

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(CLÍNICA E REPRODUÇÃO ANIMAL)

VIVIANE LOPES BRAIR

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE E
IMPLANTAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR
DIFERENTES TÉCNICAS**

Niterói, RJ

2020

VIVIANE LOPES BRAIR

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE E
IMPLANTAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR
DIFERENTES TÉCNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientadora:

Profa. Dra. Joanna Maria Gonçalves De Souza Fabjan

Coorientadores:

Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca

Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

Niterói, RJ

2020

Ficha catalográfica automática - SDC/BFV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

B814p Brair, Viviane Lopes
 PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE E
 IMPLANTAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR DIFERENTES
 TÉCNICAS / Viviane Lopes Brair ; Joanna Maria Gonçalves de
 Souza-Fabjan, orientadora ; Jeferson Ferreira da Fonseca,
 Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, coorientadores. Niterói,
 2020.
 65 f. : il.

 Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
 Niterói, 2020.

 DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/MPV-CV.2020.m.05767685703>

 1. Embriões ovinos. 2. Coleta de embriões. 3.
 Criopreservação. 4. Expressão Gênica. 5. Produção
 intelectual. I. Souza-Fabjan, Joanna Maria Gonçalves de,
 orientadora. II. Batista, Ribrio Ivan Tavares Pereira;
 Fonseca, Jeferson Ferreira, coorientadores. III. Universidade
 Federal Fluminense. Faculdade de Veterinária. IV. Título.

CDD -

VIVIANE LOPES BRAIR

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À QUALIDADE E
IMPLANTAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR
DIFERENTES TÉCNICAS**

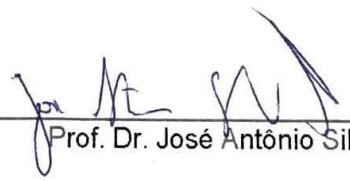
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária da
Universidade Federal Fluminense, como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária. Área de
Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan - UFF
Orientadora



Prof. Dr. José Antônio Silva Ribas - UFF



Dr. Marco Roberto Bourg de Mello - UFRRJ

Niterói, RJ

2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os meus amigos e familiares e aos que contribuíram para a realização desta etapa importante da minha vida, meu mestrado. À minha amada família, principalmente aos meus pais Vania e Brair, minha irmã Silvania e ao meu namorado Rodrigo por me apoiarem em todas as minhas escolhas e decisões. Agradeço imensamente ao amor, carinho, paciência e apoio que vocês sempre me deram.

À minha excelente e amada orientadora, Prof^a. Dr^a Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan. Sempre irei agradecer por você ter entrado na minha vida em agosto de 2015, pois como já te disse na minha graduação você mudou minha vida! Desde então, foi você quem me mostrou a beleza da área de pesquisa e ensino, e continuo aqui seguindo essa área. Agradeço imensamente por acreditar em mim até quando eu não acreditei. Digo isso, pois sei que nem todos os momentos foram fáceis, e nem sempre eu pude dar todo o meu potencial, como queríamos (já fica aqui registrado as minhas desculpas mais sinceras), mas em nenhum momento você deixou de me apoiar, me impulsionar, mesmo tendo que dar algumas broncas, muito obrigada, mesmo! Não sei se você sabe, mas quando visito meus pais eles sempre perguntam sobre você “como está a sua outra mãe Joanna?” ou “ela te adotou mesmo neh filha?”, sempre me falam pra te dar muito valor, pois você gosta muito de mim e me ajuda muito! Somos todos muito gratos a você! Agradeço também por todos os momentos felizes e engraçados, por todas as comemorações de bolsas, cursos, resumos, experimentos, artigos, aprendizado, congressos, projetos aceitos, confraternizações com os amigos, almoços, e tantas outras coisas que aconteceram durante essa trajetória, pelo amor que você sempre irradia, e por fim, pela nossa amizade construída durante esses anos.

Ao meu querido coorientador, e gênio Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, por me ajudar com todas as enormes e diversas dúvidas sobre biologia molecular, por me mandar os áudios mais confusos que com o tempo se tornavam super esclarecedores. Por ter bastante paciência (pois eram muitas dúvidas e muitas perguntas mesmo) e por me motivar e acreditar que eu tenho capacidade e potencial. Serei sempre grata Ribery, e desculpe te perturbar tanto! Sempre que

estiver na faculdade pode ter certeza de que se depender de mim não vai faltar o seu café com canela.

Ao meu segundo coorientador, também muito querido e grande poeta Prof. Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca, por sempre ser bondoso comigo e por ter me alojado tantas vezes na sua casa durante os experimentos. Durante esses períodos eu pude me aproximar mais da sua família também e de cuidar um pouco do JP, vocês são todos maravilhosos, obrigada! E por fim, obrigada por continuar me proporcionando diversas oportunidades de participar dos seus trabalhos que sempre foram muito engrandecedores para mim.

Aos companheiros do GERAD por me proporcionarem muita alegria, e ao mesmo tempo muito conhecimento com discussões de ideias em nossos encontros. E agradeço por me ajudarem com as preparações e treinamento para esse dia. Obrigada por tudo grupo, todos vocês foram especiais para mim. Queria agradecer especialmente à Nathalia Oliveira, pela ajuda e pelas palavras amigas.

Aos pós-graduandos e pós-doutorandos da UFF que tanto me ajudaram durante os meus experimentos. Agradeço principalmente à Dra. Ana Maia e Msc. Lucas Correia por estarem sempre dispostos e me ajudarem na escrita do artigo e da dissertação, e por tirarem muitas dúvidas durante esse caminho. Além disso, queria agradecer à Lucia Prellwitz por ajudar e muito nos experimentos e pelo apoio emocional. Agradeço também ao Cléber de Paula, Marina Netto, Gisele Caldas, e novamente à Dra. Ana Maia que foram importantíssimos para o acontecimento desses experimentos. Por fim, agradeço a todas as amigas que fiz durante o meu mestrado, sempre me ajudando com palavras amigas e palhaçadas (Clara Vieira, Caroline Gomes, Marina Netto, Juliana Dantas e Augusto Ryonosuke).

A todos os professores do setor de Reprodução Animal da UFF por me acompanharem durante essa trajetória, e por estarem sempre dispostos a nos ajudar. Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Felipe Brandão por ter me ajudado com materiais essenciais para a realização de todo o experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo financiamento deste estudo e por me proporcionar a minha bolsa durante o segundo ano do mestrado.

À Embrapa Gado de Leite/ Caprinos e Ovinos pela colaboração com a execução do experimento e análises laboratoriais realizadas neste estudo.

RESUMO

A transferência de embriões frescos em ovinos normalmente resulta em maior taxa de gestação em comparação com os criopreservados, provavelmente por uma falha na comunicação entre o embrião criopreservado e o endométrio durante a pré-implantação e o estabelecimento da gestação. Diante disso, este estudo avaliou o efeito da criopreservação de embriões ovinos (congelamento lento ou vitrificação) na expressão de genes relacionados à diferenciação do trofotoderma (*CDX2*), manutenção de pluripotência (*NANOG*), proliferação celular (*TGFB1*), atividade mitocondrial (*NRF1*) e qualidade (*BAX* e *BCL2*, reguladores de apoptose). Trinta e duas ovelhas foram superovuladas e os embriões foram coletados pela via transcervical. Com embriões de qualidade boa/regular (Grau I e II) foram uniformemente alocados em três grupos: embriões frescos (CONT; n = 15), congelamento lento (CONG; n = 42) ou vitrificação (VIT; n = 43). Após o descongelamento/aquecimento, três pools de cinco blastocistos por grupo foram usados para RT-qPCR; os 55 embriões restantes foram cultivados *in vitro* em meio SOFaa à 38,5 °C e CO₂ a 5% (CONG: n = 27 e VIT: n = 28). A taxa de sobrevivência de CONG e VIT foram, respectivamente, 29,6% (27/8) e 14,2% (28/4) às 24 h; e 48,1% (13/27) e 32,1% (9/28) às 48 h ($P > 0,05$). Somente o gene *CDX2* foi afetado (super expresso, $P < 0,05$) em ambos os grupos em comparação ao CONT. O gene *BAX* foi super expresso na VIT, comparado ao grupo CONG. Na VIT houve aumento ($P < 0,05$) na expressão de todos os genes, exceto o *NANOG* e *NRF1*, quando comparados ao CONT. Em conclusão, embora a sobrevivência *in vitro* tenha sido semelhante entre as técnicas, o VIT aumentou a expressão do gene pró-apoptótico (*BAX*) e as duas técnicas (CONG e VIT) aumentaram a expressão de *CDX2*.

Palavras-chave: congelamento lento, vitrificação, expressão gênica, pré-implantação.

ABSTRACT

Transfer of fresh sheep embryos frequently results in higher pregnancy rate compared to cryopreserved ones, possibly to a failure in the communication between the cryopreserved embryo and the endometrium during pre-implantation and pregnancy establishment. Thus, this study assessed the effect of sheep embryo cryopreservation (slow freezing or vitrification) on expression of genes related to trophectoderm differentiation (*CDX2*), pluripotency maintenance (*NANOG*), cell proliferation (*TGFB1*), mitochondrial activity (*NRF1*) and quality (*BAX* and *BCL2*, apoptosis regulators). Superovulation (n=32 ewes) was performed, and embryos were transcervically collected. One hundred good/regular quality (Grade I and II) embryos were allocated into three groups: fresh embryos (CONT; n=15), slow freezing (SF; n=42) or vitrification (VT; n=43). After thawing/warming, three pools of five blastocysts per group were used for RT-qPCR; the remaining 55 embryos were cultured *in vitro* in SOFaa medium at 38.5 °C and 5% CO₂ (SF: n=27 and VT: n=28). Survival rate of SF and VT were, respectively, 29.6% (8/27) and 14.2% (4/28) at 24 h; and 48.1% (13/27) and 32.1% (9/28) at 48 h ($P > 0.05$). Only the *CDX2* gene was affected (up-regulated, $P < 0.05$) in both groups compared to CONT. The *BAX* gene was upregulated in VT, compared to SF group. The VT increased ($P < 0.05$) the expression of all genes, except for *NANOG* and *NRF1*, when compared to the CONT. In conclusion, although *in vitro* survival was similar between techniques, the VT increased pro-apoptotic gene expression (*BAX*) and both techniques (SF and VT) increased *CDX2* expression.

Keywords: slow freezing, vitrification, gene expression, pre-implantation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p. 16

2 CAPÍTULO I - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 17

2.1 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVINOS, p. 17

2.2 DESENVOLVIMENTO PRÉ IMPLANTACIONAL, p. 18

2.3 GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO, IMPLANTAÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA, p. 20

2.3.1 Marcadores de qualidade embrionária, p. 20

2.3.2 Marcadores do metabolismo e implantação embrionária, p. 21

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO, p. 23

3 OBJETIVOS, p. 27

3.1 OBJETIVO GERAL, p. 27

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 27

4 MATERIAL E MÉTODOS, p. 28

4.1 LOCAL, PERÍODO E ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p. 28

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, p. 28

4.3 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES E COLETA TRANSCERVICAL, p. 29

4.4 CRIOPRESERVAÇÃO, p. 31

4.4.1 Congelação Lenta e Descongelação, p. 31

4.4.2 Vitrificação e Aquecimento, p. 31

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR), p. 32

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 34

5 CAPÍTULO II – ARTIGO SUBMETIDO, p. 35

5.1 ABSTRACT, p. 37

5.2 INTRODUCTION, p. 38

5.3 MATERIAL AND METHODS, p. 40

5.3.1 Ethics, location and experimental conditions, p. 40

5.3.2 Experimental design, p. 40

5.3.3 Embryo recovery and classification, p. 41

5.3.4 Cryopreservation of embryos, p. 41

5.3.4.1 Slow freezing and thawing, p. 41

5.3.4.2 Vitrification and warming, p. 41

5.3.5 RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR amplification,
p. 42

5.3.6 Statistical analysis, p. 44

5.4 RESULTS, p. 44

5.4.1 Thawing, warming and in vitro culture, p. 44

5.4.2 Gene expression, p. 45

5.5 DISCUSSION, p. 46

5.6 ACKNOWLEDGMENTS, p. 48

5.7 REFERENCES, p. 48

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 55

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 56

8 ANEXOS, p. 61

8.1 CERTIFICADO CEUA, p. 61

8.2 RESUMO PREMIADO NA SEMAMBRA, p.62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via de sinalização intrínseca da apoptose, p. 21
(Cap. I)

Figure 1. Gene expression related to trophectoderm differentiation (*CDX2*), pluripotency maintenance (*NANOG*), cell proliferation (*TGFB1*), mitochondrial activity (*NRF1*) and apoptosis (*BAX* and *BCL2*) of fresh sheep blastocysts (Control), and immediately after vitrification/warming or frozen/thawing of blastocysts. Different letters show statistical difference ($P < 0.05$), p. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Primers* utilizados para as análises de RT-qPCR, p. 33
(Cap. I)

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-qPCR analysis, p. 39
(Cap. II)

Table 2. *In vitro* culture survival rate of *in-vivo* derived sheep embryos, cryopreserved by either slow freezing (SF) and vitrification (VT) methods, after thawing and warming, respectively, p. 42
(Cap. II)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
cDNA	DNA complementar
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
CO ₂	Dióxido de carbono
RNase	Ribonuclease
DNase	Desoxirribonuclease
RT-qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase após transcrição reversa
EG	Etilenoglicol
G	Glicerol
S	Sacarose
SB	Solução base
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
IETS	<i>International Embryo Technology Society</i>
NRC	<i>National research council</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
TGFB1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>

