio da centrifugação de zigotos com Citocalasina B, que produziram mórulas compactas contendo diferentes níveis de lipídeos intracelulares. Os resultados indicaram que os lipídeos são parcialmente responsáveis pelo aumento da sensibilidade à congelação, uma vez que o grupo com baixo lipídeo teve uma taxa de sobrevivência 33% maior que o grupo controle após o congelamento (Leibo *et al.*, 1995).

2.3. Uso do Soro Fetal Bovino no cultivo *in vitro* dos embriões e sua influência na criotolerância dos embriões

Pesquisadores demonstraram que componentes do meio de cultivo, principalmente o soro fetal bovino (SFB), exercem influência sobre a morfologia e aparência citoplasmática do embrião PIV, o qual aparenta ser mais escuro (Barceló-Fimbres & Seidel Jr., 2007). A quantidade de lipídeo intracelular também pode ser influenciada pelo meio de cultivo dos oócitos e embriões. A presença de soro fetal bovino no meio de cultivo é tido como responsável pelo excessivo acúmulo de lipídeos, seja pelo maior aporte de lipídeos fornecido pelo meio, seja por distúrbios no metabolismo mitocondrial (Abe *et al.*, 2002a). Neste sentido, alguns estudos compararam diferentes composições dos meios de cultivo e sua correlação com a criotolerância dos embriões PIV (Salzano *et al.*, 2014; Sanches *et al.*, 2013; Mucci *et al.*, 2006; Sommerfeld and Niemann, 1999).

Além de serem mais sensíveis à criopreservação (Camargo *et al.*, 2011), os embriões PIV, quando transferidos para o útero das receptoras, darão origem a menores taxas de prenhez, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (Farin and Farin, 1995). Algumas diferenças encontradas em embriões PIV, tais como: blastômeros aumentados, citoplasma mais escuro e uma menor densidade podem interferir na criotolerância destes embriões (Leibo e Loskutoff, 1993; Rizo *et al.*, 2003). Essas diferenças estão principalmente associados com o aumento do teor de lipídios citoplasmática (Horvath & Seidel Jr., 2006; Seidel, 2006; Pereira *et al.*, 2007;. Lapa *et al.*, 2011).

O aumento do acúmulo de lipídeos parece estar associado à utilização de soro fetal de bovino (SFB) ao meio de cultivo. O uso de SFB no meio tem sido controverso, com seus efeitos positivos e negativos sendo relatados. Vários estudos têm demonstrado o aumento na taxa de blastocisto, quando SFB foi adicionado ao meio de cultivo (Rizo et al., 2003; Leivas et al., 2011). Além disso, Leivas et al. (2011) relataram aumento de 10% nas taxas de blastocisto entre embriões PIV de bovinos *Bos indicus* cultivados com 2% de SFB quando comparados aos embriões cultivados apenas com a Albumina Sérica Bovina (BSA).

Embriões de origem *Bos taurus* deram taxas de blastocisto semelhantes quando cultivados com ou sem SFB, sugerindo que possa existir benefício do SFB apenas nas raças *indicus* (Leivas et al., 2011). Por esta razão, muitos laboratórios na América do Sul, onde a maioria dos animais são de origem *Bos indicus*, ainda utilizam SFB no cultivo dos embriões PIV.

No entanto, os embriões cultivados em meio suplementado com SFB contém maiores concentrações de gotas lipídicas intracitoplasmáticas que embriões cultivados na ausência de SFB (Abe et al., 2002). Além disso, Ferreira et al. (2010) demonstraram grandes diferenças na composição de lipídeos de embriões cultivados com e sem SFB. A relação entre as gotículas de lipídeos acumulados no embrião e a sua menor capacidade para sobreviver à criopreservação foi claramente demonstrada (Leibo e Loskutoff, 1993; Diez et al., 2001; Abe et al., 2002; Lonergan et al., 2003; Rizo et al., 2003).

Por estas razões, foram estudadas alternativas ao uso do SFB no cultivo embrionário. Fontes alternativas de proteína tais como o ácido graxo livre, o BSA, álcool polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP) e substituições de soro sintético, como KnockOut® (Gibco – Grand Island/NY) têm demonstrado serem capazes de suportar o desenvolvimento embrionário bovino (Moore et al., 2007; Mingoti et al., 2011; Ordoñez-Leon et al., 2014). Além disso, os embriões cultivados na ausência de SFB têm maior criotolerância (Leibo e Loskutoff, 1993; Abe et al., 2002; Rizo et al., 2003; Seidel, 2006).

2.4. Diferentes Métodos para Criopreservação de Embriões Bovinos

O desenvolvimento de métodos efetivos para a criopreservação de embriões (Wilmut & Rowson, 1973; Leibo, 1984) tornaram a transferência de embriões mais eficiente e menos dependente de receptoras disponíveis. No início dos anos 80, o crioprotetor mais utilizado era o Glicerol (GLY) e sua diluição pós descongelação foi simplificada com a adição de sacarose à solução de descongelação (Leibo, 1984). Desta maneira foi desenvolvida a técnica conhecida como “one step™”, a partir da utilização de crioprotetores convencionais (DMSO ou 1.5 Molar de glicerol) em embriões produzidos *in vivo*. Após a descongelação e homogeneização das diferentes colunas da palheta, o embrião era deixado por um período de 5 a 20 minutos em uma temperatura de 20° a 37° C antes de ser transferido para a receptora. As taxas de prenhez variaram de 25 a 45% (Leibo, 1984; Leibo, 1986).

Ainda em 1984, outro método de transferência direta foi apresentado (Massip and Van der Zwalmen, 1984) que, por sua vez, propuseram o uso de uma solução de congelação composta por 1.4 Molar de glicerol e 0.25 Molar de sacarose, onde os embriões congelados nesta solução também poderiam ser transferidos diretamente para as receptoras, sem a necessidade de remover o crioprotetor.

Porém, era preciso encontrar outro crioprotetor que fosse mais permeável às células embrionárias. Neste sentido, SZÉLL et al. (1989) publicaram um estudo mostrando as características osmóticas das células embrionárias de bovinos e ovinos, quando expostas ao Glicerol (2M), propileno glicol (2 M) ou Etileno Glicol (2M). Trabalhando com embriões *in vivo*, os autores mostraram que mórulas e blastocistos bovinos são mais permeáveis ao Etileno Glicol que ao Glicerol.

Alguns anos depois, foram obtidas as primeiras gestações provenientes da transferência de embriões *in vivo* criopreservados com 1.5 Molar de EG e transferidos diretamente para as receptoras (Voelkel and Hu, 1992).

Todas as técnicas supracitadas que utilizaram a congelação e posterior transferência direta dos embriões tinham como principal objetivo facilitar o uso de embriões congelados, dispensando a necessidade de ter instalações laboratoriais para realizar a descongelação dos embriões e otimização do manejo das receptoras. Como se trata de um procedimento bastante rápido, no caso de fazendas leiteiras, a descongelação e transferência são realizadas sem alterar a rotina das propriedades, além de dispensar treinamentos e equipe especializada.

Esta técnica também facilita o comércio, uma vez que permite maior distribuição de embriões PIV (Voelkel and Hu, 1992a).

Atualmente, os dois métodos mais utilizados são a congelação lenta e a vitrificação (Mapletoft, 2013). No caso da congelação lenta, são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores, os quais estão associados à toxicidade do processo e ao choque osmótico sofrido pelas células. No caso da vitrificação, o processo é ultrarrápido, o que reduz os danos à célula causados pela formação dos cristais de gelo (Hasler, 2014).

Conceitualmente, a vitrificação é a solidificação de uma solução feita não por cristalização, mas por extrema elevação na viscosidade durante o resfriamento. A alta osmolaridade da solução de vitrificação faz com que a maior parte da água presente dentro das células embrionárias saia rapidamente, deixando-as suficientemente desidratadas e permeáveis ao crioprotetor, suportando a imersão direta no nitrogênio líquido (-196 °C). A rápida imersão no nitrogênio líquido imediatamente solidifica as células, fazendo com que a água intracelular remanescente não tenha tempo de formar cristais de gelo (Vajta et al., 1998). A associação da vitrificação com a não formação de cristais de gelo e ao uso do Etileno Glicol, que tem maior permeabilidade à membrana da célula, diminuem os efeitos tóxico e osmótico do processo.

Uma das maneiras de fazer com que o embrião passe mais rapidamente pela zona crítica de temperatura, aumentando a taxa de resfriamento, é usar o menor volume possível de meio crioprotetor circundando o embrião, estabelecendo um contato direto entre a solução e o nitrogênio líquido (Vajta & Nagy, 2006). Com esse objetivo, inúmeras ferramentas têm sido desenvolvidas baseadas na “open-pulled straw” (OPS) descrita por Vajta et al. (1998), que reduz o diâmetro de uma palheta convencional de 0,25 mL para diminuir o volume de solução envolvendo o embrião e, portanto, aumentar a velocidade de congelação.

A vitrificação representa uma alternativa rápida e econômica para a criopreservação de embriões PIV (Massip, 2001). Contudo, a necessidade de se fazer dois ou três banhos em soluções decrescentes de concentração osmótica durante o reaquecimento dos embriões, ainda limita as condições de sua utilização a campo.

Um diferencial entre a vitrificação e a congelação lenta é a concentração de crioprotetores utilizada, a qual é mais elevada na vitrificação. Apesar disso, a maior velocidade de congelação permite que esta técnica tenha uma melhor taxa de re-expansão dos embriões quando descongelados e colocados em cultivo (Kolibianakis et al., 2009; Nedambale et al., 2004).

2.5. Agentes crioprotetores

O mecanismo de ação dos crioprotetores funciona principalmente abaixando do ponto de solidificação da solução na congelação (Seidel Jr., 1986). Isto é benéfico por várias razões, mas principalmente porque promove um maior tempo para a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares. Uma segunda função dos crioprotetores parece ser sua interação com a membrana celular, exercendo uma ação estabilizadora durante as mudanças de um estado relativamente líquido para um estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido na descongelação (Woods et al., 2004)

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a congelação e descongelação, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. Segundo Menezo (2004), durante a criopreservação, todos os embriões sofrem consideráveis danos morfológicos e funcionais, cuja extensão depende de fatores como o tamanho e a forma das células do embrião, a permeabilidade das membranas, além da qualidade e sensibilidade dos embriões aos agentes crioprotetores (Vajta & Kuwayama, 2006).

Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: primeiro, a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (Fahy, 1986). Segundo, os agentes crioprotetores podem ter uma ação direta na produção de crioinjúrias, como por exemplo, alterando a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (Arnold et al., 1983).

Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores, os quais são divididos em duas categorias: i)

intracelulares, como dimetilsulfóxido (DMSO), propanediol, glicerol e etileno glicol) e extracelulares, como trealose, glicose, sacarose e polivinilpirrolidona (PVP) (Niemann, 1991). Essas duas classes de crioprotetores são usadas separadamente ou associadas para diferentes protocolos de criopreservação (Im et al., 1997; Young et al., 1998; Shirazi et al., 2010).

De modo geral, se os embriões descongelados forem colocados diretamente em uma solução isosmótica tornar-se-ão túrgidos, pois o influxo de água para o citoplasma é mais fácil que a saída do crioprotetor do citoplasma (Dochi et al, 1995). As células embrionárias serão vulneráveis às injúrias osmóticas devido à expansão excessiva caso forem congeladas com crioprotetores de baixa permeabilidade como o glicerol ou Propileno Glicol (PG) e também forem diretamente alojadas em um meio isotônico após a descongelação.