<i>NRF1</i>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
<i>NANOG</i>	<i>Nanog homeobox</i>
<i>CDX2</i>	<i>Caudal type homeobox 2</i>
<i>IFN-τ</i>	<i>Interferon-tau</i>
<i>GATA6</i>	<i>GATA binding protein 6</i>
<i>GATA3</i>	<i>GATA binding protein 3</i>
<i>OCT4</i>	<i>Octamer-Binding Protein 4</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
<i>H2AFZ</i>	<i>H2A histone family member Z</i>
OPS	<i>Open pulled straw</i>
VIT	Vitrificação
CONG	Congelação lenta
CONT	Controle
®	Marca registrada
TE	Trofectoderma
MCI	Massa celular interna
Mc	Mórula compacta
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
Bx	Blastocisto expandido
Be	Blastocisto eclodido

μL	Microlitro
mM	Milimolar
M	Molar
min	Minuto
h	Hora
s	Segundos
$^{\circ}\text{C}$	Graus
$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Graus por minuto
Na^{+}	Sódio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
U/ μL	Unidades/microlitro
SOFAa	Meio de cultivo acrescido com aminoácidos
UI	Unidades internacionais
mg/kg	Miligrama por kilo
mg	Miligrama
g	Grama
i.m.	Intramuscular
cm	Centímetros
mL	Mililitros
pFSH	Hormônio folículo estimulante

GI	Grau I
GII	Grau II
GIII	Grau III
GIV	Grau IV
SF	<i>Slow freezing</i>
VT	<i>Vitrification</i>
MOET	<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i>
AI	<i>Artificial Insemination</i>
IVP	<i>In vitro production</i>
IVD	<i>In vivo derivation</i>
NSER	<i>Non-surgical embryo recovery</i>
BS	<i>Base solution</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
ICM	Inner cell mass
SFB	Soro fetal bovino
LN ₂	<i>Liquid nitrogen</i>
NS	<i>Non-significant</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

1 INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes estão em constante crescimento mundial, e possuem um enfático papel, principalmente para as economias dos países em desenvolvimento, e em particular, para aqueles com condições climáticas adversas, ou em terras sub-férteis (VIANA, 2008). A multiplicação dos pequenos ruminantes em todo o mundo teve contribuição de diferentes biotecnologias da reprodução. Dentre elas, uma das que mais contribuiu foi a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE). Esta técnica possibilita a produção de embriões *in vivo*, maximizando o potencial reprodutivo da fêmea (MENCHACA et al., 2009) e abre possibilidades para a utilização da criopreservação dos embriões excedentes, até mesmo para sua comercialização.

Os embriões criopreservados apresentam particularidades quanto à capacidade de desenvolvimento em relação aos embriões frescos, quando transferidos para receptoras (MARTÍNEZ et al., 2006; BETTENCOURT et al., 2009). É conhecido que a criopreservação causa traumas celulares, podendo dificultar o desenvolvimento do conceito e secreção de fatores fundamentais para o reconhecimento materno da gestação. Por isso, a criopreservação pode ser considerada uma das principais causas de morte embrionária, devido ao estresse térmico/osmótico que o embrião sofre no momento da criopreservação (ARAV; SARAGUSTY, 2018). Entretanto, mesmo que a taxa de gestação seja considerada a melhor técnica para determinar a qualidade do embrião, vários aspectos não relacionados diretamente ao embrião, podem afetar o estabelecimento da gestação, como a fisiologia da receptora, endocrinologia, além de fatores ambientais (DISKIN; MORRIS, 2008).

Análises de expressão gênica relacionadas à implantação e qualidade embrionária representam uma importante estratégia para entender o mecanismo pelo qual os diferentes métodos de criopreservação de embriões podem comprometer o estabelecimento da gestação. Alguns genes que controlam o processo de apoptose (*BAX* e *BCL2*), proliferação celular (*TGFB1*), atividade mitocondrial (*NRF1*), manutenção da pluripotência (*NANOG*) e implantação (*CDX2*) podem ser usados como preditores de competência do embrião. Diante disso análise destes genes tornam-se imprescindíveis para maior compreensão dos mecanismos de pré-implantação alterados pela criopreservação.

2 CAPÍTULO I – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM OVINOS

A produção de embriões em pequenos ruminantes normalmente é realizada de duas formas distintas. A produção *in vitro* de embriões é possível após coleta por laparoscopia de oócitos *in vivo* provenientes de ovelhas superestimuladas, ou punção folicular *post-mortem* de ovários de abatedouro, seguida pela maturação dos oócitos, fertilização e cultivo *in vitro* das estruturas até o estágio de blastocisto (HERRICK, 2019). Já a produção *in vivo* de embriões, conhecida como MOTE, é realizada após utilização de protocolos de superovulação, monta natural ou inseminação artificial, e coleta/recuperação dos embriões por via cirúrgica ou transcervical (SANTOS et al., 2018; FIGUEIRA et al., 2019). A técnica transcervical ou não cirúrgica tem sido mais pesquisada para implementar sua utilização por ser uma técnica mais ética que proporciona maior bem-estar animal (FONSECA et al., 2018a).

Diferente dos bovinos, a metodologia de produção de embriões mais comum em pequenos ruminantes, é a *in vivo*. Isso pode ser confirmado com dados relatados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (*International Embryo Technology Society*) (IETS, 2018), que revelam uma maior produção mundial de embriões *in vivo* (99,6%) do que *in vitro* (0,4%) para pequenos ruminantes, sendo discrepante dos bovinos, que possuem aproximadamente 67% de embriões oriundos da produção *in vitro* de embriões. A importância da MOTE na reprodução dos ovinos e caprinos é bem marcada no Brasil, já que atualmente é o país líder de produção de embriões *in vivo* de pequenos ruminantes com aproximadamente 47% da produção mundial (IETS, 2018).

Dados da IETS revelam que uma pequena parcela dos embriões produzidos pela técnica, é criopreservada (IETS, 2018). A criopreservação é necessária quando existem embriões excedentes, o que pode acontecer quando existem poucas receptoras disponíveis no local ou quando estas não respondem à sincronização, ou quando apresentam corpo lúteo pouco vascularizado. Outra possibilidade é uma resposta exacerbada das doadoras diante dos protocolos superovulatórios, não tendo a quantidade de receptoras necessária para a transferência imediata dos embriões. Portanto, a criopreservação é uma biotecnologia de suporte importante na MOTE, para que não ocorra perda de valioso material biológico, e promova a

conservação do embrião para utilização futura em inovulações, melhoramento genético ou até mesmo comércio (DOBRINSKY, 2002).

2.2 DESENVOLVIMENTO PRÉ IMPLANTACIONAL

O desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto e posterior alongamento para iniciar a implantação e organogênese, é chamado de período pré implantacional. A correta formação do blastocisto é essencial pois determina a eficiência da implantação. Além disso, blastocistos de alta qualidade tem maior criotolerância durante a criopreservação (YAO et al., 2019; GIBBONS et al., 2019). O período pré implantacional é caracterizado por quatro etapas principais: (a) clivagem inicial que leva a consecutivas divisões em células filhas de tamanho reduzido, (b) ativação do genoma embrionário, (c) compactação da mórula e (d) cavitação do blastocisto. Todas essas etapas culminam na formação de um blastocisto com duas camadas distintas que darão origem ao conceito e permitirão sua implantação. Essas camadas são o trofotoderma (TE), que forma a camada mais externa do embrião e promove a comunicação entre embrião e útero, e a camada mais interna, conhecida como massa celular interna (MCI), separada do TE pelo grande acúmulo de líquido da blastocèle (WHITE et al., 2018).

O desenvolvimento embrionário inicia-se com a fusão dos pró-núcleos feminino e masculino (singamia), e formação do zigoto, caracterizado por ser uma célula com baixa razão citoplasmática-nuclear. Diante disso, as divisões celulares seguintes devem promover o reestabelecimento da razão citoplasmática-nuclear das células do embrião (blastômeros). Este é o intuito do processo de clivagem inicial que promove divisões celulares sem o aumento da massa celular, chegando a diminuir em até 40% a massa celular dos blastômeros ovinos neste período. A clivagem inicial sempre ocorre em uma sequência dupla, e até o momento em que o embrião ovino possui oito blastômeros ele é considerado uma estrutura totipotente, podendo dar origem a qualquer tecido e placenta (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Durante esta etapa há expressão de vários fatores de crescimento, assim como o *transforming growth factor beta 1* (TGFB1) (LIMA; SOUZA, 2009), gene que continua sendo expresso durante todo o período de pré-implantação e implantação promovendo proliferação e diferenciação celular (PARIA et al., 1992).

Quando o embrião ovino atinge o estágio de 8-16 células ele alcança a completa ativação do genoma embrionário (MEMILI; FIRST, 2000). Este é um

fenômeno gradual caracterizado pela diminuição da atividade transcricional materna, e aumento na atividade sintética do embrião, direcionando o seu próprio desenvolvimento. Esta etapa é considerada uma das mais importantes da pré-implantação, devido ao fato de ser um processo complexo que requer diversas modificações, como a mudança na estrutura da cromatina, seguida por mudanças citoplasmáticas e disponibilidade de fatores transcricionais que atuam juntos para o sucesso da ativação (LATHAM; SCHULTZ, 2001). Os genes envolvidos na função celular básica, transporte de íons, metabolismo dos ribonucleotídeos, biogênese do ribossomo, síntese de proteínas, metabolismo do RNA e transcrição estão super-representados durante esta etapa (KANKA, 2003).

Entre o terceiro e o quarto dia após ovulação, o embrião no estágio de mórula (16-32 células), chega ao útero e continua o seu desenvolvimento. Nesta fase é iniciada a diferenciação celular que ocorre de acordo com a posição dos blastômeros dentro da mórula. As divisões continuam, e então ocorrem dois fenômenos, o achatamento e a polarização dos blastômeros, resultando na compactação da mórula (WHITE et al., 2018). Durante a compactação ocorre o desenvolvimento de junções intercelulares compactas, que são fundamentais para a formação do blastocisto e diferenciação das duas camadas celulares (externa e interna). Após compactação, a camada mais externa de células coberta por microvilosidades, e apresentando junções estreitas entre as células selam o embrião e formam o TE. Essa camada celular é regulada principalmente pela expressão do *caudal type homeobox 2 (CDX2)* (SAKURAI et al., 2010).

As microvilosidades da camada externa permitem que os íons de sódio (Na^+) sejam ativamente transportados através de bombas transmembranares. A alta concentração de íons de Na^+ gera um gradiente osmótico que permite o bombeamento de fluido para dentro do embrião, iniciando o processo de cavitação do blastocisto e formação da blastocèle (WATSON; BARCROFT, 2001). A camada interna, forma a MCI, e a expansão da blastocèle é extremamente importante para promover uma separação física da camada externa e interna do embrião. Desta forma, é possível que haja a diferenciação correta da MCI em duas populações distintas: o endoderma primitivo e o epiblasto. A formação dessas duas populações é gerada pela expressão do fator de transcrição *GATA6* (*GATA binding protein 6*) e *Nanog homeobox*, respectivamente (OHNISHI et al., 2014). Diversos outros genes são expressos no estágio de blastocisto em ruminantes, dentre eles o *nuclear*

respiratory factor 1 (NRF1) se destaca, pois, a ausência dele causa morte embrionária (MAY-PANLOUP et al., 2005).

Após a especificação do destino celular, o arranjo espacial preciso das populações celulares ocorre através da migração celular, apoptose, polarização e adesão das células. No momento da implantação do blastocisto, o endoderma primitivo é um folheto mais interno e mais diferenciado que o epiblasto e o TE do embrião. O epiblasto apresenta células pluripotentes devido a expressão de *NANOG* (responsável pela manutenção da pluripotência) e o TE está pronto para desempenhar seu papel de comunicação entre o útero e o embrião (WHITE et al., 2018). Para concluir o desenvolvimento pré implantacional e a implantação, o embrião deve finalmente eclodir da zona pelúcida. A eclosão é causada pela expansão e contração do blastocisto, junto a enzimas envolvidas com o enfraquecimento da zona pelúcida. A partir deste momento termina a fase pré implantacional e o embrião inicia a fase de alongamento e reconhecimento e implantação (YAO et al., 2019).

2.3 GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO, IMPLANTAÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

2.3.1 Marcadores de qualidade embrionária

A competência embrionária de se implantar e estabelecer a gestação depende da expressão de diversos genes, que estimulam diferentes cascatas de ativação dentro do embrião. O que vai determinar se essa ativação é benéfica ou não, é a quantificação de cada gene ativo diante da situação em que ele se encontra. A apoptose é um processo de morte celular programado, essencial para o desenvolvimento embrionário e fetal (JACOBSON et al., 1997). Isso resulta de uma complexa cascata de eventos regulados e coordenados pela interação de pelo menos 100 produtos gênicos que inibem ou ativam a autodestruição celular. A família da proteína Bcl-2 representa os principais candidatos ao controle da apoptose em células embrionárias e é o ponto focal de estímulos apoptóticos na maioria das células (ADAMS; CORY, 2007).

A família *B-cell lymphoma 2 (BCL2)* é composta por sete proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-x1, BCL-w, BFL-1, MCL-1, BCL210 e BPR), seis proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BOK, BCL-G, BCL-rambo e BFK) e oito proteínas de morte BH3 (BID, BAD, BIK, BIM, BMF, Noxa, Puma e HRK) (AOUACHERIA et al.,

2005). O equilíbrio entre os membros da família pró e anti-apoptótico determina parcialmente a sensibilidade da célula à apoptose. Proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 interagem com proteínas *BCL-2 associated X* (BAX) pró-apoptóticas para neutralizar sua atividade. As proteínas BH3 respondem apenas a sinais de morte ativando membros pró-apoptóticos tipo BAX, direta ou indiretamente, e inativando proteínas de sobrevivência tipo BCL-2. A ativação do BAX leva a uma quebra na permeabilidade da membrana mitocondrial externa, à liberação do citocromo C no citoplasma e à ativação de caspases responsáveis pela morte celular (Figura 1) (YOULE; STRASSER, 2008).

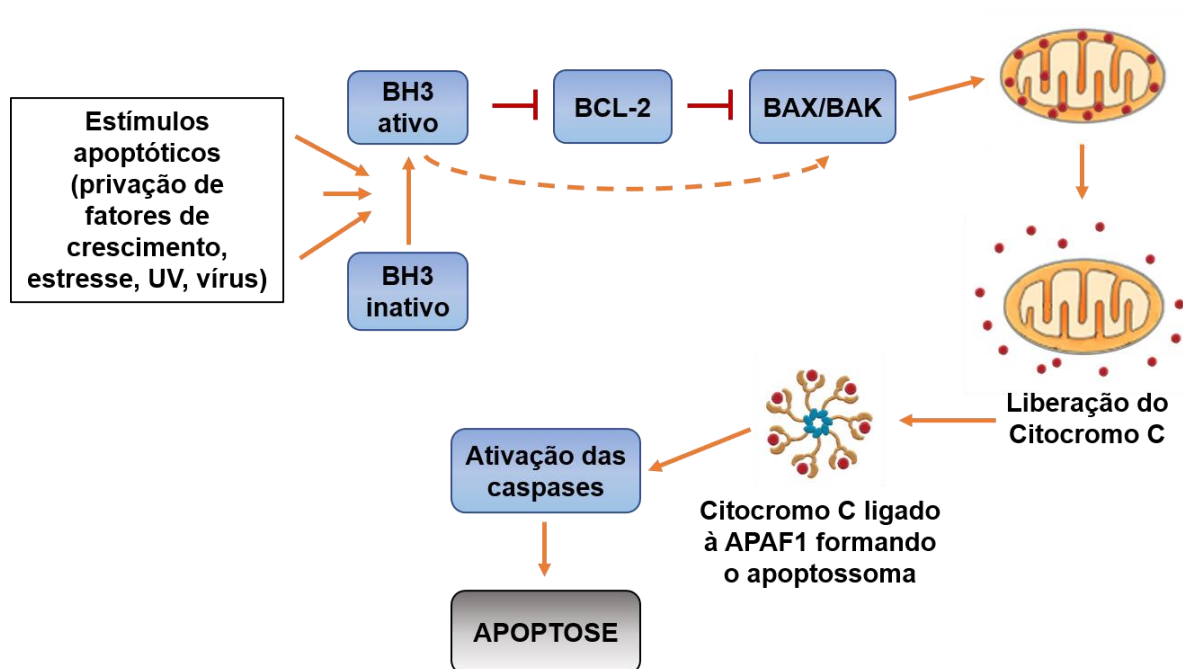


Figura 1. Via de sinalização intrínseca da apoptose

2.3.2 Marcadores do metabolismo e implantação embrionária

Os genes de implantação embrionária estão relacionados com os mecanismos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, desde a fertilização, e diferenciação celular até a formação do blastocisto para desempenhar a implantação e sinalização do reconhecimento materno da gestação. O gene *CDX2* desempenha um papel de diferenciação do TE, e alguns estudos também sugerem que ele é um dos precursores do interferon-tau (IFN- τ) produzido no reconhecimento materno de ruminantes (IMAKAWA et al., 2006). O gene *NANOG* é responsável pela

manutenção e indução da pluripotência na MCI e células tronco embrionárias (CHAMBERS et al., 2013). O gene *NRF1* atua nas células regulando a ação antioxidante e transcrição e replicação de DNA mitocondrial (CHIARATTI et al., 2009) e o gene *TGFB1* é correlacionado com diferenciação e proliferação celular (GUO et al., 2009).

O gene *NRF1* codifica uma proteína que homodimeriza e funciona como fator de transcrição ativando a expressão de genes metabólicos importantes que regulam o crescimento celular e genes nucleares necessários para a respiração, e transcrição e replicação de DNA mitocondrial (ZHANG, 2016). Até o momento, evidências revelaram que o *NRF1* cumpre uma função única na manutenção da homeostase celular e na integridade dos órgãos (ZHANG, 2016). Apesar da realização de vários estudos sobre esse gene, ainda não conhecemos sua total função, principalmente nos estágios de desenvolvimento inicial do embrião. No entanto, sabemos que em ruminantes a sua expressão aumenta quando o embrião chega ao estágio de blastocisto, indicando aumento de transcrição e replicação de DNA mitocondrial (MAY-PANLOUP et al., 2005; CHIARATTI et al., 2009). Além disso, estudos com *knockout* do gene revelaram que a sua ausência causa morte embrionária, relevando que o gene é essencial no desenvolvimento (LEUNG et al., 2003).

O *transforming growth factor beta 1* é uma proteína secretada que executa muitas funções celulares, incluindo o controle do crescimento celular, proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. É um fator de crescimento essencial ao desenvolvimento embrionário inicial (LIMA; SOUZA, 2009) e implantação promovendo proliferação e diferenciação celular (PARIA et al., 1992). Em estudos com *knockout* do gene, os embriões não prosseguiram do estágio de mórula (INGMAN et al., 2006), indicando a sua importância em diversas vias. Durante o processo de implantação ele ajuda a promover a diferenciação do mesoderma ou do endoderma definitivo, durante o processo de gastrulação (TAM; LOEBEL, 2007).

O *caudal type homeobox 2*, regula a diferenciação de trofotoderma, sua função além da diferenciação do trofotoderma ainda não está bem caracterizada. Nos ruminantes, regula o gene interferon-tau (IFN- τ) (SAKURAI et al., 2010). Estudos em embriões murinos mutantes de *CDX2* apresentam defeitos nos tecidos extraembrionários. O alantoide não se funde com o córion, ou em casos mais extremos ocorre a ausência do alantoide, levando a defeitos à nível do labirinto

vascular placentário, e letalidade embrionária por serem incapazes de estabelecer contato com o útero e prosseguir com a troca de nutrientes (YOUNG et al., 2009).

Segundo Home et al. (2009), o fator transcricional *GATA3* (*GATA binding protein 3*), sintetizado exclusivamente no TE, regula a transcrição do *CDX2*, influenciando o desenvolvimento de embriões do estágio de mórula para blastocisto. Em camundongos, o *CDX2* é expresso no TE de embriões no período de pré e pós-implantação, e atua como um agente repressor da expressão de *OCT4* (*Octamer-Binding Protein 4*) e *NANOG* da MCI (SRITANAUDOMCHAI et al., 2009). O *Nanog homeobox* codifica um fator de transcrição homeobox de ligação ao DNA envolvido na proliferação, renovação e manutenção da pluripotência da MCI, impedindo a sua diferenciação em linhagens extraembrionárias como endoderma e TE (OHNISHI et al., 2014). A proteína codificada funciona como regulador de transcrição envolvido na proliferação e auto renovação ou bloqueio das células da MCI. O *NANOG* foi identificado em camundongos como potencial gene relacionado à pluripotência por ter expressão restrita aos embriões e células-tronco embrionárias (CHAMBERS et al., 2013). Este perfil de expressão do *NANOG* também foi descrito em ovinos. Além disso, observou-se que o fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 reduz a expressão de *NANOG* (MORADI et al., 2015). A expressão exógena de *NANOG* em células-tronco mesenquimais de ovinos adultos rejuvenesceu estas células, recuperando a capacidade proliferativa e de diferenciação equivalente as células-tronco mesenquimais de ovinos neonatos (HAN et al., 2012).

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação refere-se à redução drástica de todos os fenômenos biológicos para preservação de amostras biológicas, como proteínas, células e tecidos a temperaturas inferiores à -150 °C (ARAV; SARAGUSTY, 2018). O princípio fundamental desta técnica é baseado na remoção máxima da água intracelular antes de iniciar o processo de criopreservação, para prevenir a formação de cristais de gelo e danos em compartimento intracelulares (VAJTA; KUWAYAMA, 2006). A velocidade de saída da água tem relação direta com o aumento da concentração do soluto extracelular, então a velocidade de congelação é quem determina a formação ou não de cristais de gelo e o grau de retração celular. Tendo em vista que materiais biológicos possuem vários solutos intra e extracelulares, seu ponto de fusão é menor do que o da água (0 °C), o que diminui o intervalo de temperatura crítica para atingir

seu ponto de equilíbrio de congelação. Esse processo leva a alteração de osmolaridade intra e extracelular, então são utilizados crioprotetores para aumentar o equilíbrio osmótico entre solução e material biológico (DALCIN; LUCCI, 2010).

Os crioprotetores podem auxiliar no equilíbrio dentro e fora das células, sendo responsáveis por minimizar o choque osmótico e a formação de cristais de gelo, e consequentemente diminuir os efeitos celulares nocivos como: desnaturação proteica, lesões nas membranas e fratura do citoesqueleto (DALCIN et al., 2013). Eles são divididos em duas classes: os permeáveis ou intracelulares, capazes de entrar nas células se ligando à água e diminuir a temperatura de congelação; e os impermeáveis ou extracelulares, que por apresentarem maior peso molecular, por efeito osmótico, desidratam as estruturas. Os crioprotetores intracelulares mais comuns são etilenoglicol, dimetilsulfóxido e glicerol, já os extracelulares são sacarose e trealose (PEGG, 2002). Porém, apesar de todas as vantagens apresentadas para a utilização dos crioprotetores, eles podem causar toxicidade celular quando utilizados em altas concentrações ou por tempo elevado, então devem ser utilizados em baixas concentrações, ou em associação com outras substâncias, e com exposição de tempo limitada para diminuir os efeitos tóxicos (ARAV, 2014).

Atualmente, existem dois métodos principais para criopreservação de embriões: congelação lenta (CONG) ou vitrificação (VIT). Ambos possuem diferenças consideráveis quanto à taxa de resfriamento, concentração de crioprotetores utilizados e formação de cristais de gelo intracelular. Na CONG, a taxa de resfriamento é realizada em etapas graduais, com baixa concentração de crioprotetores, mas com considerável formação de cristais de gelo. Por outro lado, a VIT aumenta a velocidade de resfriamento, utiliza elevadas concentrações de Crioprotetores e anula a formação de cristais de gelo. Diante disso, é importante ressaltar que a criopreservação causa trauma celular, que pode dificultar o desenvolvimento do concepto e secreção de fatores fundamentais para o reconhecimento materno da gestação (ARAV; SARAGUSTY, 2018).

A CONG tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, que estão associadas à toxicidade química e choque osmótico. Ela pode ser realizada de duas formas: em apenas uma etapa (*one step*); ou a forma com duas etapas utilizando duas concentrações graduais de crioprotetores (ARAV, 2014). A CONG tradicional foi a primeira técnica utilizada para criopreservar embriões, e consiste na

formação de um equilíbrio prévio expondo o embrião com o crioprotetor para posterior queda de temperatura controlada em máquinas programáveis. Quando a máquina atinge a temperatura de cristalização, é realizado o processo de *seeding* (contato na palheta de um objeto pré-resfriado em nitrogênio líquido) para induzir a cristalização de gelo extracelular e esta etapa é fundamental na congelação lenta (VAJTA; NAGY, 2006). A descongelação deve acontecer rapidamente para impedir a fusão de pequenos cristais de gelo e danos celulares (recristalização), e a transferência para a fêmea pode ser imediata.

A VIT é um método rápido, que reduz a sensibilidade ao resfriamento e os danos à cristalização causados às células (ARAV, 2014), e pode ser realizada por diversas técnicas como: técnica da palheta estirada (*open pulled straw*; OPS) (VAJTA et al., 1998), técnica da ponteira (GIBBONS et al., 2011), *cryotop* (HOCHI et al., 2003), entre outras. A VIT consiste na eliminação da formação de cristais de gelo e não congelação da estrutura, devido à alta concentração de crioprotetores e aumento da viscosidade, de modo que a estrutura fique em estado vítreo (YAVIN; ARAV, 2007). Além disso, por ir diretamente da temperatura ambiente para o nitrogênio líquido, o embrião passa rapidamente pela fase crítica de cristalização, impedindo a formação dos cristais de gelo. O maior malefício encontrado é a toxicidade celular e o choque osmótico que ocorre devido à alta concentração de crioprotetores (VAJTA; NAGY, 2006). O aquecimento dos embriões ocorre rapidamente, porém na maioria dos casos não é possível a realização da transferência direta para receptoras. Quando isso ocorre são realizadas lavagens do embrião com meios apresentando concentrações decrescentes de crioprotetores.

As duas técnicas de criopreservação podem ser utilizadas para posterior inovulação de fêmeas, porém diversos estudos já foram realizados observando taxa de gestação após criopreservação. Alguns destes estudos demonstram maior taxa de gestação em embriões transferidos à fresco (MARTÍNEZ et al., 2006) e outros apresentam taxa de gestação similares de embriões transferidos à fresco ou após criopreservação (BETTENCOURT et al., 2009). Além dessas diferenças, a literatura indica que a avaliação de embriões *in vitro* tem respostas diferentes dependendo da técnica de criopreservação utilizada. Varago et al. (2014) revelam uma taxa de re-expansão embrionária semelhante após VIT ou CONG, porém com maior taxa de morte celular em embriões vitrificados do que em congelados. Entretanto, Bhat et al. (2014) indicam que a taxa de re-expansão é maior em embriões vitrificados do que

em congelados. Outro ponto importante na criopreservação de embriões é o estágio de desenvolvimento embrionário indicado para aumentar a viabilidade da estrutura após a criopreservação (LEIBO et al., 1996). Gibbons et al. (2019) demonstraram que os embriões em estágio de blastocisto possuem maior criotolerância e sobrevivência após transferência em comparação a embriões na fase de mórula.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito das técnicas de criopreservação (vitrificação ou congelamento lento) na expressão dos genes relacionados a implantação e qualidade de embriões ovinos produzidos *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a taxa de sobrevivência *in vitro* (24 e 48 h) de embriões ovinos produzidos *in vivo* criopreservados pela técnica de vitrificação ou congelamento lento;
- Analisar o perfil de expressão dos genes relacionados à pré-implantação: pró-apoptótico (*BAX*), anti-apoptótico (*BCL2*), formação do trofotoderma (*CDX2*), manutenção da pluripotência (*NANOG*), respiração celular (*NFR1*) e diferenciação e proliferação celular (*TGFB1*) em blastocistos ovinos produzidos *in vivo* criopreservados pela técnica de vitrificação ou congelamento lento;

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (item 8.1 - #5956101218/2019). O estudo seguiu ainda as normas adotadas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório.