Desta forma, os danos podem ser reduzidos se os embriões forem congelados com um crioprotetor de alta permeabilidade. Há também relatos de que a adição de 20% de SFB ao meio de criopreservação de oócitos de camundongos pode prevenir o endurecimento da zona pelúcida, minimizando os efeitos tóxicos dos crioprotetores (George et al., 1995).

Os crioprotetores mais utilizados até meados de 1990 foram o Glicerol, DMSO e Propileno Glicol (Massip, 2001). No entanto, o EG foi descrito como o mais eficiente dos crioprotetores oferecendo considerável proteção contra o dano durante a congelação e descongelação, enquanto que o grau de proteção dos outros glicóis foi relativamente baixo (Miyamoto & Ishibashi, 1978). Desde então, o etileno glicol tem sido utilizado em diversos protocolos para a criopreservação de oócitos e embriões em várias espécies, devido principalmente ao seu baixo peso molecular quando comparado a outros crioprotetores, proporcionando rápida entrada e saída na célula durante o período de equilíbrio e reidratação (Voelkel e Hu, 1992).

Trabalhos posteriores corroboram com tal descoberta, demonstrando que o EG, quando comparado ao Glicerol, obteve taxa de redução de volume embrionário de 55% vs. 80%, além da re-expansão da blastocle em 10 minutos vs. 30 minutos (Martinez et al., 2002b). Outros pesquisadores relataram ainda que o EG a 1,5 Molar, em substituição ao Glicerol, possibilitou excluir os passos de reidratação dos embriões, necessários antes da utilização da transferência direta (Voelkel e Hu,

1992). A sacarose continuou sendo utilizada como um tampão osmótico para remover o crioprotetor, neste caso, mantendo o embrião dentro da mesma palheta, para a transferência direta dos embriões.

Na diluição passo a passo, a sacarose é amplamente utilizada, auxiliando o EG a reduzir a expansão celular durante o processo de retirada do crioprotetor (Martinez et al., 2002a). A necessidade da sacarose (0,1M) como tampão osmótico para o glicerol (0,7M) foi comprovada por TOMINAGA et al, (2007), para a transferência direta, tanto em embriões íntegros como em embriões biopsados e submetidos ao congelamento lento. Esta técnica utiliza crioprotetor convencional e colunas distintas contendo sacarose e Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS). Na descongelação, a coluna do embrião se mistura com a sacarose, mas não com o holding e incuba por 10 a 20 minutos a 37°C. Por usar menor concentração de sacarose, parece ser menos tóxica ao embrião. No entanto, a inadequada mistura das colunas pode gerar resultados variáveis, mas as taxas de prenhez chegaram a 45% (Voelkel and Hu, 1992b).

Diversos protocolos de vitrificação e transferência direta foram testados por Campos-Chillon et al (2006) a partir de embriões PIV, usando como agente osmótico a galactose. A galactose possui também propriedades de conservar a integridade funcional e estrutural da membrana celular. Este açúcar possui uma menor viscosidade comparado aos outros, o que facilitaria a sua diluição na palheta.

2.6. Uso do Forskolin para Diminuir o Teor Lipídico dos Embriões

O conceito de que lipídeos interferem negativamente no sucesso da criopreservação de embriões foi inicialmente demonstrado em suínos (Nagashima et al., 1994) e posteriormente em bovinos (Diez et al., 2001), que melhoraram a congelabilidade dos embriões promovendo a “delipidação” do embrião realizando a remoção, via micro-manipulação, das gotas citoplasmáticas de lipídeo. Neste trabalho, os autores centrifugaram os embriões em altas rotações para reunir as gotas lipídicas em um dos polos do citoplasma e removê-las com a ajuda de uma micropipeta. Outra maneira de diminuir o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos

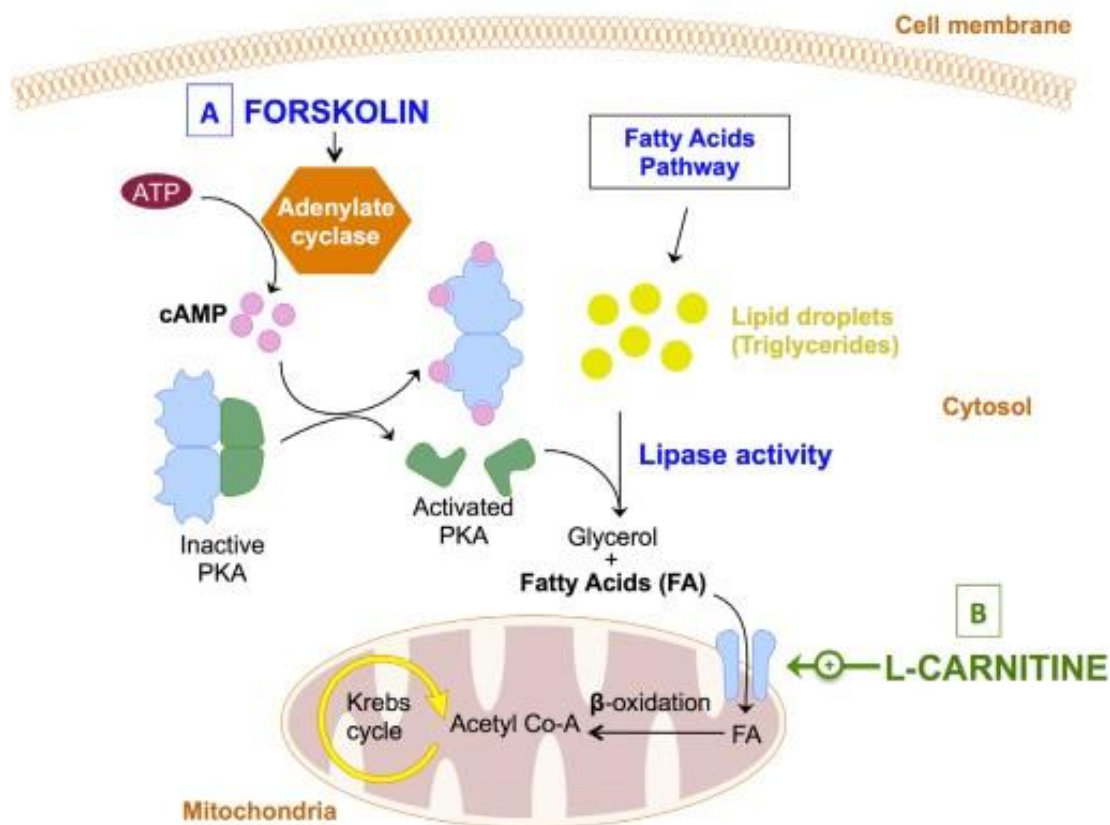
envolve a “delipidação” parcial por estímulo da lipólise química no citoplasma celular, técnica também descrita em suínos (Men et al., 2006).

Reguladores do metabolismo de ácidos graxos também foram testados (Sudano et al., 2011; De La Torre-Sanchez et al., 2006a; De La Torre-Sanchez et al., 2006b) no intuito de melhorar a congelabilidade dos embriões cultivados em meios contendo tais reguladores, diminuindo assim a formação de gotas lipídicas no citoplasma celular e a taxa de apoptose nos embriões avaliados no dia 7 do cultivo.

A maior parte do lipídeo intracelular dos oócitos e embriões são compostos por triacilgliceróis (TAG) (Diez et al., 2001). A principal função dos TAG armazenados no citoplasma é servir como fonte de energia. O metabolismo intracelular dos lipídeos é regulado por hormônios como as catecolaminas, glucagon e insulina. Porém, algumas drogas como norepinefrina, isoproterenol e forskolin (7 β -acetoxi-8,13-epoxi-1 α , 6 β , 9 α -trihidroxi-labd-14-ene-11-one) também são capazes de estimular a lipólise dos TAG (Figura 1). Em condições fisiológicas normais, a lipase ativada catalisa a hidrólise dos TAG em glicerol e ácidos graxos livres (Holm, 2003).

O forskolin é uma substância derivada da planta indiana *Coleus forskohlii* e Men et al. (2006) observaram o aumento da atividade lipolítica em blastocistos de suínos, cultivados na presença de forskolin, mensurando a produção de glicerol no meio de cultivo dos embriões. Estes autores demonstraram que os embriões cultivados com forskolin apresentaram maiores taxas de re-expansão da blastocelule, após vitrificados e descongelados, em comparação com o grupo não tratado.

Figura 1 – Mecanismo de ação do forskolin, um potente ativador da adenilato ciclase, que estimula a atividade da lipase atuando no ciclo da Proteína Kinase/ cAMP.



Fonte: Adaptado de Sudano et al., 2013

Além disso, a adição de Forskolin ao meio de cultivo dos embriões PIV reduziu a quantidade de lipídeos intracitoplasmática e aumentou a sobrevivência embrionária pós congelação (Men et al., 2006; Paschoal et al., 2012).

REFERÊNCIAS

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

ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRIS, H.K. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochem Biophys Acta*, 1983, v. 782, p. 121-128.

ASBIA – INDEX ASBIA 2013. Importação, exportação e comercialização de semen. 2013

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JR., G.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulphate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, New York, 2007, v. 74(11), p. 1395-1405.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J. Dairy Sci.* 2010, v. 93, 5234.

CAMARGO, L.S.; BOITE, M.C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G.B.; SERAPIAO, R.V.; AS, W.F.; VIANA, J.H.; NOGUEIRA, L.A. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology*, 2011, v. 63, p. 256–62.

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

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E. FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reproduction*, 2001, v.64, p.1375-1385.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; GARDNER, D.K.; PRIEIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL JR, G.E. Metabolic regulation of in vitro bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod Fertil Develop*, 2006a, v. 18, p. 597-607.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; PRIEIS, K.; SEIDEL JR, G.E. Metabolic regulation of *in vitro* bovine embryos. I. Effect of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reprod Fertil Develop*, 2006b, v. 18, p. 585-596.

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

DOCHI, O.; IMAI, K.; TAKAKURA, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim Reprod Science*, 1995, v. 38, p. 179-185.

EMBRAPA. 2013. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Produção, Industrialização e Comercialização. Brasília.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. *Methods Mol Biol*. 2011, v. 710, p. 155–184

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 1986, v. 23, p. 1-13.

FARIN, P.W.; Farin, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. *Biol Reprod*, 1995, v. 52, p. 676–682.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; CATHARINO, R.R.; GARCIA, J.S.; GOZZO, F.C.; SANVIDO, G.B.; SANTOS, L.F.; LO TURCO, E.G.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; BERTOLLA, R.P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V.; SANGALLI, J.R.; EBERLIN, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J. Lipid Res.*, 2010, v. 51, p. 1218–1227.

GEORGE, M.A.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 1995, v. 32, p. 139-156.

HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 2014, v. 81, p. 152–169

HOLM, C. Molecular mechanisms of regulating hormone-sensitivity lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, 2003, v. 31, p. 1120-1224.

HORVATH, G. & SEIDEL, Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology*, 2006, v.66, p. 1026–1033.

IM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 1997, v. 47, p. 881-891.

KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; TARLATZIS, B.C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009, v. 21, p. 270–274.

LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.; BESSA, R.J.; PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reprod. Domestic. Anim.* 2011, v. 46, p. 904–910.

LEIBO, S.P. One-step method for direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, Stoneham, 1984, v. 21, p. 767-790.

LEIBO, S.P. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, Stoneham, 1986, v. 25, p. 166. Abstract

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

LEIBO, S.P.; POLLARD, J.W.; MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of reassembled *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1995, v. 43, p. 265

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; FIALHO, S.S.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.; SILVA, C.A. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, 2011, v. 75, p. 429-433.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAÍN, A.; MOREIRA, M.B.; PINTADO B.; DE LA FUENTE, J. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod*, 2003, v. 69, p. 1424–1431.

LOPES, B.C.; MATARIM, D.L.; FRANÇA, M.G.B.; MIZIARA, M.N.; LOPES, P.A.; FRANCO, T. Genética bovina brasileira: mercado internacional e mapeamento das competências e tecnologias mineiras. Uberaba, MG: Edição de Beatriz Cordenonsi Lopes, 2012, p. 110.

MAPLETOFT, R.J. History and perspectives on bovine embryo transfer *Anim. Reprod*, 2013, v. 10, n. 3, p. 168-173.

MARTINEZ, A.G.; BROGLIATTI, G.M.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology*, 2002b, v. 58, p. 963–972.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI G. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim. Reprod. Sci.* 2002a, v. 73, p. 11-21.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals, Germany*, 2001, v. 36, p. 49-55.

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*, Stoneham, 2006, v. 66, p. 2008-2016.

MENEZO, Y. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. v. 1135, p. 528-532, 2004.

MINGOTI, G.Z.; CASTRO, V.S.; MÉO, S.C.; SÁ BARRETTO, L.S.; GARCIA, J.M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2011, v. 47, p. 361-367.

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J Reprod Fertil*, 1978, v. 54, p. 427-432.

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

MORATÓ, R.; MOGAS, T. New device for the vitrification and in-straw warming of *in vitro* produced bovine embryos. *Cryobiology*. 2014, v.68, p. 288–293.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2006, v. 65, p. 1551-1562

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; SEAMARK, R.F.; NOTTLE, M.B. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of Reproduction*, Champaign, 1994, v. 51, p. 618-622.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2004, v. 62, p. 437–449.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 1991, v. 35, p. 109-124.

ORDOÑEZ-LEON, E.A.; MERCHANT, H.; MEDRANO, A.; KJELLAND, M.; ROMO, S. Lipid droplet analysis using *in vitro* bovine oocytes and embryos. *Reprod Domest Anim*. 2014, v. 49, p. 306-314.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; DIAS MAZIERO, R.R.; CROCOMO, L.F.; OÑA MAGALHÃES, L.C.; SILVA RASCADO, T.; MARTINS, A.; LANDIM-ALVARENGA, F.D. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zigote*, 2012, v. 18, p. 1-12.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.; SILVA, J.C.; PEREIRA, M.S.; MARQUES, C.C. Cryosurvival of

bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim. Reprod. Sci.* 2007, v. 98, p. 293–301.

PERRY, G. IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report. 2013, v.31, p. 24-45

PERRY, G. IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report. 2014, v.32, p. 14-24

POLLARD, J.W.; LEIBO, S. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, 1993, v. 39, p. 287.

RIZOS, D.; GUTIE´RREZ-ADA´N, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003, v. 68, p. 236–243.

SALZANO, A.; ALBEROA, G.; ZULLOA, G.; NEGLIAA G.; ABDEL-WAHABB, A.; BIFULCOA, G.; ZICARELLIA, L.; GASPARRINIA B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Animal Reproduction Science*, 2014, In Press

SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.R.; FILHO, B.D.O.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; MEIRINHOS, M.L.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*. 2013, v. 80, p. 372–377

SEIDEL Jr., E.G. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short Course proceedings. Presented by Animal Reproduction Laboratory, Colorado State university, Fort Collins, Colorado, USA: 6, 1986.

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

SHIRAZI, A.; SOLEIMANI, M.; KARIMI, M.; NAZARI, H.; AHMADI, E.; HEIDAR, B. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*. 2010, v. 60, p. 204–210.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, San Diego, 1999, v. 38(2), p. 95-105.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 2011, v. 75, p.1211-1220.

TOMINAGA, K.; IWAKI, F.; HOCHI, S. Conventional freezing of in vitro produced and biopsied bovine blastocysts in the presence of a low concentration of glycerol and sucrose. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, v. 53, n. 2,

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, New York, 1998, v. 51, p. 53-58.

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

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine*, 2006, v. 12, n. 6, p. 779-796.

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

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

VOEKEL, A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 1992a, v.37, p. 23-37.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 1992b, v. 37, p. 687–697.

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

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

YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E.; VAN THILLO, G.; TIVERON, G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. *Fertil Steril Suppl*, 1998, v. 70, p. 516.

3. HIPÓTESES

3.1. Forskolin atua como agente lipolítico e melhora a sobrevivência embrionária pós congelamento/ descongelamento de embriões PIV

3.2. Embriões cultivados na presença de Forskolin resultam em maior taxa de concepção, em comparação àqueles cultivados em meio sem Forskolin

3.3. Na transferência de embriões PIV frescos, aqueles cultivados na ausência de soro fetal bovino são de melhor qualidade, resultando em maiores índices de concepção quando comparados àqueles cultivados em meio suplementado com soro fetal bovino.

3.4. Embriões congelados pelo método de transferência direta resultam em taxas de concepção semelhantes às obtidas na transferência de embriões PIV vitrificados

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade do uso de embriões produzidos *in vitro* e criopreservados por vitrificação ou congelamento lento, para obtenção de prenhez em larga escala.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Avaliar a taxa de eclosão e a taxa de concepção de embriões *indicus* PIV, quando cultivados na presença ou ausência do Forskolin

4.2.2. . Avaliar a taxa de concepção de embriões PIV quando cultivados na presença ou ausência de soro fetal bovino e transferidos a fresco para o útero das receptoras

4.2.3. Comparar as taxas de concepção aos 30 e 60 dias de gestação de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou transferência direta

4.2.4. Avaliar a viabilidade técnica do uso em larga escala, na rotina comercial de grandes fazendas, de embriões PIV congelados por transferência direta

CAPITULO 1

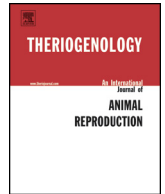


ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification

B.V. Sanches^a, L.S.R. Marinho^b, B.D.O. Filho^c, J.H.F. Pontes^a, A.C. Basso^a, M.L.G. Meirinhos^c, K.C. Silva-Santos^b, C.R. Ferreira^d, M.M. Seneda^{b,*}

^a In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, Brazil

^c Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^d Aston Labs, Department of Chemistry, Purdue University, Indiana, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2012

Received in revised form 19 March 2013

Accepted 10 April 2013

Keywords:

Embryo

Forskolin

IVF

Cryopreservation

Zebu

ABSTRACT

In vitro-produced (IVP) bovine embryos are more sensitive to cryopreservation than their *in vivo* counterparts due to their higher lipid concentrations, whereas *Bos indicus* IVP embryos are even more sensitive than *Bos taurus* IVP embryos. To examine the effects of a lipolytic agent, before vitrification of *Bos indicus* IVP embryos, on embryo survival, viability, and pregnancy rates, two experiments were conducted. In experiment 1, *Bos indicus* (Nelore) embryos were produced from abattoir-derived ovaries and allocated into two groups. In the treatment group, 10 μ M of forskolin was added to the *in vitro* culture medium on Day 5 and incubated for 48 hours. On Day 7 of culture, IVP-expanded blastocysts from both the control ($n = 101$) and treatment ($n = 112$) groups were vitrified with ethylene glycol and DMSO via the Cryotop procedure. Although there was no significant difference between the rates of blastocoele reexpansion and hatching of the embryos exposed to forskolin (87.5% and 70.5%, respectively) compared with the control embryos (79.2% and 63.3%, respectively), the numerically superior rates of the embryos exposed to forskolin led to another experiment. In experiment 2, blastocysts produced from the ovum pick up were exposed or not exposed to the lipolytic agent and vitrified as in experiment 1. Embryos treated with forskolin had higher pregnancy rates than the control group (48.8% vs. 18.5%). In view of these results, 1908 *Bos indicus* embryos were produced from ovum pick up, exposed to the lipolytic agent, and blastocysts were transferred to recipients, and the pregnancy rates of the embryos of various breeds were compared. The mean pregnancy rate obtained was 43.2%. All data were analyzed by chi-square or by binary logistic regression ($P \leq 0.05$). In conclusion, treatment with forskolin before vitrification improved cryotolerance of *Bos indicus* IVP embryos, resulting in good post-transfer pregnancy rates.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Bos indicus accounts for the majority of Brazilian cattle herds, thereby contributing to this country's place at the forefront of *in vitro* embryo production (IVEP) [1]. However,

the availability of recipients is typically less than needed (more embryos are produced than are implanted). Thus, considerable effort has been invested in the development of an efficient protocol for bovine embryo cryopreservation. Low rates of pregnancy after warming are associated with low numbers of embryos that are produced *in vitro* and subjected to cryopreservation worldwide [2]. The main problems include the lack of consistency in results [3] and

* Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 4064; fax: +55 43 3371 4063.
E-mail address: mseneda@uel.br (M.M. Seneda).

differences in the survival and developmental rates after warming across species, developmental stages, and quality of embryos [4].

Most cryopreservation methods are based on two factors, the use of cryoprotectants and cooling rate [5]. Vitrification is a widely used method [6]. The minimal-volume approach of the Cryotop method increases the rates of cooling, and especially warming (up to 40,000 °C/minute), which may contribute to consistent, improved survival rates and improved rates of development, both *in vitro* and *in vivo*. Cryotop technology has been successfully used for cryopreservation of oocytes from various species [7,8] and *in vitro* fertilization (IVF)-derived embryos [9], reconstructed embryos with somatic cell nuclei [10], blastocysts produced by parthenogenic activation, or somatic cell nuclear transfer from delipidated *in vitro*-matured oocytes [10] and embryos been derived from intracytoplasmic sperm injection [11].

Vitrification is the most efficient cryopreservation method for embryos produced *in vitro* [6], which are more sensitive to cryoinjuries than their *in vivo* counterparts [12] because they contain more intracellular lipid droplets [13]. In addition, sensitivity of *Bos indicus* IVP embryos is higher than that of *Bos taurus* embryos [14]. The extent of cryoinjury is dependent on the size and shape of the embryonic cells, as well as on membrane permeability and quality and sensitivity of the embryos [5]. Triacylglycerols make up most of the intracellular lipids of embryos [15], and lipolysis can be induced by lipolytic agents, such as norepinephrine, dibutyl cAMP, isoproterenol, forskolin, and theophylline [16,17]. The diterpene forskolin, which is derived from the roots of *Coleus forskohlii* [17], is used to induce chemical delipidation of IVP-derived embryos [18,19].

Data concerning the effect of forskolin on *Bos indicus* IVP embryos are scarce, and the effect of forskolin on pregnancy rates of cryopreserved IVP bovine embryos is currently unknown. Addition of forskolin to culture medium of *Bos indicus* IVP embryos before vitrification could improve survival rates, providing satisfactory pregnancy rates after the transfer of these embryos.

The aim of this study was to evaluate the effect of forskolin added during *in vitro* embryo culture on cryosurvival by assessing the rates of blastocoel reexpansion and hatching after vitrification of *Bos indicus* IVP embryos; in addition, its effect on pregnancy rates following embryo transfer was assessed and compared among zebu breeds.

2. Materials and methods

All chemicals used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

2.1. Experimental design

In experiment 1, conducted in two replications, the blastocysts produced from abattoir-derived ovaries were cultured until Day 7 (fertilization = Day 0) when they were vitrified and rewarmed at the expanded blastocyst stage by the Cryotop procedure. On Day 5, the embryos were separated into two groups, those that were exposed and

not exposed to 10 μM forskolin (7β-acetoxy-8,13-epoxy-1α,6β,9α-trihydroxyabd-14-en-11-one, C₂₂H₃₄O₇) for 48 hours before vitrification. Following rewarming, the blastocysts were cultured for 24 hours to assess cryosurvival. Embryos that survived vitrification were cultured for an additional 48 hours to assess hatching ability. For both the assessments, nonvitrified fresh blastocysts were used as controls.