4.1 LOCAL, PERÍODO E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado nos meses de abril e maio (estação de acasalamento natural) de 2019 em Coronel Pacheco (21° 35' S e 43° 15' W), Minas Gerais, Brasil. Todos os animais foram previamente submetidos a exames ginecológicos e andrológicos e apresentavam média de peso de 37 kg $\pm$ 12 kg e escore de condição corporal de 3,5 $\pm$ 0.4 (escala 1-5) (SUITER, 1994). As ovelhas doadoras foram selecionadas em função da genealogia e histórico reprodutivo. O sistema de produção utilizado foi o de confinamento total com oferecimento de silagem de milho e concentrado de fabricação própria de acordo com as demandas nutricionais dos animais (NRC, 2007). Água e sal mineral (Salminas Sheep®, Nutriplan, Juiz de Fora, Brasil) foram ofertados *ad libitum*.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trinta e duas ovelhas superovuladas foram acasaladas e coletadas pela via transcervical. Cem embriões viáveis foram obtidos após a coleta e classificados de acordo com estágio de desenvolvimento (mórula compacta e blastocistos) e qualidade (somente Grau I e II foram utilizados) (item 4.3), e posteriormente foram distribuídos uniformemente em três grupos experimentais: CONG) embriões submetidos à técnica de congelamento lenta (n = 42) (item 4.4.1); VIT) à vitrificação (n = 43) (item 4.4.2); e CONT) congelamento à seco de blastocistos (n = 15). Após a criopreservação, os embriões foram descongelados (CONG) ou aquecidos (VIT) e depois alocados em dois ensaios: 1) Expressão gênica - três pools de cinco blastocistos de CONG, VIT e CONT foram congelados à seco em criotubos (livres de RNase e DNase) a -196 °C até as análises de expressão gênica (item 4.5). Foram realizadas três replicatas para cada pool. O RT-qPCR foi realizado a partir dos

transcritos de genes relacionados à pré-implantação dos embriões (*CDX2*, *NANOG*, *TGFB1*, *NRF1*, *BAX*, *BCL2*); 2) Cultivo *in vitro*: embriões de CONG (n = 27) e VIT (n = 28) foram cultivados em estufa por 48 h no meio SOFaa (BIOK SOF®, Bioklone Reprodução Animal, Jaboticabal, SP, Brasil), à 38,5 °C e 5% de CO₂. A taxa de sobrevivência foi avaliada de acordo com os embriões que re-expandiam durante o cultivo de 24 a 48 h.

4.3 PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES E COLETA TRANSCERVICAL

As fêmeas permaneceram com dispositivos intravaginais contendo 0,36 g de progesterona de liberação lenta (Primer PR®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) por nove dias. Vinte e quatro horas antes da retirada dos dispositivos foram administrados 37,5 µg de d-cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) pela via intramuscular (i.m.) e 24 h após a retirada das esponjas 50 µg de gonadorelina (Gestran®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) pela via i.m. O tratamento de superovulação consistiu na administração de 133 mg de pFSH (Folltropin-V®; Bioniche Animal Health, Belleville, Canada) pela via i.m. duas vezes por dia, durante três dias consecutivos e em doses decrescentes (25, 25, 15, 15, 10 e 10%) (FIGUEIRA et al., 2018) com início 72 h antes da retirada dos dispositivos.

O estro e a monta das ovelhas assim como o protocolo de dilatação cervical e anestesia além da coleta dos embriões foi realizada assim como descrito por Fonseca et al., (2019). O estro das ovelhas foi monitorado duas vezes ao dia no turno da manhã (07:00 – 08:00 h) e no da noite (18:00 - 19:00 h) e submetidas ao acasalamento por monta dirigida, enquanto perdurou o estro. Foram utilizados oito machos aptos à reprodução, respeitando a proporção de 4:1, durante o período de acasalamento e com o respectivo sistema: a primeira fêmea apresentando estro e aceitando monta em um turno, era a última fêmea a ser acasalada no turno posterior se ainda aceitasse a monta.

No quinto dia após o estro foi realizada a ultrassonografia em modo B (M5VET®, Mindray, Shenzhen, China) para avaliar a resposta das doadoras ao tratamento de superovulação, e direcionamento da primeira lavagem do corno uterino ipsilateral ao ovário com maior contagem de corpos lúteos. A coleta foi realizada em todas as ovelhas apresentando mais que dois corpos lúteos na avaliação ultrassonográfica. As coletas foram realizadas entre o sexto e o sétimo dia do ciclo estral (dia 0 = início do estro). Não foi necessária a realização de jejum

hídrico e alimentar prévio das doadoras, pois a técnica utilizada foi a coleta não cirúrgica de embriões. As doadoras iniciaram o protocolo de relaxamento cervical 16 h antes da coleta com aplicação de 1mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, São Paulo, Brasil) e 37,5 µg de d-cloprostenol i.m. Vinte minutos antes de iniciar a coleta foi aplicado 1 mg/kg de acepromazina (Aceproven®, Vencofarma, Londrina, Paraná, Brazil) i.m. e 50 UI de oxitocina (Ocitocina forte®, UCB, São Paulo, Brasil) pela via intravenosa. As ovelhas foram então colocadas em posição de estação contidas em um carrinho e receberam bloqueio epidural (entre S5-C1) com 2 mL de lidocaína à 2% (Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil).

A área perineal das ovelhas foi higienizada com papel, para posterior inserção do espéculo de Collin (nº de 1-3) lubrificado com gel à base de água, para visualização do ósteo cervical. Após visualização do ósteo, ele foi imobilizado com a pinça Embrapa (Pinça Embrapa®, Embrapa, Brasília, Brasil), e colocado um disco de algodão embebido com 5 mL de lidocaína à 2%, preso a uma pinça de Allis (26 cm) ventralmente ao ósteo. Foram utilizadas duas pinças de Backaus nas laterais do ósteo cervical para tracionar lentamente a cérvix e facilitar a passagem do dilatador Hegar pelos anéis cervicais. Imediatamente depois foi introduzida uma sonda (nº 8) acoplada a um mandril metálico para passagem dos anéis cervicais, ao chegar no útero a sonda foi direcionada ao corno uterino ipsilateral ao ovário com maior resposta superovulatória. Para evitar fluxo de líquido fora da sonda, a parte posterior do carrinho foi elevada juntamente com a traseira das fêmeas. A sonda então foi conectada a um circuito, incluindo uma seringa de 60 mL e um filtro para reter os embriões. A seringa foi utilizada para injetar meio de lavagem aquecido nos cornos, feito com *phosphate buffered saline* (PBS) adicionado de 20% de soro fetal bovino (SFB). As quatro primeiras injeções de líquido em cada corno foram em frações de 5mL, e depois em frações de 10 mL, até serem injetados 180 mL de meio para lavar cada corno. O processo de introdução da sonda e lavagem do corno uterino descritos anteriormente, foi repetido para o segundo corno. Os filtros foram lavados com meio de lavagem e todas as estruturas recuperadas foram enumeradas e os embriões foram transferidos para o meio *holding* (Holding Plus®, Cultilab, Campinas, Brasil).

A avaliação embrionária subsequente e a identificação dos embriões seguiram os mesmos princípios utilizados para bovinos na classificação de qualidade (1) e de estágio de desenvolvimento (2). Foram classificados (1) como Grau I (GI): excelente

ou bom; Grau II (GII): regular; Grau III (GIII): pobre e Grau IV (GIV): morto ou degenerado; (2) e mórula compacta (Mc): formada por blastômeros compactados em seu interior e sem blastocelo; blastocisto inicial (Bi): estrutura iniciando a formação da blastocelo após descompactação; blastocisto (Bl): formado por 50% ou mais de blastocelo; blastocisto expandido (Bx): embrião com volume maior de blastocelo e com a zona pelúcida fina, prestes a ser rompida; blastocisto eclodido (Be): quando o embrião consegue romper a zona pelúcida (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010). No total foram recuperados 18 (Mc), 13 (Bi), 32 (Bl) e 37 (Bx). A avaliação morfológica foi realizada usando um estereomicroscópio com magnificação de 40x.

4.4 CRIOPRESERVAÇÃO

4.4.1 Congelação lenta e Descongelação

A congelação lenta foi baseada em métodos previamente descritos (FONSECA et al., 2018b; FIGUEIRA et al., 2019). Foi utilizado etilenoglicol (EG) na concentração de 1,5 M e solução base (SB) composta por PBS, suplementada com 20% de SFB. A técnica foi realizada em apenas uma etapa. Um ou dois embriões foram colocados em placas com o EG e posteriormente foi feito o envase. Todo esse processo durou entre 10 e 20 min. O envase foi feito em palhetas de 0,25 mL da seguinte forma: 1º - coluna de SB; 2º - coluna de ar; 3º - coluna do embrião + EG; 4º - segunda coluna de ar; e 5º - segunda coluna de SB. O equipamento utilizado neste processo foi o congelador CL5000 (Cryologic®, Sidney, Austrália). A curva de congelação foi de 20 °C com uma taxa de resfriamento de 3 °C/min, até chegar em -6 °C. Nesta temperatura ocorreu estabilização por 15 min e *seeding* após 5 min. Posteriormente chegou em -32 °C com uma taxa de resfriamento de -0,5 °C/min. Após estabilização nesta temperatura por 10 min, procedeu-se a transferência direta da palheta para armazenamento em botijão contendo nitrogênio líquido. O processo de descongelação foi realizado primeiramente com a palheta em temperatura ambiente por 5 s, e depois banho maria em 36 °C por 30 s.

4.4.2 Vitrificação e Aquecimento

A vitrificação foi baseada no protocolo descrito por Gibbons et al. (2011), utilizando dois crioprotetores, o glicerol (G), e o EG; e um regulador osmótico no aquecimento, a sacarose (S). O protocolo foi dividido em quatro etapas com soluções distintas que vão de baixas concentrações de crioprotetores à elevadas

concentrações, e na última etapa menor tempo de exposição dos embriões aos crioprotetores. 1) SB, por 5 min; 2) SB + 10% G por 5 min; 3) SB + 10% G + 20% EG por 5 min; 4) SB + 25% G + 25% EG por 30 s. Os embriões foram aspirados e mantidos na ponteira com o mínimo de meio possível e imediatamente colocados em criotubos de 3,6 mL preenchidos com nitrogênio líquido, armazenados em botijão. Para o aquecimento, as ponteiras foram aquecidas entre o polegar e o dedo médio por 10 s. As soluções de aquecimento foram divididas também em quatro etapas e cada uma delas durou 5 min à 25 °C. 1) 12.5% G + 12.5% EG + 0.5 M sacarose; 2) 0.5 M sacarose; 3) 0.25 M sacarose; 4) SB.

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA, TRANSCRIÇÃO REVERSA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

As amostras foram analisadas por reação quantitativa em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-qPCR) (BATISTA et al., 2014). Para cada grupo, o RNA total foi extraído a partir de *pools* de cinco blastocistos em triplicatas, utilizando o *RNeasyMicro Kit* (Qiagen® Inc., Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em resumo, cada amostra foi acrescida de tampão de lise RLT (75 µL) e misturadas com um volume igual de etanol a 70%. A mistura foi então transferida para uma coluna tipo *spin RNeasyMinElute*. Após tratamento com DNase durante 15 min à temperatura ambiente, a resina foi lavada e o RNA diluído com 12 µL água livre de RNase. A eluição foi realizada com 14 µL de água livre de RNAase e a quantificação de RNA de cada pool foi realizada usando 1 µL de amostra em um espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Wilmington, DE, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) adicionando ao RNA de: *primer oligo* (*dT*₂₀) (20 µM), *Superscript III RT* (1 µL), dNTPs (0,5 mM), RNaseOUT (2 U/µL) MgCl₂, tampão RT e amostra de RNA em um volume final de 20 µL. As misturas foram incubadas primeiro a 65 °C por 5 min e depois a 50 °C por 50 min. A reação foi encerrada a 85 °C por 5 min e depois resfriada em gelo. Depois disso, a RNase H foi adicionada às amostras e incubada a 37 °C por 20 min.

A quantificação relativa foi realizada em triplicata utilizando a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*, Foster City, CA, EUA). As reações (volume total de 20 µL) foram preparadas usando uma mistura de: 2 x *FastStart Universal SYBR Green PCR Master Mix* (10 µL;

Roche®, Mannheim, Alemanha), *primers* (0,1 µM; Tabela 1), água livre de nuclease e transcritos reversos de cDNA (1 µL). Controles negativos, compreendendo a mistura de reação de PCR sem ácidos nucleicos, também foram executados com cada grupo de amostras. Os moldes de cDNA foram desnaturados a 95 °C por 10 min, e todos os genes foram amplificados em 40 ciclos de uma ciclagem térmica programada em 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 60 °C por 30 s. Os dados de fluorescência foram adquiridos durante as etapas de extensão. Após cada execução da PCR, foi realizada uma análise da curva de fusão para confirmar que um único produto específico foi gerado. A eficiência do primer foi calculada usando o software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2013) para cada reação.