In experiment 2, embryos produced from ovum pick up were cultured with or without exposure to forskolin, as in experiment 1. Embryos were transferred at the blastocyst stage to female recipients (two replications) and the pregnancy rates were compared. Results indicating the forskolin-induced embryo survival after vitrification led to the production of 1908 *Bos indicus* embryos after ovum pick up, all of them exposed to forskolin and vitrified. These embryos were transferred to recipients, and the pregnancy rates obtained from the embryos of various breeds were compared.

2.2. Oocyte recovery

2.2.1. *In vitro*

Abattoir-derived ovaries from Nelore cows were collected at a local abattoir stored in saline solution at 25 °C to 30 °C and transported to the laboratory within 25 minutes after slaughter. Briefly, each follicle was punctured with a disposable 19-gauge 1/2" hypodermic needle (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brazil) connected to a 20-mL syringe.

2.2.2. *In vivo*

Follicular aspiration was performed as described [20,21]. Briefly, each visible follicle ≥2 mm in diameter was aspirated using a real-time B-mode ultrasound scanner (Scanner 200 Vet, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands), a 7.5-MHz convex array transducer fitted into the intravaginal device (Pie Medical), and a stainless steel guide. Follicular puncture was performed using a disposable 19 gauge × 12 mm hypodermic needle (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brazil) connected to a 50-mL conical tube (Corning, Acton, MA, USA) via a silicon tube (0.8 m long; 2 mm internal diameter). Aspiration was performed using a vacuum pump (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) with a negative pressure of 10 to 12 mL of water/minute. The collection medium was TCM-199 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), supplemented with 25 mM HEPES (Sigma H-0763), 5% fetal calf serum (FCS), 50 μL/mL gentamycin sulfate (Schering-Plough, São Paulo, SP, Brazil), and 10,000 IU/L sodium heparin (Sigma H-3149).

2.3. *In vitro* maturation

Oocytes with at least three layers of compact cumulus cells were classified as grade 1 [20] and were matured for 24 hours in 100 μL drops of TCM-199 (Gibco Life Technologies) that were supplemented with 10% FCS (Gibco Life Technologies), 1 μg/mL FSH (Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 50 μg/mL hCG (Profasi, Serono, São Paulo, SP, Brazil), 1 μg/mL estradiol (estradiol-17β), 0.2 mM sodium pyruvate, and 83.4 μg/mL amikacin

(Instituto Bioquímico, Rio de Janeiro, Brazil) under mineral oil (D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brazil) at 39 °C and 5% atmospheric CO₂ (25–30 oocytes per microdrop). Before *in vitro* maturation, cumulus oocyte complexes were washed three times in TCM-199 HEPES that was supplemented with 10% FCS, 0.20 mM sodium pyruvate, and 83.4 µg/mL amikacin.

2.4. IVF and *in vitro* culture

Freeze-thawed sperm (2×10^7 /dose) from sires of known fertility (based on previous utilization for IVF) were used. Straws were thawed for 30 seconds in a 35 °C water bath. Sperm were washed twice by centrifugation at $200 \times g$ for 5 minutes in 2 mL TALP medium that was supplemented with 10 mM HEPES (Gibco Life Technologies), 0.2 mM sodium pyruvate, and 83.4 g/mL amikacin. Sperm were capacitated using heparin, and motility was stimulated by the addition of penicillamine, hypotaurine, and epinephrine.

After visual assessment of motility, the sperm concentration was adjusted to 25×10^6 motile sperm/mL, and each fertilization drop containing 90 µL TALP-IVF medium that was supplemented with 10 g/mL heparin, 18 M penicillamine, 10 M hypotaurine, and 8 M epinephrine received 4 µL of sperm (final concentration of 1×10^5 sperm per drop) [20]. After maturation, the cumulus oocyte complexes were washed three times in TCM-199 prefertilization medium that was supplemented with 25 mM HEPES and 0.3% BSA and washed once in TALP fertilization medium that was supplemented with 10 µg/mL heparin and 160 µL of penicillamine, hypotaurine, and epinephrine solution [22,23].

Presumptive zygotes had their cumulus cells removed and were transferred to 100 µL drops of embryo culture medium (SOFaa BSA containing 0.5% BSA and 2.5% FCS) under the same temperature and gaseous atmospheric conditions that were used for IVF. After 3 days (D3) and 5 days (D5) of culture, 50% of the culture medium was replaced with fresh medium (feeding) from a stock of the same medium that was used at the beginning of the culture. The cleavage and blastocyst production rates were recorded at D3 and D7 of culture, respectively.

2.5. Vitrification and warming

In experiment 1, embryos cultured with ($n = 112$) or without ($n = 101$) 10 µM forskolin were subjected to Cryotop vitrification, as described [24]. Expanded blastocysts of excellent quality were equilibrated with 10% ethylene glycol (WakoPure Chemical Industries Co., Osaka, Japan) and 10% DMSO (WakoPure Chemical Industries Co.) in TCM-HEPES base medium (TCM-199, 25 mM HEPES that was supplemented with 20% FCS) for 1 minute at room temperature. Then, the embryos were transferred into a vitrification solution consisting of 20% ethylene glycol, 20% DMSO, and 0.5 M sucrose in the base medium and incubated for 20 seconds at room temperature. During this incubation, blastocysts were loaded onto the top of the polypropylene strip of a Cryotop (three to five embryos; Kitazato BioPharma Co., Shizuoka, Japan) with a minimal amount of vitrification solution. They were then quickly immersed in liquid nitrogen (N₂). As a control, randomly

selected fresh embryos ($n = 96$) were evaluated at D7, D8, and D9 of culturing. In experiment 2, embryos were vitrified using the same protocol.

2.6. Postwarming assays

After storage for >2 hours in liquid N₂, blastocysts were exposed to air for 4 seconds, warmed by immersing the polypropylene strip of a Cryotop into the base medium (TCM-HEPES and sucrose) at ~35 °C and then held for 1 minute. Then, the blastocysts were transferred to the base medium at room temperature in a stepwise manner (0.3 and 0.15 M sucrose for 5 minutes each) [25,26]. In experiment 1, the blastocysts were cultured in 100 µL drops of SOF medium containing 2.5% FCS and 0.5% BSA under mineral oil at 39 °C and 5% atmospheric CO₂. Cryosurvival was assessed by reexpansion of the blastocoel after 24 hours of culturing. Thereafter, the surviving embryos and the corresponding fresh control D9 embryos were randomly assigned to further 48-hour cultures to determine their abilities to hatch. Embryos with more than half of their embryonic cells emerging from the zona pellucida were defined as hatched. In experiment 2, the embryos were transferred to recipients after warming.

2.7. Protocol for embryo transfer

In experiment 2, all vitrified embryos were transferred to Nelore and Nelore crossbred recipients after warming. A fixed-time embryo transfer protocol was used to ensure recipient estrus synchrony. Each recipient received an intravaginal progesterone implant (CIDR, Pfizer, Hamilton, New Zealand) and 2 mg of estradiol benzoate (Estrogin, Farmavet, São Paulo, SP, Brazil) on Day 0. The progesterone implants were removed on Day 8, at which time the animals were given 300 IU of eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina), 150 µg of D-cloprostenol (Preloban, Intervet, São Paulo, SP, Brazil), and 1 mg of estradiol cypionate (Pfizer, Guarulhos, SP, Brazil). No detection of estrus was performed; Day 10 was considered the day of estrus. One embryo was transferred per recipient on Day 17. Before embryo transfer, each recipient was subjected to a transrectal ovarian examination (Aloka SSD 500, 5 MHz linear transducer, Tokyo, Japan) to confirm the presence and size of CLs. Only recipients with a CL ≥ 13 mm received an embryo. Pregnancy status was determined by ultrasonography on Day 30.

2.8. Statistical analyses

Cleavage, blastocyst, and pregnancy rates were compared between forskolin and control groups by a binary logistic regression model in a two-factorial design (treatment and replicate). Pregnancy rates were compared between different breeds by the chi-square test. For all analyses, $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

In experiment 1, there were no differences in blastocyst rates across groups ($P > 0.05$). Out of the 314 IVF-derived

Table 1Cryosurvival and hatching abilities of IVP *Bos indicus* blastocysts after treatment with or without forskolin for 48 hours in culture.

Treatment	Oocytes, no.	Cleavage rate, no. (%)	Blastocyst rate, no. (%)	Reexpanded blastocysts 24 h, no. (%)	Hatched blastocysts 48 h, no. (%)
No forskolin vitrification	348	253 (72.7)	139 (39.9)	80 (79.2) ^a	64 (63.3) ^b
10 μ M forskolin vitrification	314	247 (78.8)	142 (45.3)	98 (87.5) ^a	79 (70.5) ^b
Nonvitrified (fresh) control	331	241 (72.7)	132 (39.9)	-	82 (85.4) ^a

^{a,b} Within a column, rates without a common superscript differed ($P \leq 0.05$).

zygotes cultured with forskolin, 247 (78.8%) cleaved on Day 3, whereas 142 (45.3%) developed to expanded blastocysts on Day 7. Out of the 348 IVF-derived zygotes cultured without forskolin, 253 (72.7%) cleaved on Day 3 and 139 (39.9%) developed to expanded blastocysts on Day 7 (Table 1).

There were no differences between the rates of blastocoeel reexpansion and hatching of the embryos exposed to forskolin (87.5% and 70.5%, respectively) compared with embryos that were not treated with the lipolytic agent before vitrification (79.2% and 63.3%, respectively). Hatching rates of both groups were still lower ($P < 0.05$) than those in the fresh control embryos (85.4%; Table 1).

In experiment 2, the average cleavage rate was 78% and the average blastocyst rate was 42%. Pregnancy rates were higher for the embryos that were exposed to forskolin (48.8%) than for the embryos that were not (18.5%; Table 2). After transfer of the 1908 vitrified-warmed embryos that had been treated with forskolin, pregnancy rates were not different ($P > 0.05$) among various zebu breeds (rates varied from 40.3% to 45.5%, with an average rate of 43.2%; Table 3).

4. Discussion

To our knowledge, this was the first study to report pregnancy rates from vitrified *Bos indicus* embryos treated with a stimulator of lipolysis. Herein, we report that exchanging genetic material for research or commercial purposes was possible with the use of the lipolytic agent forskolin before embryo vitrification using the Cryotop procedure. These data should be of great interest to the embryo industry, as reasonable pregnancy rates were obtained following cryopreservation of IVP zebu embryos.

There is a scarcity of literature regarding the pregnancy rates of *Bos indicus* IVP embryos, and even less information describing cryopreserved embryos. Our mean pregnancy rate with forskolin (43.2%) seemed much higher than those that had been reported by Block et al. [27] (27.7%) and Stewart et al. [28] (25.7%) with vitrified IVP Holstein and Holstein and Jersey embryos, respectively. It was also higher than that obtained by Dochi et al. [29] with frozen IVP Holstein embryos (29.5%). Interestingly, the pregnancy rates that were obtained in this study are very similar to or even higher than those obtained by our team after transfer of fresh IVP *Bos indicus* embryos (33.5% [30] and 36.57% [31] with Nelore cattle and 37% to 40% with Holstein, Gir, and Holstein-Gir crossbred females [32]). It is important to emphasize that achievement of such encouraging pregnancy rates requires only cryopreservation of embryos of excellent quality.