Tabela 1. *Primers* utilizados para as análises de RT-qPCR

Genes	Sequência dos <i>primers</i> 5' para 3'	Temp. de anelamento (°C)	Tamanho (bp)	Referências
<i>TGFB1</i>	F:GGAATTCATGCCGCCCTCGGGGCTGCGG R:GGTCTAGATCAGCTGCACTTGCAGGAGCG	63	390	Juengel et al. 2004
<i>NANOG</i>	F:TTCCCTCCTCCATGGATCTG R:AGGAGTGGTTGCTCCAAGAC	53	501	Sanna et al. 2009
<i>NRF1</i>	F:GCAGGTCCTGTGGGAATG R:CTGGGATAAATGCCCGAAG	61	412	Nau et al. 2002
<i>CDX2</i>	F:GCCACCATGTACGTGAGCTAC R:ACATGGTATCCGCCGTAGTC	60	140	Sakurai et al. 2010
<i>BAX</i>	F:CCTGGGATCTTGAAACTCTCCTT R:CTGAGCCAGGCTGAAATCAAAA	60	566	Chakravarthi et al. 2015
<i>BCL2</i>	F:GCCGAGTGAGCAGGAAGAC R:GTTAGCCAGTGCTTGCTGAGA	60	214	Chakravarthi et al. 2015
<i>GAPDH</i>	F:ATGTTTGTGATGGGCGTGAA R:ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT	60	176	O'Connor et al. 2012
<i>H2AFZ</i>	F:GTCGTGGCAAGCAAGGAG R:GATCTCGGCCGTTAGGTACTC	57	182	O'Connor et al. 2012

A média de eficiência do primer foi de 1,89; 1,91; 1,93; 1,91; 1,91; 1,91; 1,93 e 1,98 para *TGFB1*, *NANOG*, *NRF1*, *CDX2*, *BAX*, *BCL2*, *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *H2AFZ* (*H2A histone family member Z*),

respectivamente. A estabilidade dos genes de referência foi calculada usando a ferramenta *BestKeeper - Excel*. A quantificação relativa foi realizada pelo método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) utilizando o software REST 2008 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão de cada gene alvo foi normalizada usando a média geométrica dos valores de *GAPDH* e *H2AFZ*.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados qualitativos de taxa de sobrevivência foram avaliados pelo teste Exato de Fisher para a detecção das eventuais diferenças. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5.0*.

5 CAPÍTULO II

Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique

A expressão gênica de blastocistos ovinos produzidos in vivo foi mais afetada pela técnica de vitrificação do que pela congelação lenta

Artigo submetido ao periódico: *Cryobiology*

Em: 17/12/2019

Qualis: A2

Fator de Impacto: 2.141

Gene expression patterns of *in vivo*-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique

Viviane L. Brair^{a*}, Ana Lucia R.S. Maia^a, Lucas Francisco L. Correia^a, Nathalia O. Barbosa^a, Juliana D.R. Santos^a, Felipe Z. Brandão^a, Jeferson F. Fonseca^b, Ribrio Ivan T.P. Batista^a, Joanna M.G. Souza-Fabjan^{a*}

^a *Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Av. Vital Brasil Filho, 64, CEP 24230-340, Niterói, RJ, Brazil*

^b *Embrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Regional Sudeste, Rodovia MG 133, Km 42, CEP 36155-000, Coronel Pacheco, MG, Brazil*

*Corresponding author. E-mail addresses: joannavet@gmail.com (J.M.G. Souza-Fabjan); vivilopesbrair@gmail.com (V.L. Brair).

ABSTRACT

Transfer of fresh sheep embryos frequently results in higher pregnancy rate compared to cryopreserved ones, possibly due to a failure in the communication between the cryopreserved embryo and the endometrium during pre-implantation and pregnancy establishment. Thus, this study assessed the effect of sheep embryo cryopreservation (slow freezing or vitrification) on embryo survival rate and expression of genes related to trophoctoderm differentiation (*CDX2*), pluripotency maintenance (*NANOG*), cell proliferation (*TGFB1*), mitochondrial activity (*NRF1*) and apoptosis (*BAX* and *BCL2*). Superovulation (n=32 ewes) was performed and embryos were transcervically collected. One hundred good quality (Grade I and II) embryos were allocated into three groups: fresh embryos (CTL; n=15), slow freezing (SF; n=42) or vitrification (VT; n=43). After thawing/warming, three pools of five blastocysts per group were used for RT-qPCR; the remaining 55 embryos were cultured *in vitro* in SOFaa medium at 38.5 °C and 5% CO₂ (SF: n=27 and VT: n=28). Survival rate of SF and VT were, respectively, 29.6% (8/27) and 14.2% (4/28) at 24 h; and 48.1% (13/27) and 32.1% (9/28) at 48 h ($P > 0.05$). Only *CDX2* was affected (up-regulated, $P < 0.05$) in both groups compared to CTL. The *BAX* transcript was upregulated in VT, compared to SF group. The VT increased ($P < 0.05$) the expression of all genes, except for *NANOG* and *NRF1*, when compared to the CTL. In conclusion, although *in vitro* survival was similar between techniques, VT led to increase in blastocysts gene expression compared to CTL and SF.

Keywords: embryo cryopreservation; embryonic metabolism; apoptosis regulator; implantation; ovine.

1. Introduction

The successful cryopreservation of sheep embryos can improve all other reproductive biotechnologies, such as multiple ovulation and embryo transfer or *in vitro* embryo

production. However, lower pregnancy rates after transferring cryopreserved embryos, compared to fresh embryos are reported [13,18,39], regardless of the origin of embryos [either *in vivo*-derived (IVD) or *in vitro* produced (IVP)]. The decrease in the developmental competence of mammalian embryos after cryopreservation is mainly associated with the morphological and functional damage that the cell suffers during the process. The extent of the cryogenic lesion is highly variable and depends on the species, stage of development, embryo origin [11] and cryopreservation technique (slow freezing or vitrification). Slow freezing (SF) is the most widespread cryopreservation technique and its main advantage is the reduced cellular toxicity due to low cryoprotectant concentration; however, it does allow the formation of ice crystals that can lead to cell damage. The opposite can be achieved in the vitrification (VT): no crystallization occurs, due the production of a glassy state of high viscosity to behave like a solid [41], but cryoprotectant toxicity is its major problem. In cattle, both SF and VT resulted in similar cryosurvival and pregnancy rates for IVD embryos [34]. However, in sheep these data are still conflicting.

During embryo development, morphological changes such as cleavages, compaction, blastulation, implantation and gastrulation [51,55] are accompanied by changes in the transcript levels of genes associated with differentiation. These genes are expressed in specific stages and cells, orchestrating the formation of different types of cells, tissues and organs. Transcription factors required for maintenance of pluripotency, such as POU class 5 homeobox 1 (*POU5F1* or *OCT4*), SRY-box transcription factor 2 (*SOX2*) and Nanog homeobox (*NANOG*), expressed strictly in cells of the internal cell mass (ICM), are mediated by the action of the caudal type homeobox 2 (*CDX2*) gene product expressed on trophoblast cells [9,43] have been described in blastocysts.

Mitochondria are responsible for producing the most energy that drives the embryo development and it plays an important role in calcium homeostasis and fatty acid oxidation

[33]. The embryo only begins to replicate it in the hatched blastocyst stage, so all previous stages depend on the pre-existing mitochondria in the oocyte [53]. Therefore, only during the implantation period the embryo can replicate mitochondrial DNA [54,59]. The increase in mitochondrial DNA transcription and replication in the blastocyst stage in ruminants is coordinated by the nuclear respiratory factor 1 (*NRF1*) gene [10,35]. Thus, the alteration in this gene expression may compromise mitochondrial proliferation and physiology, leading to impairment in cellular homeostasis. In addition, the anti-apoptotic (B-cell lymphoma protein 2; *BCL2*) and proapoptotic (BCL-2 associated protein X; *BAX*) genes, members of the BCL-2 family, mediate the release of cytochrome C from the intermembrane space of mitochondria, triggering programmed cell death [2]. The relative expression of these genes can be used as a predictor of embryonic competence.

Biopsies derived from IVP blastocysts that resulted in the delivery of calves were enriched with transcripts necessary for implantation, carbohydrate metabolism, growth factor and placentation [16]. An increase in the expression of genes associated with cell survival, growth and proliferation was detected in blastocysts of high cryosurvival [34]. Growth factors, such as transforming growth factor beta 1 (*TGFB1*), involved in cell proliferation and differentiation are also used as markers of embryonic competence [40]. Indeed, the knowledge about the gene expression profile after cryopreservation is crucial for better understanding the mammal embryo development and may be useful to further refinement of embryo cryopreservation techniques. Thus, this study assessed the effect of cryopreservation techniques (SF or VT) on embryo survival rate and expression of genes related to pre-implantation of IVD sheep blastocysts.

2. Material and Methods

2.1. Ethics, location and experimental conditions

This research was conducted under the principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science with approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal Fluminense (# 5956101218/2019). The experiment was conducted during April and May (breeding season) of 2019 in Coronel Pacheco (21° 35' S and 43° 15' W) in Minas Gerais state, Brazil. All animals underwent gynecological and andrological examinations and had a mean body weight of 57 ± 12 kg and body condition score of 3.5 ± 0.4 (scale 1-5) [58]. They were kept in an intensive system and fed corn silage, supplemented with concentrate provided on demand [36]. Mineralized salt (Salminas Sheep[®], Nutriplan, Juiz de Fora, Brazil) and drinking water were available *ad libitum*.

2.2. Experimental design

Ewes (n=32) were superovulated and embryos were retrieved by non-surgical embryo recovery (NSER), with recovery rate of 65%. A hundred viable embryos [18 compact morulae (Mc), 13 initial blastocysts (Bi), 32 blastocysts (Bl) and 37 expanded blastocysts (Bx)] were allocated into three experimental groups: fresh embryos as SF (n = 42) or VT (n = 43), and blastocysts in control (CTL; n = 15). After cryopreservation, embryos were thawed (SF) or warmed (VT), and then allocated into two trials: 1) Gene expression – three pools of five blastocysts from SF (n = 15: 7 Bx, 6 Bl, 2 Bi), VT (n = 15: 6 Bx, 8 Bl, 1 Bi) and CTL (n = 15: 6 Bx, 3 Bl, 6 Bi) were dry frozen in cryotubes (free of RNase and DNase) at - 196 °C until molecular analysis and three replicates for each pool were performed. The RT-qPCR was made from gene transcripts related to embryo pre-implantation (*CDX2*, *NANOG*, *TGFB1*, *NRF1*, *BAX*, *BCL2*); 2) *in vitro* culture: embryos from SF (n = 27: 11 Bx, 6 Bl, 1 Bi, 9 Mc) and VT (n = 28: 7 Bx, 9 Bl, 3 Bi, 9 Mc) were cultured in SOFaa medium (BIOK SOF[®], Bioklone Reprodução Animal, Jaboticabal, SP, Brazil), at 38.5 °C and 5% CO₂. The survival rate was assessed at 24 and 48 h.

2.3. Embryo recovery and classification

Ewes (n = 32) were synchronized and superovulated as reported by Figueira et al. [18]. Estrus was monitored twice daily, and the ewes were mated by fertile rams (4:1 ratio). Embryos were recovered between the sixth and seventh day of the estrous cycle (D0 = estrus onset), by non-surgical embryo recovery (NSER) after cervical dilation protocol, described previously [21]. All recovered structures were transferred to the holding medium (Holding Plus®, Cultilab, Campinas, Brazil) and classified according to their development/stage (Mc, Bi, Bl, Bx), and quality. Only GI and GII embryos were used [56].

2.4. Cryopreservation of embryos

2.4.1. Slow freezing and thawing

Slow freezing procedures were based on the method previously described [19,20]. Ethylene glycol (EG; 1.5 M) was used in one step with a base solution (BS: PBS supplemented with 20% fetal bovine serum). Freezing was performed by cooling from 20 °C until -6 °C at a rate of 3 °C/min; stabilization in -6 °C for 15 min and seeding after 5 min; cooling to -32 °C at a rate of -0.5 °C/min and then holding for 10 min at -32 °C; and then plunging into LN₂ for storage. Thawing was performed at room temperature for 5 s, then in a water bath at 36 °C for 30 s.

2.4.2. Vitrification and warming

Vitrification was conducted according to Gibbons et al. [23]. The method was separated in four steps with increasing concentrations of cryoprotectants, and last step, with low time exposure of cryoprotectants with the embryos. 1) BS, for 5 min; 2) BS + 10% glycerol (G) for 5 min; 3) BS + 10% G + 20% EG for 5 min; and 4) BS + 25% G +

25% EG for 30 s. After these steps, the tips with embryos were introduced into 3.6 mL cryotubes filled with LN₂. For warming, the tips were warmed between the thumb and middle finger for 10 s. In the media, sucrose was included for osmolarity control, and each step took 5 min at 25 °C: 1) 12.5% G + 12.5% EG + 0.5 M sucrose; 2) 0.5 M sucrose; 3) 0.25 M sucrose; 4) BS.