Few studies have reported the use of forskolin for chemical delipidation of *Bos indicus* embryos before cryopreservation and its effect on cryosurvival of vitrified embryos. In a recent study [33], rates of blastocoeel reexpansion in IVP Nelore-sired expanded blastocysts that had been cultured with or without 10 μ M forskolin (81.09% vs. 75.07%) did not differ from rates of expansion of *in vivo*-derived Nelore embryos (86.40%). Although those rates are similar to our results (87.5% vs. 79.2%), the duration of exposure to forskolin was different (12 vs. 48 hours of culture). Additionally, in agreement with our study, there was no significant improvement in reexpansion rates after cryopreservation after exposure to forskolin. Similarly, Pryor et al. [19] reported no differences between *Bos indicus* embryos that had been cultured with or without forskolin in terms of survival to freezing (59.4% vs. 49.0%) and blastocyst hatching rates (29.1% vs. 48.5%) when forskolin was added on Day 6 of culture. In a study by Paschoal et al. [34], forskolin was also added on Day 6; it did not improve reexpansion rates after vitrification, but apparently reduced the number of damaged cells after cryopreservation when serum was used. In the present study, the addition of 10 μ M forskolin on D5 of culture, which was 48 hours before vitrification, did not significantly improve rates of blastocoeel reexpansion and hatching (89.5% vs. 79.2% and 70.5% vs. 63.3%, respectively). Nevertheless, numerically superior rates obtained with this treatment encouraged us to investigate the effects of exposure to forskolin before vitrification on pregnancy rates of IVP Nelore-sired embryos.

There were no significant differences in blastocyst rates for embryos that were treated with forskolin (45.3%) compared with those that were observed in the vitrified control embryos (39.9%). These results were in accordance with the study by Paschoal et al. [33], who reported blastocyst rates of 46.3% versus 46.8% for Nelore-sired IVP embryos that were cultured with or without forskolin before vitrification. Paschoal et al. [34] also reported no differences between blastocyst rates of embryos that were cultured with (46.3% with FCS and 34.2% with no serum) or without forskolin (46.8% with FCS and 33.3% with no serum).

Table 2Pregnancy rates of IVP *Bos indicus* embryos after treatment with or without forskolin for 48 hours in culture before vitrification.

Treatment	Transferred embryos (no.)	Pregnancies (no.)	Pregnancy rate (%)
Control	65	12	18.5 ^b
Forskolin	80	39	48.8 ^a

^{a,b} Within a column, rates without a common superscript differed ($P \leq 0.05$).

Table 3

Pregnancy rates of IVP *Bos indicus* embryos treated with forskolin for 48 hours in culture and submitted to vitrification.

Breed	Transferred embryos (no.)	Pregnancies (no.)	Pregnancy rate (%)
<i>Taurus-indicus</i>	87	37	42.5
Gir	701	314	44.8
Guzera	680	274	40.3
Nelore	440	200	45.5
Total	1908	825	43.2

No effect ($P > 0.05$) of breed on pregnancy rate.

Bos indicus IVP embryos have higher levels of intracellular lipids than those of *Bos taurus*, which increases their sensitivities to conventional freezing methods [14]. The use of lipolytic agents is a noninvasive approach to achieve the metabolic reduction of intracellular lipids, high levels of which are largely responsible for the exceptional sensitivity of these cells to cryopreservation. Lipolytic agents act on various components of the lipolytic signal transduction pathway, stimulating hydrolysis of intracellular lipids. Forskolin stimulates lipolysis by directly activating adenylate cyclase, increasing the levels of cAMP and activating lipases [35–37]. In porcine embryos, forskolin was responsible for reported reduction in levels of intracellular lipids [18]. In bovine IVP embryos, however, controversial effects were observed, whereas forskolin was able to decrease cellular lipid concentrations [38] or not [39]. Nevertheless, it is possible that forskolin may induce effects on the embryonic cells that are still unknown. By increasing cAMP concentrations, it might alter embryo metabolism or gene expression, leading to altered development. Although embryos and the offspring seemed normal, the effects of forskolin on metabolism and development were not thoroughly investigated in this study.

There are other substances that seem capable of decreasing embryo lipid concentrations, but their effects have not been well established. Pereira et al. [40,41] reported that the addition of an isomer of conjugated linoleic acid (CLA) to culture media decreased lipid concentrations and increased cryotolerance of IVP bovine embryos. However, no pregnancy rates were reported. The t10, c12 CLA seemed to act mainly by reducing the uptake and synthesis of fatty acids [42,43]. Conversely, Darwich et al. [44], reported no improvement in cryopreserved embryo survival after addition of t10, c12 CLA.

This is apparently the first report of pregnancy rates from IVP bovine embryos that were vitrified after treatment with forskolin. This represents great progress in IVEP, enabling the commercial use of the technique. Until recently, surplus embryos obtained after embryo production programs have been discarded because there was no protocol allowing for reasonable pregnancy rates after cryopreservation of these embryos.

The optimal pregnancy rates that were obtained after the use of forskolin and vitrification with the Cryotop method may simplify transport of embryos over long distances, the exportation of embryos, and the conservation of species by storing genetic material. Additionally, the surplus embryos that are obtained from IVEP programs can now be stored for subsequent use during strategic periods.

In conclusion, adding forskolin before vitrification of IVP-derived embryos improved *Bos indicus* embryo cryotolerance, resulting in optimal pregnancy rates after transfer of cryopreserved *Bos indicus* IVP embryos.

Acknowledgment

The authors thank *In Vitro* Brasil Ltda and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- [1] Stroud B. IETS 2011 statistics and data retrieval committee report: the year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Trans Newslett* 2011;29:1–23.
- [2] Viana JHM, Camargo LSA. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario. *Acta Sci Vet* 2007;35:915–24.
- [3] Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 2006;86:20–6.
- [4] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007;67:73–80.
- [5] Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;65:236–44.
- [6] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53–8.
- [7] Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M, Walker S. Effect of cysteamine on survival of bovine and ovine oocytes vitrified using the minimum volume cooling (MVC) Cryotop method. *Reprod Fertil Dev* 2006;18:158. [Abstract].
- [8] Fu XW, Wu GQ, Li JJ, Hou YP, Zhou GB, Suo L, et al. Positive effects of forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of *in vitro* matured porcine oocytes. *Theriogenology* 2011;75:268–75.
- [9] Kelly JM, Kleemann DO, Kuwayama M, Walker SK. Vitrification of *in vitro*-produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling Cryotop method. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:172–3.
- [10] Du Y, Li J, Kragh PM, Zhang Y, Schmidt M, Bøgh IG, et al. Piglets born from vitrified cloned blastocysts produced with a simplified method of delipidation and nuclear transfer. *Cloning Stem Cells* 2007;9:469–76.
- [11] Keskinetepe L, Brackett BG. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2000;53:1041–52.
- [12] Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994;41:101–6.
- [13] Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos develops in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev* 2002;61:57–66.
- [14] Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicácio AC, Assumpção MEOA. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 2002;57:345–59.
- [15] Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology* 2001;55:923–36.
- [16] Holm C. Molecular mechanisms of regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1120–4.
- [17] Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3363–7.
- [18] Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 2006;66:2008–16.
- [19] Pryor JH, Trant JA, Ponchiroli-Schneider CB, Looney CR, Long CR, Forrest DW. The use of forskolin and its effect on *in vitro*-produced brahman-sired embryos submitted to slow cool freezing or vitrification. *Reprod Fertil Dev* 2009;22:214 [abstract].

- [20] Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Vantini R, Oliveira JA. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Anim Reprod Sci* 2001;67:37–43.
- [21] Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Andrade ER, Binelli M, Oliveira JA, et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 2003;59:1435–40.
- [22] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfriedge-Ruthledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600.
- [23] Bavister BD. A consistently successful procedure for *in vitro* fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res* 1989;23:139–58.
- [24] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed* 2005;11:300–8.
- [25] Vieira AD, Mezzalira A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* 2001;45:91–4.
- [26] Mezzalira A, Mezzalira JC, Moraes AN, Thaler Neto A, Vieira AD, Barreta MH, et al. Vitrification of bovine IVP embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. *Arch Vet Sci* 2004;9:107–11.
- [27] Block J, Bonilla L, Hansen PJ. Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci* 2010;93:5234–42.
- [28] Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, et al. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. *J Dairy Sci* 2011;94:3437–45.
- [29] Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M, Yamamoto Y, et al. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology* 2008;69:124–8.
- [30] Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 2009;71:690–7.
- [31] Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 2011;75:1640–6.
- [32] Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010;74:1349–55.
- [33] Paschoal DM, Sudano MJ, Rascado TS, Magalhães LCO, Crocorno LF, Lima-Neto JF, et al. Comparison between *in vivo* and *in vitro* produced embryos with forskolin after vitrification. *Reprod Fertil Dev* 2010;23:147 [abstract].
- [34] Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias RR, Crocorno LF, Magalhães LCO, et al. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote* 2012;18:1–12.
- [35] Honnor RC, Dhillon GS, Londos C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. II. Definition of steady-state relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. *J Biol Chem* 1985;260:15130–8.
- [36] Stralfors P, Belfrage P. Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1983;258:15146–52.
- [37] Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailers DC, Levin DM, Kimmel AR, et al. On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann NY Acad Sci* 1999;892:155–68.
- [38] Barcelo-Fimbres M, Seidel GE. Effects of lipolytic agents forskolin, epinephrine and caffeine on embryonic development and lipid content of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 2008;21:154–5 [abstract].
- [39] Pryor JH, Trant JA, Ponchiroli-Schneider CB, Looney CR, Long CR, Forrest DW. The effect of forskolin on *in vitro* produced brahman-sired bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 2008;21:163 [abstract].
- [40] Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, Portugal PV, Bessa RJB, et al. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Anim Reprod Sci* 2007;98:293–301.
- [41] Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10, cis12* conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. *Anim Reprod Sci* 2008;106:322–32.
- [42] Loor JJ, Herbein JH. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. *J Nutr* 1998;128:2411–9.
- [43] Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 2001;40:283–98.
- [44] Darwich AA, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, et al. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;93:30–6.

CAPÍTULO 2

Comparação das taxas de concepção após transferência de embriões *in vitro* frescos, vitrificados ou criopreservados após transferência direta

RESUMO

Embora taxas de concepção acima de 30% tenham sido alcançadas recentemente na transferência (TE) de embriões produzidos *in vitro* (PIV) e vitrificados, o complexo processo de reaquecimento destes embriões após a vitrificação continua a representar um obstáculo ao uso comercial desta técnica, com pouca aplicabilidade em condições de campo. O objetivo deste trabalho foi comparar as taxas de concepção obtidas após a TE de embriões bovinos PIV frescos, vitrificados ou congelados para transferência direta. Oócitos (n=3171) recuperados por OPU de fêmeas Girolando foram selecionados e submetidos à MIV por 24 h a 38,5 °C, com 5% CO₂ em ar e umidade saturada. A FIV foi realizada com sêmen sexado descongelado de 5 touros Holandeses. Após FIV, os prováveis zigotos foram desnudados e cultivados por sete dias nas mesmas condições de temperatura e umidade da MIV e da FIV, porém com 5% de CO₂ e 5% de O₂. Embriões grau I nos estágios de BL ou BX foram transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta (TD). Os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas. As taxas de concepção obtidas foram de 51.35% (133/259) nos embriões transferidos a fresco, de 34.62% (84/234) nos vitrificados e de 42.11% (96/228) nos embriões da transferência direta. O nível de probabilidade de $p < 0.05$ foi considerado significativo. Os índices obtidos com os embriões PIV vitrificados e com os da transferência direta indicam que a criopreservação dos embriões PIV proporciona resultados semelhantes aos obtidos após a transferência de embriões PIV frescos. Destacamos os aspectos positivos da possibilidade de criopreservação de embriões PIV com a praticidade da transferência direta.