2.5. RNA extraction, reverse transcription, and quantitative PCR amplification

Samples were analyzed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) after reverse transcription [5]. Total RNA was extracted from three pools of five blastocysts per group (CTL, SF and VT) using the RNeasyMicro Kit (Qiagen Inc., Valencia, EUA) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase for 15 min to prevent DNA contamination. Elution was performed with 14 µL of RNAase free water and the RNA quantification of each pool was performed using 1 µL of sample on a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Wilmington, DE, USA). For reverse transcription, using the SuperScript III first-strand synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the same RNA concentration was used for all samples. The reverse transcription reaction was prepared by mixing oligo (dT)₂₀ primers, dNTP mixture, Superscript III RT, RNase OUT, MgCl₂, RT buffer and RNA sample in a final volume of 20 µL. The mixtures were first incubated at 65 °C for 5 min and then for 50 °C for 50 min. The reaction was terminated at 85 °C for 5 min and then chilled on ice. After that, RNase H was added to the samples and incubated at 37 °C for 20 min.

Relative quantification was performed in triplicate using real-time polymerase chain reaction (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Foster City, CA, USA). Reactions (20 µL total volume) were prepared using a mixture of SYBR green kit (10 µL; Power SYBR Green, Applied Biosystems), 0.1µM primers (Table 1), nuclease-free water and reverse

transcribed cDNA (1 µL). Negative controls, comprising the PCR reaction mixture without nucleic acids, were also run with each group of samples. Template cDNAs were denatured at 95 °C for 10 min, and all genes were amplified by 40 cycles of a thermal cycling programmed of 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. Fluorescence data were acquired during the extension steps. After each PCR run, a melting curve analysis was performed to confirm that a single specific product was generated. Primer efficiency was calculated using LinRegPCR software [44] for each reaction. The primer efficiency average was 1.89; 1.91; 1.93; 1.91; 1.91; 1.91; 1.93 and 1.98 to *TGFB1*, *NANOG*, *NRF1*, *CDX2*, *BAX*, *BCL2*, *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and *H2AFZ* (H2A histone family, member Z), respectively. Relative quantification was performed by the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) using the REST 2008 software [32]. The expression of each target gene was normalized using geometric mean of *GAPDH* and *H2AFZ* values. The stability of the reference genes was calculated according to the methodology described by Pfaffl et al. [42], using the BestKeeper - Excel tool. The values of the Pearson correlation coefficient observed for the *GAPDH* ($r^2 = 0.774$) and *H2AFZ* ($r^2 = 0.745$) genes demonstrate stability ($p < 0,01$) of these reference genes.

2.6. Statistical analysis

The embryo survival data were submitted to Fisher's Exact Test. Construction of graphics was performed in GraphPad Prism 8.0.2. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Data are given as the mean $\pm$ s.d.

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-qPCR analysis

Gene Symbols	Sequence of primers 5' to 3'	Annealing temperature (°C)	Amplicon Size (bp)	References
<i>TGFB1</i>	F:GGAATTCATGCCGCCCTCGGGGCTGCGG R:GGTCTAGATCAGCTGCACTTGCAGGAGCG	63	390	Juengel et al. [29]
<i>NANOG</i>	F:TTCCCTCCTCCATGGATCTG R:AGGAGTGGTTGCTCCAAGAC	53	501	Sanna et al. [50]
<i>NRF1</i>	F:GCAGGTCCTGTGGGAATG R:CTGGGATAAATGCCCCGAAG	61	412	Nau et al. [37]
<i>CDX2</i>	F:GCCACCATGTACGTGAGCTAC R:ACATGGTATCCGCCGTAGTC	60	140	Sakurai et al. [49]
<i>BAX</i>	F:CCTGGGATCTTGAAACTCTCCTT R:CTGAGCCAGGCTGAAATCAAAA	60	566	Chakravarthi et al. [8]
<i>BCL2</i>	F:GCCGAGTGAGCAGGAAGAC R:GTTAGCCAGTGCTTGCTGAGA	60	214	Chakravarthi et al. [8]
<i>GAPDH</i>	F:ATGTTTGTGATGGGCGTGAA R:ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT	60	176	O'Connor et al. [38]
<i>H2AFZ</i>	F:GTCGTGGCAAGCAAGGAG R:GATCTCGGCCGTTAGGTACTC	57	182	O'Connor et al. [38]

3. Results

3.1. Thawing, warming and *in vitro* culture

The results of embryonic survival rate after cryopreservation are shown in Table 2. No difference ($P > 0.05$) was observed in survival rate at 24 and 48 h of *in vitro* culture when embryos were subjected to SF or VT. When data were pooled regardless of treatment, the average survival at 24 and 48 h was 21.8 and 40.0%, respectively.

Table 2. *In vitro* culture survival rate of *in vivo*-derived sheep embryos, cryopreserved by either slow freezing (SF) and vitrification (VT) methods, after thawing and warming, respectively.

Group	Embryo survival rate (%)	
	24 h	48 h
VT	4/28 (14.2)	9/28 (32.1)
SF	8/27 (29.6)	13/27 (48.1)
Total	12/55 (21.8)	22/55 (40.0)

* Fisher's Exact Test ($P > 0.05$)

3.2. Gene expression

Gene expression of all genes in the three groups are shown in Figure 1. Regarding SF, the expression of genes related to apoptosis regulators (pro-apoptotic [*BAX*] and anti-apoptotic [*BCL2*]), pluripotency maintenance (*NANOG*), cell proliferation and differentiation (*TGFB1*) mitochondrial activity (*NRF1*) were not altered ($P > 0.05$) in embryos compared to the CTL. Except for the up-regulated *CDX2* gene (trophectoderm differentiation) ($P < 0.05$). The VT group had an increased ($P < 0.05$) the expression of all genes (*BAX*, *BCL2*, *CDX2* and *TGFB1*, except for *NANOG* and *NRF1*, when compared to CTL. In the comparison between both techniques (SF and VT), only the *BAX* gene was up-regulated ($P < 0.05$) in VT group.

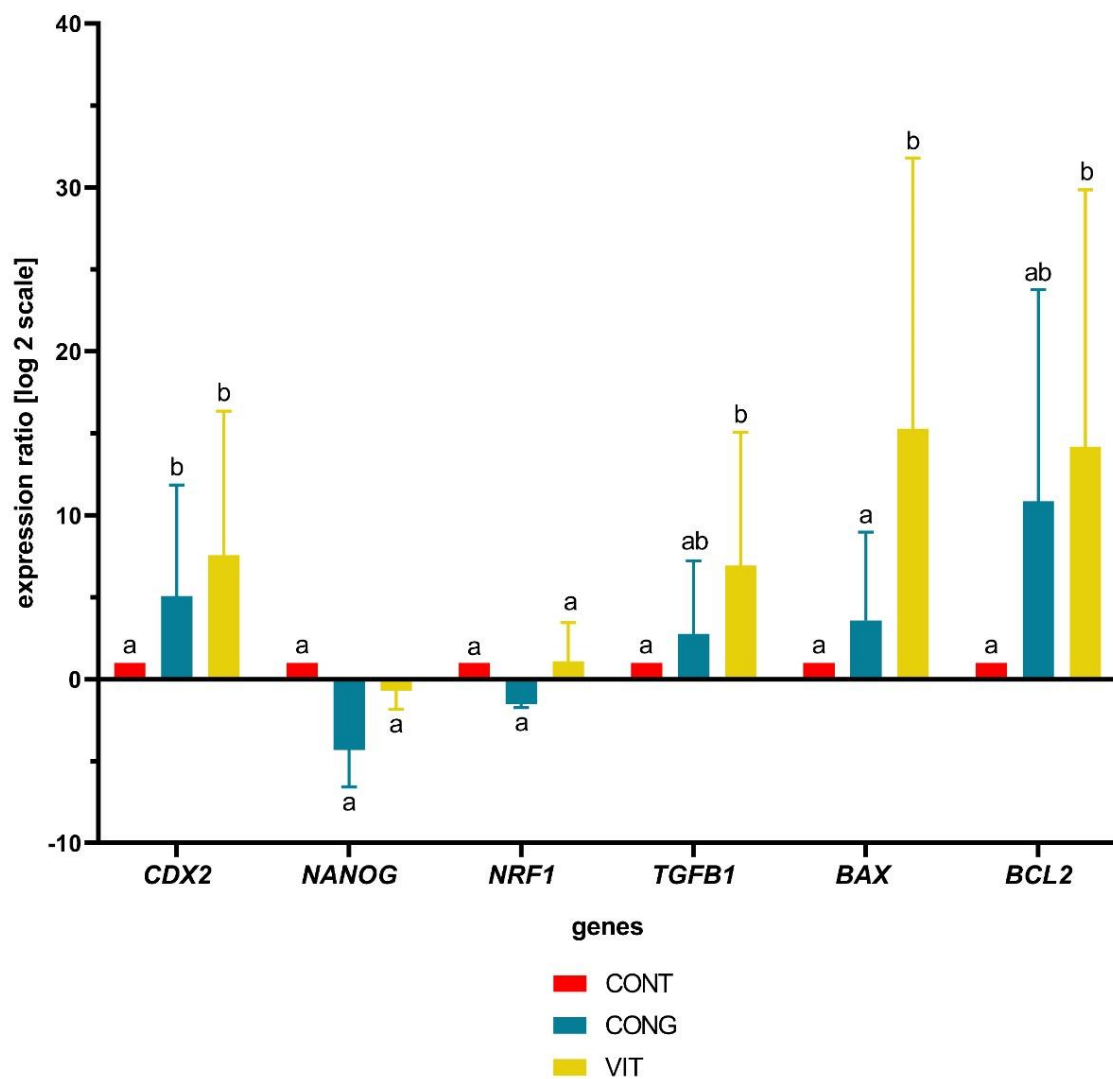


Figure 1. Gene expression related to trophoctoderm differentiation (*CDX2*), pluripotency maintenance (*NANOG*), cell proliferation (*TGFB1*), mitochondrial activity (*NRF1*) and apoptosis (*BAX* and *BCL2*) of fresh sheep blastocysts (Control), and immediately after vitrification/warming or frozen/thawing of blastocysts. Different letters show statistical difference ($P < 0.05$).

4. Discussion

The global analysis of gene expression shows that VT induces a greater change in the profile of gene expression than SF, when compared to fresh embryos. These data may suggest that IVD embryos are more sensitive to the toxic effect of the high concentration of cryoprotectants than to the harmful effects of ice crystals. However, *in vitro* analyses carried

out in the present study demonstrate that the embryos cryopreserved by either SF or VT present similar survival *in vitro*. This data is consistent with a previous report [60], where similar *in vitro* re-expansion rate was obtained when both techniques were compared. The VT technique was developed mainly to improve the survival of IVP embryos, which in general have low cryosurvival when subjected to SF. In comparison with IVD embryos, IVP embryos are characterized by a large accumulation of intracytoplasmic lipids and a high amount of cholesterol and unsaturated fatty acids in the membrane [1,17,45]. These aspects can compromise the success of cryopreservation, as they affect the diffusion and osmosis processes, during freezing/vitrification and thawing/warming. Thus, due to the lower amount of lipids, IVD perhaps have impaired developmental capacity when they are vitrified, possibly due to the rapid diffusion of the cryoprotectant and increased relative exposure time to the cryoprotectant.

Mammalian embryos are particularly sensitive to thermal shock [47,48]. The thermal stress may result in homeostatic regulator production as chaperones [15], apoptosis related proteins [61] and expression of genes associated with development capacity as *CDX2* [52]. The balance between pro and anti-apoptotic family members partially determines sensitivity of cell to apoptosis. Anti-apoptotic genes as *BCL2* interact with pro-apoptotic *BAX* genes to counteract their activity. Activation of *BAX* proteins lead to a breakdown in outer mitochondrial membrane permeability, the release of cytochrome C in cytoplasm, and the activation of caspases responsible for cell death. In the present study, we observed higher expression of the *BAX* gene in embryos from VT, compared to CTL and SF. These data suggest a greater pro-apoptotic stimulus in VT embryos compared to the other groups. These data indicate a greater pro-apoptotic stimulus in VT embryos compared to the other groups.

Regardless of cryopreservation technique (SF or VT), *CDX2* gene expression was up-regulated compared to fresh embryos, but this result could hypothetically be affected by the

slightly different developmental stages of embryos in the three groups. Studies in cattle and sheep have shown that *IFNT* expression is *CDX2*-dependent [49], which is expressed in blastocysts [6,14,27] and *IFNT* is important signaling the process of maternal recognition of pregnancy [24,26,46]. Increased expression of this gene in cryopreserved embryos (SF and VT) may be a strategy to boost IFN- τ production, since secretion of this protein is compromised in cattle cryopreserved embryos [3]. Supporting this hypothesis, we also observed an increase in *TGFB1* expression in VT-embryos compared to the CTL. The TGF- β 1 is a polypeptide member of the TGF- β superfamily of cytokines. This protein when secreted stimulates cell proliferation and differentiation [4,25,30,57]. It is reasonable to assume that its increased expression may be a compensatory mechanism to prevent embryonic death.

In the present study, regardless of the technique, embryo cryopreservation did not affect the expression of *NANOG*, suggesting that cellular stress during cryopreservation does not compromise the ability of embryonic pluripotency to be maintained [9]. Similarly, *NRF1* expression was also unaffected by cryopreservation. These data suggest the need for increased expression of the *NRF1* gene to supply the cell energy production capacity. However, analysis of this gene immediately after cryopreservation demonstrates that its expression is unaffected by ultrastructural and cytotoxic damage, which sheep embryos suffer during cryopreservation [12].

Although *in vitro* culture analyzes were similar between groups, the VT group had a significant increase in the expression of all genes, except for *NANOG* and *NRF1*. We believe that the increase of pro-apoptotic gene (*BAX*) found in VT compared to SF, occurred due to high concentration of cryoprotectants used in this technique, stimulating response of cellular stress, due to chemical toxicity or osmotic on cells, beyond to cold stress of cryopreservation [41]. Leoni et al. [31] evaluated genes related to the water movement (*AQP3*: Aquaporin 3/*ATP1A1*: ATPase Na⁺/K⁺ transporting subunit alpha 1) of IVP sheep blastocyst after VT.

After warming, embryos were cultured for 8 h and 16 h, and the gene expression was evaluated on re-expanded blastocysts. The authors observed the decrease of *ATP1A1* and increased of *AQP3* from 8 h to 16 h, being so inversely proportional. In addition, Iwayama et al. [28] and Frank et al. [22] suggested that VT technique compromises the primary mechanism of water movement by *ATP1A1*, activating a second movement mechanism by *AQP3*. However, *AQP3* is known for its non-exclusive water permeability, being also permeable to other small solutes and glycerol [7]. In our study, glycerol was used in the TV protocol, resulting in greater intracellular toxicity, response to cell stress and apoptosis than in SF, possibly due to the increase in cryoprotectant influx by *AQP3*. This corroborates with the up-regulation of the *BAX* pro-apoptotic gene founded in vitrified IVD sheep embryos.

In conclusion, *in vivo*-derived embryos submitted to either SF or VT have similar ability to survive *in vitro* but VT led to increased changes in blastocyst gene expression compared to CTL and SF.

Acknowledgements

The authors thank Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) (Project 22.13.06.026.00.05), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) (Project 434302/2018-0) and FAPERJ (Carlos Chagas Filho Foundation for Support to Research in the State of Rio de Janeiro) for financial support. VLB, ALRSM and JMGS-F are FAPERJ fellows and JFF, JMGS-F and FZB are CNPq fellows.

References

- [1] H. Abe, S. Yamashita, T. Satoh, H. Hoshi. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media, *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2002) 57-66.
- [2] J.M. Adams, S. Cory. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene* 26 (2007) 1324-1337.

- [3] M.C.C. Araújo, V.R. Vale Filho, A.M. Ferreira, W.F. Sá, J.B. Barreto Filho, L.S.A. Camargo, R.V. Serapião, M.V.G.B Silva. Interferon tau secretion in cattle embryos *in vitro* fertilized before and after cryopreservation, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57 (2005) 751-756.
- [4] A. Barrera, E. García, D. Miceli. Effect of exogenous transforming growth factor $\beta 1$ (*TGF- $\beta 1$*) on early bovine embryo development, Zygote 26 (2018) 232-241.
- [5] R.I.T.P. Batista, M.C.S. Luciano, D.I.A. Teixeira, V.J.F. Freitas, L.M. Melo. Methodological strategies for transgene copy number quantification in goats (*Capra hircus*) using Real-Time PCR, Biotechnol. Prog. 30 (2014) 1390-1400.
- [6] D.K. Berg, C.S. Smith, D.J. Pearton, D.N. Wells, R. Broadhurst, M. Donnison, P. L. Pfeffer. Trophectoderm lineage determination in cattle, Develop. Cell 20 (2011) 244-255.
- [7] M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. Annu. Rev. Biochem. 68 (1999) 425-458.
- [8] V.P. Chakravarthi, S.S. Kona, A.V.S. Kumar, M. Bhaskarand, V.H. Rao. Quantitative expression of antiapoptotic and proapoptotic genes in sheep ovarian follicles grown *in vivo* or cultured *in vitro*, Theriogenology 83 (2015) 590-595.
- [9] I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, Cell 113 (2003) 643-655.
- [10] M.R. Chiaratti, C.R. Ferreira, F. Perecin, S.C. Meo, J.R. Sangalli, L.G. Mesquita, J.C. Carvalho Balieiro, L.C. Smith, J.M. Garcia, F.V. Meirelles. Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. Reprod. Biomed. Online 22 (2011) 172-183.
- [11] L. Dalcin, C.M. Lucci. Cryopreservation of livestock embryos: cryobiological principles and current status, Rev. Bras. Reprod. Anim. 34 (2010) 149-159.
- [12] L. Dalcin, R.C. Silva, F. Paulini, B.D.M. Silva, J.P. Neves, C.M. Lucci. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos, Cryobiology 67 (2013) 137-145.
- [13] M. Dattena, G. Ptak, P. Loi, P. Cappair, Survival and viability of vitrified *in vivo* and *in vitro* produced ovine blastocysts, Theriogenology 53 (2000) 1511-1519.

- [14] S.A. Degrelle, E. Champion, C. Cabau, F. Piumi, P. Reinaud, C. Richard, J-P. Renard, I. Huea. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts, *Develop. Biol.* 288 (2005) 448-46.
- [15] J.L. Edwards, P.J. Hansen. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes, *Biol. Reprod.* 55 (1996) 341-346.
- [16] A. El-Sayed, M. Hoelker, F. Rings, D. Salilew, D. Jennen, E. Tholen, M.A. Sirard, K. Schellander, D. Tesfaye. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients, *Physiol. Genomics* 28 (2006) 84-96.
- [17] T. Fair, P. Lonergan, A. Dinnyes, D.C. Cottell, P. Hyttel, F.A. Ward, M.P. Boland. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production, *Mol. Reprod. Dev.* 58 (2001) 186-195.
- [18] L.M. Figueira, N.G. Alves, J.M.G. Souza-Fabjan, R.I.T.P. Batista, L.C. Souza, A.L.R.S. Maia, V.L. Brair, M. Filgueiras, G.N. Souza, J.F. Fonseca. Superovulation and transcervical embryo recovery in Lacaune ewes raised under tropical conditions, *Anim. Reprod. Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)* 15 (2018) 402.
- [19] L.M. Figueira, N.G. Alves, R.I.T.P. Batista, V.L. Brair, R.R. Lima, M.E.F. Oliveira, J.F. Fonseca, J.M.G. Souza-Fabjan. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep, *Reprod. Domest. Anim.* 54 (2019), 1493-1496.
- [20] J.F. Fonseca, R.I.T.P. Batista, J.M.G. Souza-Fabjan, M.E.F. Oliveira, F.Z. Brandão, J.H.M. Viana. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70 (2018) 1489-1496.
- [21] J.F. Fonseca, F.N. Zambrini, J.D. Guimarães, M.R. Silva, M.E.F. Oliveira, F.Z. Brandão, P.M. Bartlewski, J.M.G. Souza-Fabjan. Combined treatment with estradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and non-surgical embryo recovery in ewes, *Reprod. Domest. Anim.* 54 (2018) 118-125.
- [22] L.A. Frank, R.D. Rose, M.R. Anastasi, T.C.Y. Tan, M.F. Barry, J.G. Thompson, H.M. Brown. Artificial blastocyst collapse prior to vitrification significantly improves Na⁺/K⁺-ATPase-dependent post-warming blastocoel re-expansion kinetics without inducing

endoplasmic reticulum stress gene expression in the mouse, *Reprod. Fert. Develop.* 31 (2018) 294-305.

[23] A. Gibbons, M.I. Cueto, F. Pereyra Bonnet, A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation, *Small Rum. Res.* 95 (2011) 61-64.

[24] J.D. Godkin, F.W. Bazer, J. Moffatt, F. Sessions, R.M. Roberts. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at Day 13–21, *Reprod.* 65 (1982) 141-150.

[25] P. HosseinNia, M. Tahmoorespur, S.M. Hosseini, M. Hajian, S. Ostadhosseini, M. R. Nasiri, M.H. Nasr-Esfahani. Stage-specific profiling of Transforming Growth Factor- β , fibroblast growth factor and wingless-int signaling pathways during early embryo development in the goat, *Cell J.* 17 (2016) 648-658.

[26] K. Imakawa, R.V. Anthony, M. Kazemi, K.R. Marotti, H.G. Polites, R.M. Roberts. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm, *Nature* 330 (1987) 377-379.

[27] K. Imakawa, M. Kim, F. Matsuda-Minehata, S. Ishida, M. Iizuka, M. Suzuki, K. Chang, S.E. Echternkamp, R.K. Christenson. Regulation of the ovine interferon-tau gene by a blastocyst-specific transcription factor, CDX2, *Mol. Reprod. Dev.* 73 (2006) 559-567.

[28] H. Iwayama, S. Hochi, M. Yamashita. *In vitro* and *in vivo* viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification, *J. Assist. Reprod. Genet.* 28 (2011) 355-361.

[29] J.L. Juengel, A.H. Bibby, K.L. Reader, S. Lun, L.D. Quirke, L.J. Haydon, K.P. McNatty. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep, *Reprod. Biol. Endocrin.* 78 (2004) 1-11.

[30] W.A. Kues, S. Sudheer, D. Herrmann, J.W. Carnwath, V. Havlicek, U. Besenfelder, H. Lehrach, J. Adjaye, H. Niemann. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development *in vivo*, *P.N.A.S.* 105 (2008) 19768-19773.

[31] G.G. Leoni, F. Berlinguer, S. Succu, D. Bebbere, F. Mossa, M. Madeddu, S. Ledda, L. Bogliolo, S. Naitana. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after

vitrification and to predict their transfer into recipients, *Mol. Reprod. Develop.* 75 (2008) 373-382.

[32] K.J. Livak, T.D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, *Methods* 25 (2001) 402-408.

[33] B. Lledo, J.A. Ortiz, R. Morales, E. García-Hernández, J. Ten, A. Bernabeu, J. Llácer, R. Bernabeu. Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome, *Hum. Reprod. Open* 4 (2018) 1-9.

[34] T.V. Marsico, J. Camargo, R.S. Valente, M.J. Sudano. Embryo competence and cryosurvival: Molecular and cellular features, *Anim. Reprod.* 16 (2019) 423-439.

[35] P. May-Panloup, M.F. Chretien, C. Jacques, C. Vasseur, Y. Malthiery, P. Reynier. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency, *Hum. Reprod.* 20 (2005) 593-597.

[36] National Research Council - NRC, 2007. Nutrient Requirements of Goats, (The National Academies Press, Washington, D.C.), 2007.

[37] P.N. Nau, T.V. Natta, J.C. Ralphe, C.J. Teneyck, K.A. Bedell, C.A. Caldarone, J.L. Segar, T.D. Scholz. Metabolic adaptation of the fetal and postnatal ovine heart: regulatory role of hypoxia-inducible factors and nuclear respiratory factor-1, *Pediatr. Res.* 52 (2002) 269-278.

[38] T. O'Connor, I. Wilmut, J. Taylor. Quantitative evaluation of reference genes for real-time PCR during *in vitro* maturation of ovine oocytes, *Reprod. Dom. Ani.* 48 (2013) 477-483.

[39] S. Papadopoulos, D. Rizos, P. Duffy, M. Wade, K. Quinn, M.P. Boland, P. Lonergan, Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts, *Anim. Reprod. Sci.* 74 (2002) 35-44.

[40] B.C. Paria, K.L. Jones, K.C. Flanders, S.K. Dey. Localization and binding of transforming growth factor- β isoforms in mouse preimplantation embryos and in delayed and activated blastocysts, *Dev. Biol.* 151 (1992) 91-104.

[41] D.E. Pegg. Principles of cryopreservation. *Methods Mol. Biol.* 1257 (2015) 3-19.

[42] M.W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, T.P. Neuvians. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best Keeper-Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 509-515.

- [43] A. Ralston, J. Rossant. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo, *Dev. Biol.* 313 (2008) 614-629.
- [44] C. Ramakers, J.M. Ruijter, R.H.L. Deprez, A.F.M. Moorman. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data, *Neurosci. Lett.* 339 (2003) 62-66.
- [45] D. Rizos, F. Ward, P. Duffy, M.P. Boland, P. Lonergan. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality, *Mol. Reprod. Dev.* 61 (2002) 234-248.
- [46] R.M. Roberts, D.W. Leaman, J.C. Cross. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants, *Exp. Biol. Med.* 200 (1992) 7-18.
- [47] R. Romão, E. Bettencourt, R.M.L.N. Pereira, C.C. Marques, M.C. Baptista, J.P. Barbas, E. Oliveira, C. Bettencourt, M. Sousa. Ultrastructural characterization of fresh and vitrified *in vitro* and *in vivo* produced sheep embryos, *Anat. Hist. Emb.* 45 (2015) 231-239.
- [48] M. Sakatani, L. Bonilla, K.B. Dobbs, J. Block, M. Ozawa, S. Shanker, J. Yao, P.J. Hansen. Changes in the transcriptome of morula-stage bovine embryos caused by heat shock: relationship to developmental acquisition of thermotolerance, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:3 (2013).
- [49] T. Sakurai, H. Bai, T. Konno, A. Ideta, Y. Aoyagi, J.D. Godkin, K. Imakawa. Function of a transcription factor cdx2 beyond its trophectoderm lineage specification, *Endocrinology* 151 (2010) 5873-5881.
- [50] D. Sanna, A. Sanna, L. Mara, S. Pilichi, A. Mastinu, F. Chessa, L. Pani, M. Dattena. Oct4 expression in in-vitro-produced sheep blastocysts and embryonic-stem-like cells, *Cell Biol. Int.* 34 (2010) 53-60.
- [51] N. Schrode, P. Xenopoulos, A. Piliszek, S. Frankenberg, B. Plusa, A.K. Hadjantonakis. Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo, *Genesis* 51 (2013) 219–233.
- [52] C.F. Silva, E.S. Sartorelli, A.C.S. Castilho, R.A. Satrapa, R.Z. Puelkera, E.M. Razza, J.S. Ticianelli, H.P. Eduardo, B. Loureiro, C.M. Barros. Effects of heat stress on development,

quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*, *Theriogenology* 79 (2013) 351-357.

[53] E.C. Spikings, J. Alderson, J.C. St John. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer, *Hum. Reprod. Update* 12 (2006) 401-415.