Palavras Chave: Embriões FIV, Prenhez, Bovinos, Transferência Direta

ABSTRACT

Although over 30% of conception rates have recently been achieved in the embryo transfer (ET) of vitrified *in vitro* produced (IVP) embryos, the complex process of recovery of these embryos after vitrification remains an obstacle to commercial use of this technique, little applicability under field conditions. The aim of this study was to compare pregnancy rates obtained after ET of fresh IVP bovine embryos, vitrified or frozen for direct transfer. Oocytes (n=3171) recovered by OPU Girolando females were selected and submitted to IVM for 24 hours at 38.5°C with 5% CO₂ in air and saturated humidity. The IVF was performed with sexed semen thawed from 5 Holstein bulls. After IVF, the presumptive zygotes were denuded and cultured for seven days under the same conditions of temperature and humidity of IVM and IVF, but with 5% CO₂ and 5% O₂. Grade I embryos in stages of BL or BX were transferred to fresh, frozen or vitrified for direct transfer (TD). The embryos were transferred to previously synchronized recipients. The conception rates obtained were 51.35% (133/259) in the embryos transferred in fresh, 34.62% (84/234) in vitrified ones and 42.11% (96/228) in the direct transfer embryos. The probability level of $p < 0.05$ was considered significant. The rates obtained from the IVP embryos vitrified and direct transfer indicate that the cryopreservation of IVP embryos yields results similar to those obtained after transfer of IVP fresh embryos. We highlight the positive aspects of the possibility of cryopreservation of IVP embryos with the convenience of direct transfer.

Key Words: IVF Embryos, Bovine, Pregnancy, Direct Transfer

1. INTRODUÇÃO

O uso de embriões produzidos *in vitro* (PIV) aumentou muito ao longo da última década (Hasler, 2014). Grande parte deste crescimento ocorreu principalmente no Brasil. Em 2013, mais de 393 mil embriões PIV foram transferidos para receptoras, sendo que deste total, 78% foram produzidos na América do Sul. No mesmo ano, do total de transferências realizadas, apenas 8.9% dos embriões PIV eram congelados, sendo que nos embriões *in vivo*, esta proporção foi de 59% (Perry, 2013).

Os embriões PIV são menos resistentes à criopreservação que os embriões *in vivo* e o soro fetal bovino (SFB) adicionado ao meio de cultivo dos embriões pode propiciar o maior acúmulo de lipídeo intracitoplasmático dos embriões (Mucci et al., 2006) e ser um dos responsáveis pela maior sensibilidade dos embriões PIV à congelação.

Atualmente, a técnica de criopreservação mais utilizada para os embriões PIV é a vitrificação (Dode et al., 2013), pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Porém, esta técnica utiliza altas concentrações de crioprotetores e necessita de pessoal capacitado e estrutura laboratorial para o reaquecimento dos embriões antes da transferência (Vajta et al., 1998), restringindo seu uso a campo e em larga escala.

Por outro lado, a congelação lenta dos embriões para posterior transferência direta, apesar de ter um custo operacional pouco maior, permite o uso de baixas concentrações de crioprotetores e, conseqüentemente, menor toxicidade para os embriões (Voelkel and Hu, 1992).

Os objetivos deste trabalho foram: i) comparar as taxas de concepção de embriões PIV transferidos a fresco após serem cultivados na presença ou ausência de SFB; ii) avaliar e comparar as taxas de concepção de embriões PIV, congelados para transferência direta, transferidos a fresco ou vitrificados, em um mesmo rebanho bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Exceto quando mencionado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Os procedimentos de aspiração folicular, maturação *in vitro* e fecundação *in vitro* descritos nos itens 2.1 e 2.2 serviram para os experimentos 1 e 2.

2.1. Obtenção dos oócitos e maturação *in vitro*

O trabalho foi desenvolvido no período de 01/05/2014 a 30/09/2014 com a realização de 112 aspirações foliculares guiadas por ultrassonografia em 36 fêmeas doadoras ½ sangue oriundas do cruzamento das raças Gir e Holandesa.

Após a sessão de aspiração, os oócitos (n=3171) foram lavados em TCM-199 (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Os oócitos foram pré - selecionados e classificados em um laboratório móvel montado na fazenda. Após a seleção dos oócitos, estes foram transportados ao laboratório em um tubo BD Falcon de poliestireno de 5 mL, contendo 400µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, um µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 µg/mL hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) e estradiol (1 µg/mL), 0,20mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina, cobertos por 350 µL de óleo mineral. Os oócitos recuperados foram transportados até o laboratório localizado na cidade de Mogi Mirim/SP e mantidos no mesmo tubo de transporte, com meio de maturação, por 24 horas, contadas a partir do momento da OPU.

2.2. Preparo do sêmen e fecundação *in vitro* (FIV)

A FIV foi realizada com sêmen de touros Holandeses (n=5) sexados de fêmea. O sêmen foi descongelado (35°C por 30 seg) e lavado duas vezes por centrifugação (6000 rpm por 5 min) em 1 mL de meio TALP suplementado com 0,2

mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de HEPES. A concentração do sêmen foi ajustada para 2×10^6 espermatozoides (sptz) móveis/mL. O volume de dez microlitros de sêmen (10^5 sptz) foi adicionado em cada gota de 50 μ L de TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina) sob óleo mineral. Posteriormente, foram adicionados 25 a 30 oócitos em cada gota. O período de incubação foi de 20-24 h em incubadora a 38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima.

2.3. Experimento I - Embriões PIV transferidos a fresco após cultivo na presença ou ausência de Soro Fetal Bovino (SFB)

2.3.1. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões

Oócitos (n=665) foram coletados, por aspiração folicular guiada por ultrassonografia, de doadoras (n=25) da raça Girolando. Estes foram submetidos à fecundação *in vitro* com sêmen sexado de um mesmo touro Holandês, com distribuição aleatória dos oócitos entre os grupos.

- **Grupo Com SFB** - prováveis zigotos (n=303) foram cultivados em gotas de 100 μ L de SOF (WELLS et al., 1999), suplementado com 2,5% de SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“*feeding*”). O meio de cultivo do “*feeding*” foi o mesmo meio utilizado no início do cultivo embrionário.

- **Grupo Sem SFB** - prováveis zigotos (n=362) foram cultivados em gotas de 100 μ L de SOF modificado, sem o uso de SFB e suplementado apenas com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) + 10 μ M de EDTA, sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“*feeding*”). O meio de cultivo do “*feeding*” foi o mesmo meio utilizado no início do cultivo embrionário.

Após 7 dias de cultivo, os embriões do **Grupo com SFB** (n=82) e do **Grupo Sem SFB** (n=88) foram transferidos para vacas receptoras previamente

sincronizadas. As fêmeas utilizadas como receptoras estavam no primeiro terço da lactação.

Para a sincronização das receptoras, foi utilizado o seguinte protocolo:

- Dia zero (D0) - 2mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®) + colocação do implante intravaginal (CIDR®)
- Dia sete (D7) – 5mL de Prostaglandina F2 α (Lutalyse®)
- Dia nove (D9) - Retirada do implante e aplicação de 1 mg de Cipionato de Estradiol (ECP®)
- Dia dezoito (D18) – Transferência dos Embriões

2.4. Experimento II – Comparação das taxas de concepção de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta

2.4.1. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões

Após os procedimentos descritos nos itens 2.1 e 2.2, os prováveis zigotos foram co-cultivados (grupos aleatórios de 25 oócitos por gota) na incubadora (38,5°C com 5% CO₂ em ar e umidade máxima) com células da granulosa. Os embriões destinados para a transferência a fresco ou vitrificação foram cultivados em gotas de 100 μ L de SOF (WELLS et al., 1999), suplementado com 2,5% SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“*feeding*”). O meio de cultivo do “*feeding*” foi o mesmo meio utilizado no início do cultivo embrionário. A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia de cultivo (D3).

Os embriões destinados à congelação para transferência direta, foram cultivados em gotas de 100 μ L de SOF modificado, sem o uso de SFB e suplementado apenas com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) + 10uM de EDTA, sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“*feeding*”). O meio

de cultivo do “feeding” foi o mesmo meio utilizado no início do cultivo embrionário. A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia de cultivo (D3).

Ao final do período de cultivo (D7 do cultivo), os blastocistos expandidos e classificados como grau 1, foram envasados e transferidos a fresco para receptoras previamente sincronizadas.

Na ausência de receptoras disponíveis para todos os embriões produzidos, os excedentes foram vitrificados seguindo o protocolo descrito por Sanches et al. (2013) ou congelados para posterior transferência direta.

2.5. Vitrificação dos embriões

Neste trabalho, os embriões destinados à vitrificação foram criopreservados segundo protocolo descrito previamente por SANCHES et al., 2013.

Brevemente, os embriões (Bx, n=234) foram expostos a 1 min na solução de equilíbrio (SE= 10% de EG) + 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO) e, em seguida, a 20 seg na solução de vitrificação (SV= 20% de EG + 20% de DMSO). Durante os 20 seg de exposição à solução de vitrificação, os embriões foram alojados no Cryotop® (Kitazato – Shizuoka – Japão), de três a cinco embriões por cada Cryotop e imediatamente colocados no nitrogênio líquido. A vitrificação dos embriões foi baseada na técnica Cryotop descrita previamente por Kuwayama et al. (2005). Essa metodologia utiliza o conceito de mínimo volume, onde os embriões são acondicionados em um filme plástico muito fino, acoplado a uma haste de plástico utilizada para facilitar o manuseio. As soluções utilizadas na vitrificação foram preparadas em placa de quatro poços (NUNC S/A, Roskilde, Dinamarca). O meio TCM-Hepes (TCM-199 + 25 mM Hepes + 10% de SFB) serviu de base na preparação das soluções contendo EG e DMSO, sendo que estes foram adicionados apenas no momento do uso. Nos dois grupos, a solução de equilíbrio (SE) foi suplementada com 20% de SFB e à solução de vitrificação (SV) foi acrescentado 0,5 M de sacarose. Primeiramente os embriões foram colocados no meio de manutenção (TCM-Hepes), de onde eram retirados (três a cinco de cada vez) e passados para o poço 1, contendo a SE. Nesta solução os embriões

permaneceram por um minuto e logo após eram transferidos para o poço 2, contendo a SV, onde ficaram expostos durante 20 segundos.

Assim, imediatamente os embriões foram pipetados e alojados sobre o filme plástico na ponta do Cryotop e a amostra foi imersa no nitrogênio líquido.

2.6. Descongelamento dos embriões vitrificados

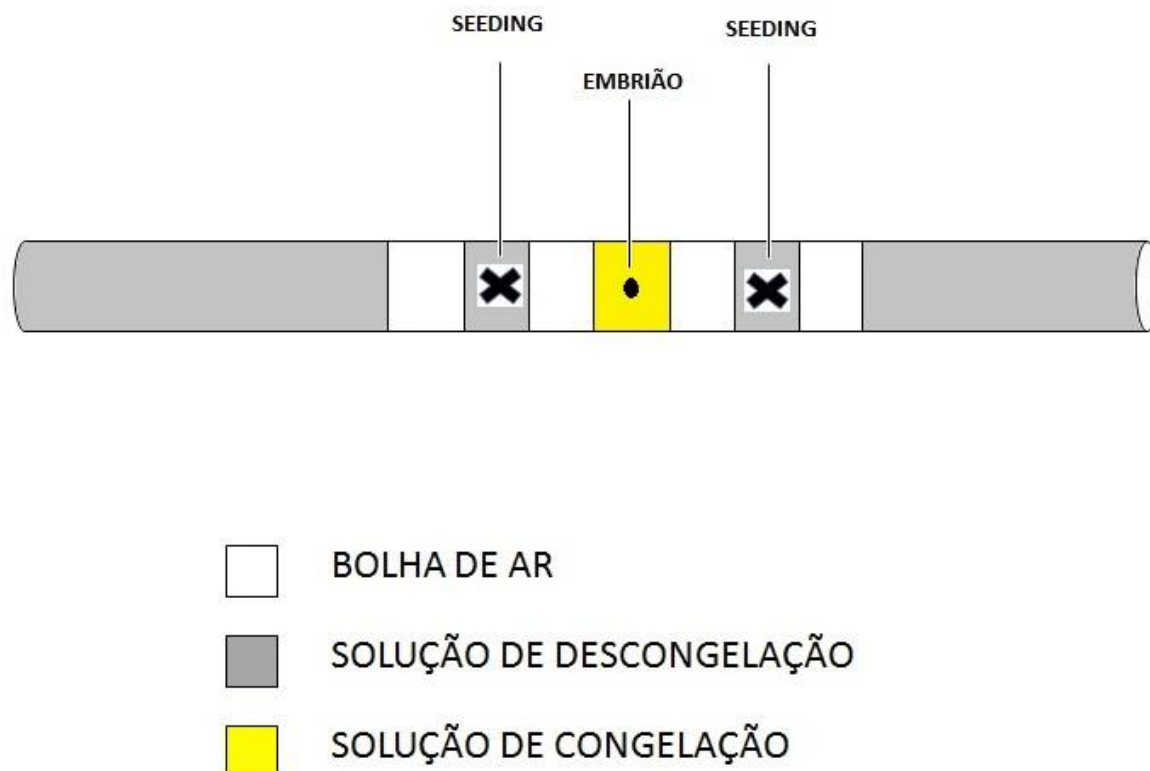
Para o reaquecimento dos embriões vitrificados, os Cryotops contendo os embriões foram expostos ao ar por quatro segundos e em seguida mergulhados na solução de reaquecimento (TCM-Hepes + sacarose 0.3 Molar) com temperatura aproximada de 35°C. A remoção da solução de vitrificação foi feita com dois períodos de exposição (5 minutos cada) em gradientes de 0,3 e 0,15 M de sacarose, respectivamente, antes de passarem para o meio de manutenção TCM-Hepes (Vieira et al., 2002; Mezzalira et al., 2004).

2.7. Congelação lenta dos embriões

No total, os embriões (n=228) foram criopreservados pelo método de congelação lenta previamente descrito para embriões obtidos *in vivo* (Voelkel and Hu, 1992). Blastocistos e blastocistos expandidos foram expostos à solução de congelação (SC), composta por 1,5 M de Etileno Glicol, por 10 minutos. A placa contendo a SC e os embriões permaneceu sobre a mesa aquecida a 35°C durante este período. Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25 mL, sendo que o embrião foi acondicionado em uma coluna central, composta pela solução 1,5 M de Etileno Glicol, cercada por 4 colunas de solução de descongelamento (SD), intercaladas por colunas de ar entre si (Figura 2). A solução de descongelamento (SD) era composta por 0,75 M de EG, ou seja, o EG 1,5 M foi diluído em meio DPBS (Nutricell – Campinas – Brasil) na proporção 1:1. Após serem envasados, os embriões foram acondicionados na máquina de congelação (TK 1000® - Uberaba – Brasil), previamente estabilizada a -6°C. Dois minutos após serem colocados na máquina, foi realizada a cristalização (“seeding”) das colunas imediatamente acima e abaixo da coluna do embrião. Os embriões permaneceram por 10 minutos a -6°C,

quando deu-se início à curva de congelação, abaixando a temperatura em 0,5°C/minuto até atingir o patamar de -32°C. Ao final da curva de congelação, os embriões foram mergulhados diretamente no nitrogênio líquido, onde foram estocados até serem transferidos para as receptoras.

Figura 2 – Esquema de envase dos embriões congelados para a transferência direta



2.8. Descongelação e Transferência Direta

No momento da transferência dos embriões criopreservados para transferência direta, os embriões foram retirados do botijão de nitrogênio líquido, expostos em ar em temperatura ambiente por 10 segundos e em seguida mergulhados em água aquecida a 35°C por 30 segundos. As palhetas foram secas com papel toalha e agitadas delicadamente até que as 5 colunas de meio no interior da palheta fossem misturadas. O objetivo era que as 4 colunas de Solução de Descongelação fossem misturadas com a coluna de Solução de Congelação, para

que a reidratação já iniciasse dentro da palheta. Após misturar as colunas, o embrião foi transferido para o corno uterino da receptora.

As fêmeas utilizadas como receptoras para os embriões frescos, vitrificados ou transferência direta estavam no primeiro terço da lactação.

O protocolo de sincronização foi o mesmo utilizado no experimento 1 do presente artigo.

2.9. Análise Estatística

As taxas de concepção aos 30 e 60 dias foram analisadas pelo Binomial Logistic Regression of IBM SPSS Statistics version 22 (IBM Inc, Armonk, NY), considerando as variáveis protocolo de sincronização, idade das receptoras, categoria animal (lactação ou seca) e touro usado na FIV como sendo de efeitos fixos. O nível de probabilidade de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS

No Experimento 1, foram comparadas as taxas de concepção de embriões cultivados em dois meios de cultivo distintos, suplementados ou não com SFB. Conforme pode-se observar na Tabela 1, não houve diferença ($p < 0.05$) entre os dois grupos analisados.

Tabela 1. Taxa de concepção de embriões transferidos a fresco, cultivados com ou sem SFB

Grupo	Oócitos	Embriões Transferidos	Concepção aos 30 dias (%)	Concepção aos 60 dias (%)
Com SFB 2,5%	303	82	33 (37,5%) ^a	31 (35,23%) ^a
Sem SFB	362	88	38 (46,34%) ^a	30 (36,59%) ^a

^a $p < 0.05$

No Experimento 2, foram comparadas as taxas de concepção aos 30 e 60 dias dos embriões transferidos a fresco, vitrificados ou congelados pelo método de transferência direta (Tabela 2).

Neste caso, houve diferença ($p < 0.05$) entre a taxa de concepção dos embriões transferidos a fresco 51.35% (133/259), quando comparada aos dois grupos com embriões criopreservados. Porém, não houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre as taxas de concepção dos embriões vitrificados 34.62% (84/234) em relação aos embriões da transferência direta 42.11% (96/228)

Tabela 2. Comparação entre as taxas de concepção aos 30 e 60 dias de gestação de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta e a porcentagem de perda gestacional ocorrida nos 3 grupos, no mesmo período.

Embrião	Embriões Transferidos	Concepção aos 30 dias (%)	Concepção aos 60 dias (%)	% Perda (30-60 dias)
Fresco	259	133 (51.4%) ^a	112 (43.2%) ^a	15.8%
Vitrificado	234	84 (34.6%) ^b	73 (31.2%) ^b	9.9%
Transferência Direta	311	125 (40.19%) ^b	108 (34.72%) ^b	13.6%

^{a,b} $p < 0.05$

4. DISCUSSÃO

Apresentamos aqui a comparação das taxas de concepção de embriões PIV transferidos a fresco, vitrificados ou congelados para transferência direta. De acordo com a literatura consultada, este foi o primeiro trabalho do gênero, particularmente quanto ao número consistente de embriões transferidos, em um rebanho *indicus-taurus*.

Dados apresentados por PERRY (2014) referentes ao ano de 2013, mostraram que apenas 8.9% dos embriões PIV transferidos em todo o mundo eram criopreservados. Tal fato se deve à maior sensibilidade destes embriões à criopreservação, aspecto limitante na utilização desta tecnologia para a maioria dos laboratórios comerciais (George, 2008). No entanto, diante do número crescente de embriões PIV produzidos, tornou-se crucial encontrar estratégias adequadas para criopreservação de embriões *in vitro*.

O descarte mundial de mais de 90% dos embriões produzidos *in vitro* (Perry, 2014) reflete uma perda mais ampla, ao se considerar material genético, insumos, materiais e mão de obra. Além disso, a logística com receptoras torna-se mais crítica quando há a obrigatoriedade de só se trabalhar com embriões frescos. Por este conjunto de desvantagens, o descarte dos embriões excedentes aumenta o custo da técnica e a torna menos rentável e competitiva. Segundo PONTES, (2013), a empresa In Vitro Brasil S/A descartou cerca de 25 mil embriões PIV, entre os anos de 2002 a 2008, por não haver neste período um protocolo de criopreservação bem estabelecido.

Além do desafio da criopreservação, constata-se na literatura uma considerável lacuna de técnicas adaptadas aos diferentes tipos raciais da espécie bovina. Sabe-se de várias diferenças reprodutivas entre animais *taurus* e *indicus*. Por exemplo, quanto às características de organelas dos embriões. Trabalhando com embriões *in vivo* VISINTIN et al. (2002) demonstraram haver características específicas entre os embriões *Bos indicus* e *Bos taurus*, principalmente na quantidade de lipídeo intracitoplasmático. Considerando as condições climáticas e geográficas do Brasil, a proposta deste trabalho deu-se a partir de embriões oriundos de um rebanho leiteiro *indicus-taurus*, composto por doadoras da raça Girolando, pois este grau de sangue é responsável por 80% da produção leiteira no país, pela sua boa adaptabilidade para produção de leite a pasto e com menor custo (Girolando, 2015).

O interesse na produção embrionária de fêmeas Girolando tem proporcionado várias publicações nos últimos anos. PONTES et al. (2010) compararam a produção de embriões em aspirações foliculares realizadas em doadoras das raças Holandesa, Gir e Girolando. Neste estudo, observou-se maior

produção de embriões / aspiração em vacas Gir que nas Holandesas (3.2 vs. 2.2, respectivamente). No entanto, a produção de embriões foi maior, em média duas vezes superior, (5.5 blastocistos) na raça Girolando quando comparada à outras duas raças. Com este rendimento superior na PIV de embriões *taurus-indicus*, as perspectivas de investigação sobre métodos de criopreservação embrionária tornaram-se mais promissoras, pela abundância de amostras nos experimentos de viabilidade e obtenção de prenhez.

Os embriões PIV são menos criotolerantes, quando comparados aos embriões *in vivo* (Abe et al., 2002) e as causas desta maior sensibilidade, por várias vezes, foram atribuídas, principalmente, ao maior acúmulo de lipídeos intracelular encontrados no citoplasma dos embriões PIV (Abe et al., 2002; Rizos et al., 2002; Sudano et al., 2011). Neste contexto, o soro fetal bovino (SFB) usado como complemento ao meio de cultivo *in vitro*, foi apontado como responsável pela menor sobrevivência embrionária pós congelação (Diez et al., 2001; Abe et al., 2002; Lonergan et al., 2003). Porém, a maior concentração de gotas lipídicas intracitoplasmáticas não pode ser considerado o único fator prejudicial à criopreservação, sendo um problema de causa multifatorial, envolvendo o controle de qualidade rigorosa em todas as etapas da PIV, no intuito de se obter um embrião com qualidade para ser criopreservado (Sudano et al., 2013).

No experimento 1, foram realizadas aspirações foliculares em um mesmo grupo de doadoras e os embriões foram cultivados na ausência ou presença de SFB no meio de cultivo embrionário. O objetivo era comparar as taxas de concepção dos dois grupos (com ou sem SFB) em embriões transferidos a fresco. Há relatos (George et al., 2008) de uma maior elongação do conceito e disco embrionário mais evidente naqueles embriões PIV cultivados com BSA, quando comparados aos embriões cultivados com SFB. As comparações diretas entre os trabalhos é crítica, pois a maioria dos trabalhos avalia apenas as taxas de re-expansão da blastocèle e taxas de eclosão dos embriões, não chegando a transferir os embriões produzidos nos experimentos. Além disso, são muitas as diferenças entre a composição dos meios e as condições de cultivo em cada um destes estudos. No entanto, em nossas condições experimentais, não houve diferença de prenhez ($P < 0.05$) entre os grupos, o que nos permitiu concluir ser o SFB dispensável no cultivo *in vitro*, considerando um número consistente de gestações.

Além do SFB e das condições de cultivo, há um outro aspecto fundamental a ser considerado: o crioprotetor. Todos os protocolos de criopreservação devem prevenir a formação de cristais de gelo intracelular, além de tentar minimizar o estresse tóxico e osmótico para as células, durante a congelação (Campos-Chillon et al., 2006). Desta forma, muitos dos agentes crioprotetores, tais como glicerol e o etileno glicol (EG) são tóxicos para os embriões (Dochi et al., 1988). Diminuindo o tempo que o embrião é exposto a estes agentes crioprotetores, antes da congelação e após a descongelação, pode-se reduzir os efeitos tóxicos permitindo, portanto, maior viabilidade embrionária pós descongelação (Sommerfield and Niemann, 1999).

No início da década de 1990, Voelkel e Hu (1992) demonstraram que a utilização do EG como crioprotetor poderia ser uma alternativa para a transferência direta de embriões congelados-descongelados, com taxas de concepção ligeiramente menores que as alcançadas com embriões frescos (Voelkel e Hu, 1992; Leibo e Mapletoft, 1998). O método de transferência direta permite que a etapa de reidratação das células embrionárias, após a descongelação, possa ser simplificada tornando, assim, a técnica mais acessível e fácil de ser realizada em campo. Desde então, a transferência direta tem sido amplamente aceita para a congelação de embriões produzidos *in vivo*, colhidos de doadoras superovuladas.

No entanto, para os embriões PIV, o método mais utilizado para congelação de embriões PIV é a vitrificação (Morató and Mogas, 2014), principalmente pela rapidez na congelação e baixo custo. Isto fez a transferência de embriões uma tecnologia muito mais eficiente, não mais dependendo da disponibilidade imediata de receptoras sincronizadas. Seja qual o for o método de congelação, vitrificação ou transferência direta, as taxas de concepção são menores do que as obtidas com embriões frescos (Leibo e Mapletoft, 1998). A desvantagem da vitrificação é a necessidade de um embriologista capacitado para realizar o reaquecimento dos embriões, além da estrutura laboratorial mínima necessária para isto, o que dificulta sua aplicação a campo e em larga escala (Morató and Mogas, 2014).

No presente estudo, utilizamos o protocolo de congelação lenta dos embriões, com o EG a 1,5 Molar como crioprotetor para os embriões. No entanto, em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, observamos que

quando os embriões eram congelados na coluna central de EG a 1.5 Molar e as colunas laterais eram compostas apenas por DPBS, os embriões apresentavam menores taxas de eclosão pós descongelação. A hipótese discutida na ocasião foi a de que os embriões estariam sendo reidratados muito rapidamente, quando em contato direto com o DPBS pós descongelação. Neste sentido, optamos por utilizar neste trabalho uma solução de descongelação composta por EG a 0.75 Molar, dispostas em 4 colunas laterais ao embrião. Desta maneira, o influxo de água nas células embrionárias poderia ocorrer mais lentamente, preservando a sua integridade. Estratégia parecida foi apresentada para congelação de embriões *in vivo*, com utilização de colunas laterais ao embrião, compostas por uma solução chamada de “holding medium”, composta por EG a 0.37 Molar (Voekel and Hu, 1992). No trabalho citado, a taxa de prenhez deste grupo foi a mesma do grupo controle (50%). Apesar de nossas taxas de prenhez terem sido menores, ao redor de 40%, é importante considerar que embriões *in vivo* suportam menor estresse para seu desenvolvimento e sempre proporcionam índices mais altos de gestação. A estratégia adaptada de Voekel & Hu (1992), quanto ao acondicionamento dos embriões *indicus-taurus* produzidos *in vitro*, pode, portanto ser considerada bem-sucedida.

Outro ponto importante observado em nossos estudos prévios foi a menor taxa de sobrevivência embrionária pós congelação, quando foram criopreservados embriões PIV em estágio de mórula compacta, comparada aos embriões classificados como blastocisto e blastocisto expandido. Resultados semelhantes foram encontrados por autores que avaliaram a taxa de eclosão de mórulas e blastocistos, como indicador da sobrevivência embrionária pós criopreservação pelo método lento (Pollard and Leibo, 1993), porém não há consenso sobre qual melhor estágio para criopreservação de embriões (Saragusty and Arav, 2011).

A taxa de concepção aos 30 dias de embriões PIV transferidos a fresco (51.4%) foi superior ($P > 0.05$) às obtidas com os embriões PIV criopreservados por vitrificação (34.6%) e transferência direta (40.19%). Estes resultados foram superiores aos obtidos por LIM et al. (2008), que transferiu embriões PIV cultivados na ausência de SFB e criopreservados por congelação lenta (22.9%) e superiores também aos embriões PIV criopreservados por vitrificação, com a técnica Open Pulled Straw (Vajta et al., 1998). Consideramos que

a combinação de cultivo sem SFB, mais a estratégia de acondicionamento do embrião na palheta podem ser a razão de nosso protocolo ter sido bem-sucedido. A taxa de concepção aos 60 dias de gestação também foi avaliada, sendo superior ($P > 0.05$) nos embriões transferidos a fresco (43.2%), quando comparadas aos vitrificados (31.2%) e transferência direta (34.7%). Nossos resultados foram semelhantes aos publicados por Hasler et al. (1995), que obtiveram taxa de concepção de 42% em embriões PIV *taurus* transferidos no dia 7 pós fecundação.

Admitimos que há um desafio a ser superado, quanto aos índices de morte embrionária precoce, quando se compara prenhez aos 30 e 60 dias. Mas destacamos a praticidade do método de transferência direta, em comparação à vitrificação. Torna-se possível fazer um banco de embriões na propriedade, com maior praticidade no momento da transferência do que a vitrificação. Além disso, é importante considerar que a PIV é o método que permite a mais alta eficiência no uso de sêmen sexado, aspecto crucial na pecuária leiteira. Desta forma, ressalta-se a conquista de avanços na obtenção de prenhez através da criopreservação de embriões PIV.

Concluimos que embriões *indicus-taurus* produzidos *in vitro* podem proporcionar taxas de prenhez ao redor de 40% após criopreservação, pelos métodos de vitrificação ou congelação lenta. Este último método, por permitir a transferência direta, representa um passo importante para a produção *in vitro* de embriões se tornar uma biotécnica de utilização mais ampla na pecuária.

Agradecimentos

Os autores agradecem o empenho e comprometimento dos colaboradores das empresas *In Vitro Brasil S/A* e *Grupo Cabo Verde - Fazenda Santa Luzia*.

5. REFERÊNCIAS

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

CAMPOS-CHILLON, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JR, G.E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, Stoneham, 2006, v. 65, p. 120-1214.

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

DOCHI, O.; YAMAMOTO, Y.; SAGA, H.; YOSHIBA, N.; KANO, N.; MAEDA, J.; MIYATA, K.; YAMAUCHI, A.; TOMINAGA, T.; ODA, Y.; NAKASHIMA, T.; INOHAE, S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 1988, v. 49, p. 1051-1058.

DODE, M..A.N.; LEME, L.O.; SPRICIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras. Reprod. Anim.*, 2013, v.37, p. 145-150.

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

GIROLANDO (site oficial da associação brasileira de criadores de Girolando). Artigo: Girolando – a raça mais versátil do mundo tropical - <http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTNER, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 1995, v. 43, p. 141-152.

IBM SPSS STATISTICS VERSION 22, IBM Inc, Armonk, NY

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Bio-Medicine Online*, 2005, v. 11, p. 300-308.

LEIBO, S.P.; MAPLETOFT, E.R.J. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America. In: Proceedings of the 17th Annual Convention of AETA, 1998. San Antonio, TX, p. 91-98.

LIM, K.T.; LANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PARK, H.J.; KIM, J.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal reproduction Science*, 2008, v. 103, p. 239-248.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAÑ, A.; MOREIRA, M.B.; PINTADO B.; DE LA FUENTE, J. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, 2003, v. 69, p. 1424–1431.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J.C.; MORAES, A.N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A.D.; BARRETA, M.H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. *Archives of Veterinary Science, Curitiba*, 2004, v. 9, n. 2, p. 107-111.

MORATÓ, R. & MOGAS, T. New device for the vitrification and in-straw warming of in-vitro produced bovine embryos. *Cryobiology*, 2014, v.68, p. 288-293.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2006, v. 65, p. 1551-1562

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 2004, v. 62, p. 437–449.

PERRY, G. IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report. 2013, v.31, p. 24-45.

PERRY, G. IETS 2013 Statistics and Data Retrieval Committee Report. 2014, v.32, p. 14-24

PONTES, J.H.F. A história da empresa In Vitro Brasil S/A. *IVB News*, Ed. 01, p. 03

RIHA, J.; MACHATKOVA, M.; PAVLOK, E. A. Viability of fresh and frozen transferred IVP bovine embryos Czech J. Anim. Sci., 2002, v. 47, p. 261–267.

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

SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.R.; FILHO, B.D.O.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; MEIRINHOS, M.L.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*. 2013, v. 80, p. 372–377

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

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 1999, v. 38, p.95-105

STROUD, B. 2012. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer of domestic farm animals. *IETS Newsletter*, 50: 16-25.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; MAZIERO, R.R.D.; RASCADO, T.S.; GUASTALI, M.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, MONTEIRO, B.A.; MARTINS Jr, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Animal Reprod*, 2013, v. 10, p. 160-167.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, v. 51, p. 53–58

VAJTA, G.; MURPHY, C.N.; MACHATY, Z.; PRATHER, R.S.; GREVE, T.; CALLESEN, H. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method. *Vet Rec*, 1999, v.144, p. 180-181

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DASS, J.H.G.; RALL, W.F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, 1997, v. 48, p.1071-1084

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

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

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, Stoneham, 1992, v. 37, p. 23-37.

WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, Champaign, 1999, v. 60, p. 996-1005.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- A adição do agente lipolítico Forskolin ao meio de cultivo dos embriões PIV *Bos indicus* melhora a criotolerância e conseqüente taxa de concepção destes embriões após vitrificados/ reaquecidos e transferidos para as receptoras
- A adição ou não de soro fetal bovino ao meio de cultivo dos embriões PIV não influenciou a taxa de concepção, quando estes embriões foram transferidos a fresco para as receptoras.
- Não houve diferença entre as taxas de concepção aos 30 e 60 dias quando foram transferidos embriões PIV criopreservados por vitrificação ou congelamento lento/ transferência direta
- Embriões congelados lentamente em Etileno Glicol e transferidos diretamente para as receptoras obtiveram taxas de concepção satisfatórias, o que encoraja o uso desta técnica em larga escala em grandes fazendas.