[54] J.C. St John, J. Facucho-Oliveira, Y. Jiang, R. Kelly, R. Salah. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells, *Hum. Reprod. Update* 16 (2010) 488-509.

[55] R.O. Stephenson, J. Rossant, P.P.L. Tam. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes, *CSH Perspect. Biol.* 4 (2012) a008235.

[56] D.A. Stringfellow, M.D. Givens, *Manual of the International Embryo Transfer Society*, fourth ed., International Embryo Transfer Society, Champaign, 2010.

[57] S. Sudheer, J. Adjaye. Functional genomics of human pre-implantation development, *Brief. Funct. Genomic* 6 (2007) 120-132.

[58] J. Suiter. Body condition scoring in sheep and goats, *Farmnote* (1994) 69-94.

[59] G.A. Thouas, A.O. Trounson, G.M. Jones. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 366-373.

[60] F.C. Varago, V.S. Moutacas, B.C. Carvalho, R.V. Serapião, F. Vieira, H. Chiarini-Garcia, F.Z. Brandão, L.S. Camargo, M. Henry, M.A. Lagares. Comparison of conventional freezing and vitrification with dimethylformamide and ethylene glycol for cryopreservation of ovine embryos, *Reprod. Dom. Anim.* 49 (2014) 839-844.

[61] R.J. Youle, A. Strasser. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 (2008) 47-59.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da expressão dos genes da proliferação celular (*TGFB1*), atividade mitocondrial (*NRF1*), manutenção da pluripotência (*NANOG*), diferenciação do trofotoderma (*CDX2*) e reguladores da apoptose (*BAX* e *BCL2*) de embriões ovinos produzidos *in vivo* vitrificados ou congelados lento revelou um maior entendimento sobre a interferência das duas técnicas de criopreservação na qualidade e implantação do embrião. Diante dos resultados deste estudo, a técnica de vitrificação dos embriões produzidos *in vivo* mostrou-se mais sensível após aquecimento, em comparação com a técnica de congelamento lento. Indicando que a utilização da congelamento lento como técnica de criopreservação pode ser a mais confiável para manter a qualidade de embriões ovinos produzidos *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Current Opinion in Immunology**, v.19; p.488-496, 2007.

AOUACHERIA, A.; BRUNET, F.; GOUY, M. Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. **Molecular Biology**, v.22; p.2395-2416, 2005.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.81; p.96-102, 2014.

ARAV, A.; SARAGUSTY, J. Preservation of gametes and embryos, in: H. Niemann, C. Wrenzycki (eds.). *Animal Biotechnology 1*. **Springer**, part of Springer Nature 2018, p. 235-267.

BATISTA, R.I.T.P.; LUCIANO, M.C.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M. Methodological strategies for transgene copy number quantification in goats (*Capra hircus*) using Real-Time PCR. **Biotechnology Program**, v.30; p.1390-1400, 2014.

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

BHAT, M H.; SHARMA, V.; KHAN, F. A.; NAIKOO, N. A.; YAQOOB, S. H.; VAJTA, G.; KHAN, H. M.; FAZILI, M. R.; GANAI, N. A.; SHAH, R.A. Open pulled straw vitrification and slow freezing of sheep IVF embryos using different cryoprotectants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.27; p.1175-1180, 2015.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v.113; p.643-655, 2013.

CHIARATTI, M. R.; BRESSAN, F. F.; FERREIRA, C. R.; CAETANO, A. R.; SMITH, L. C.; VERCESI, A. E.; MEIRELLES, F. V. Embryo mitochondrial dna depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.82; p.76–85, 2010.

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34; n.3; p.149-159, 2010.

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

DISKIN, M.G.; MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43; p.260–267, 2008.

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

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; BATISTA, R.I.T.P.; SOUZA, L.C.; MAIA, A.L.R.S.; BRAIR, V.L.; FILGUEIRAS, M.; SOUZA, G.N.; FONSECA, J.F. Superovulation and transcervical embryo recovery in Lacaune ewes raised under tropical conditions. **Animal Reproduction**, Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), v.15; p.402, 2018.

FIGUEIRA, L.M.; ALVES, N.G.; BATISTA, R.I.T.P.; BRAIR, V.L.; SOUZA, L.C.; MAIA, A.L.R.S.; LIMA, R.R.; OLIVEIRA, M.E.F.; FONSECA, J.F.; SOUZA-FABJAN, J.M.G. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, 2019. DOI: 10.1111/rda.13550.

FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRANDÃO, F. Z.; BATISTA, R. I. T. P.; GARCIA, A. R.; BARTLEWSKI, P. M.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. **Reproduction, Fertility and Development**, v.31; p.17-26, 2018a.

FONSECA, J. F.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRANDÃO, F. Z.; VIANA, J. H. M. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70; p.1489-1496, 2018b.

FONSECA, J. F.; ZAMBRINI, F. N.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. E. F.; BRANDÃO, F. Z.; BARTLEWSKI, P. M.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54; p.118-125, 2019.

GIBBONS, A.; CUETO, M.I.; PEREYRA BONNET, F. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.95; p.61–64, 2011.

GIBBONS, A.; BRUNO-GALARRAGA, M.; FERNANDEZ, J.; GONZALEZ-BULNES, A.; CUETO, M. Vitrified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. **Animal Reproduction**, v.16; p.297-301, 2019.

GUO, X.; WANG, X.F. Signaling crosstalk between *TGF-beta/BMP* and other pathways. **Cellular Research**, v.19; p.71–88, 2009.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Hafez. Fertilization and Cleavage. **Reproduction in Farm Animals**, 110–125, 2000. doi:10.1002/9781119265306.ch8

HAN, Z.; JING, Y.; ZHANG, S.; LIU, Y.; SHI, Y.; WEI, L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. **Cell & Bioscience**, v.2; p.1-8, 2012.

HERRICK, J.R. Comparative embryo culture- Methods and protocols. Department of reproductive sciences, first ed. Omaha, USA. **Methods in Molecular Biology**, 2019.

HOCHI, S.; TERAOKA, T.; KAMEI, M.; HIRAO, M.; HIRABAYASHI, M. Vitrication of pronuclear stage rabbit zygotes by different ultra-rapid cooling procedures. **Theriogenology**, v.59; p.303-306, 2003.

HOME, P.; RAY, S.; DUTTA, D.; BRONSHTEYN, I.; LARSON, M.; PAUL, S. GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates *CDX2* gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v.284; p.28729-28737, 2009.

INGMAN, W. V.; ROBKER, R. L.; WOITTEZ, K.; ROBERTSON, S. A. Null mutation in transforming growth factor $\beta 1$ disrupts ovarian function and causes oocyte incompetence and early embryo arrest. **Endocrinology**, v.147; p.835-845, 2006.

IMAKAWA, K.; KIM, M.; MATSUDA-MINEHATA, F.; ISHIDA, S.; IIZUKA, M.; SUZUKI, M.; CHANG, K.; ECHTERNKAMP, S. E.; CHRISTENSON, R. K. Regulation of the ovine interferon-tau gene by a blastocyst specific transcription factor, *CDX2*. **Molecular Reproduction and Development**, v.73; p.559-567, 2006.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY. **Embryo Technology Newsletter**, v.36; n.4, p.1-46, 2018.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v.88; p.347-354, 1997.

KANKA, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. **Theriogenology**, v.59; p.3-19, 2003.

LATHAM, K. E.; SCHULTZ, R. M. Embryonic genome activation. **Frontiers in Bioscience**, v.6; p.748-759, 2001.

LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; POLLARD, J.W. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.42; p.43-53, 1996.

LEUNG, L.; KWONG, M.; HOU, S.; LEE, C.; CHAN, J. Y. Deficiency of the *NRF1* and *NRF2* transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v.278; p.48021-48029, 2003.

LIMA, I.M.T.; SOUZA, A.L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33; p.194-202, 2009.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ Method. **Methods**, v.25; p.402-408, 2001.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of *in vitro* produced ovine embryos. **Small Ruminant Research**, v.63; p.288-296, 2006.

MAY-PANLOUP, P.; VIGNON, X.; CHRÉTIEN, M.; HEYMAN, Y.; TAMASSIA, M.; MALTHIÈRE, Y.; REYNIER, P. Increase of mitochondrial DNA content and

transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3; p.1-8, 2005.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote** v.8; p. 87-96, 2000.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, E.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, n.22; p.113-118, 2009.

MORADI, M.; RIASI, A.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, M.; HOSSEINNIA, P.; NASR-ESFAHANI, M. H. Expression profile of *FGF* receptors in preimplantation ovine embryos and the effect of *FGF2* and PD173074. **Growth Factors**, v.33; p.393-400, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2007. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**, (The National Academies Press, Washington, D.C.), 2007.

OHNISHI, Y.; HUBER, W.; TSUMURA, A.; KANG, M.; XENOPOULOS, P.; KURIMOTO, K.; OLEŠ, A. K.; ARAÚZO-BRAVO, M. J.; SAITOU, M.; HADJANTONAKIS, A.; HIIRAGI, T. Cell-to-cell expression variability followed by signal reinforcement progressively segregates early mouse lineages. **Nature Cell Biology**, v.16; p.27-37, 2014.

PARIA, B. C.; JONES, K. L.; FLANDERS, K. C.; DEY S. K. Localization and Binding of Transforming Growth Factor- β Isoforms in Mouse Preimplantation Embryos and in Delayed and Activated Blastocysts. **Developmental Biology**, v.151; p.91-104, 1992.

PEGG D. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20; p.5-13, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience**, v.339; p.62–66, 2003.

SAKURAI, T.; BAI, H.; KONNO, T.; IDETA, A.; AOYAGI, Y.; GODKIN, J. D.; IMAKAWA, K. Function of a Transcription Factor CDX2 Beyond Its Trophectoderm Lineage Specification. **Endocrinology**, v.12; p.5873-5881, 2010.

SANTOS, J. D. R; ARASHIRO, E. K. N; BALARO, M. F. A.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PINTO, P. H. N.; SOUZA, C. V.; LEITE, C. R.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Cervical transposition test using Hegar dilator at oestrus as a tool to select ewes for transcervical embryo collection. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54; p.126-128, 2018.

SRITANAUDOMCHAI, H.; SPARMAN, M.; TACHIBANA, M.; CLEPPER, L.; WOODWARD, J.; GOKHALE, S.; WOLF, D.; HENNEBOLD, J.; HURLBUT, W.; GROMPE, M.; MITALIPOV, S. *CDX2* in the formation of the trophectoderm lineage in primate embryos. **Development Biology**, v.335; p.179-187, 2009.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Manual of the international embryo transfer society, fourth ed., Champaign, **International Embryo Transfer Society**, 2010.

SUITER, J. Body condition scoring in sheep and goats, **Farmnote**, p. 69-94, 1994.

TAM, P. P. L.; LOEBEL, D. A. F. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. **Nature Reviews Genetics**, v.8; p.368-381, 2007.

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

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

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

VARAGO, F. C.; MOUTACAS, V. S.; CARVALHO, B. C.; SERAPIÃO, R. V.; VIEIRA, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; BRANDÃO, F. Z.; CAMARGO, L. S.; HENRY, M.; LAGARES, M. A. Comparison of conventional freezing and vitrification with dimethylformamide and ethylene glycol for cryopreservation of ovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49; p.839-844, 2014.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v.4; p.1-9, 2008.

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

WHITE, M. D.; ZENKER, J.; BISSIERE, S.; PLACHTA, N. Instructions for Assembling the Early Mammalian Embryo. **Developmental Cell**, v.45; p.667-679, 2018.

YAO, C.; ZHANG, W.; SHUAI, L. The first cell fate decision in preimplantation mouse embryos. **Cell Regeneration**, v.8; p.51-57, 2019.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, v.67; p.81–89, 2007.

YOULE, R.J.; STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.9; p.47-59, 2008.

YOUNG, T.; ROWLAND, J. E.; VAN DE VEN, C.; BIALECKA, M.; NÓVOA, A. *CDX* and *HOX* genes differentially regulate posterior axial growth in mammalian embryos. **Developmental Cell**, v.17; p.516-526, 2009.

ZHANG, Y.; XIANG, Y. Molecular and cellular basis for the unique functioning of *NRF1*, an indispensable transcription factor for maintaining cell homeostasis and organ integrity. **Biochemistry Journal**, v.8; p.961-1000, 2016.

8 ANEXOS

8.1 CERTIFICADO CEUA



Universidade
Federal
Fluminense



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA A OTIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E EMBRIÕES EM OVINOS", protocolada sob o CEUA nº 5956101218 (ID 000364), sob a responsabilidade de **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan e equipe; Ana Lucia Rosa e Silva Maia; Rodrigo Oliveira Cunha; Viviane Lopes Brair** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 10/01/2019.

We certify that the proposal "DIFFERENT STRATEGIES FOR OPTIMIZING THE EFFICIENCY OF THE TECHNIQUE OF CRYOPRESERVATION OF SEMEN AND EMBRYOS IN SHEEP", utilizing 40 Ovines (males and females), protocol number CEUA 5956101218 (ID 000364), under the responsibility of **Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan and team; Ana Lucia Rosa e Silva Maia; Rodrigo Oliveira Cunha; Viviane Lopes Brair** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 01/10/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **12/2021** Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Ovinos** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 6 anos** N: **40**

Linhagem: **Santa Inês** Peso: **45 a 100 kg**

Local do experimento: O estudo será realizado em diferentes instalações da Universidade Federal Fluminense. A obtenção dos embriões e sêmen será realizada na FECM - Fazenda Escola Cachoeiras de Macacu, em Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro (RJ). As análises espermáticas pós-descongelamento, o cultivo embrionário, avaliações morfológicas, bioquímicas e moleculares serão realizadas na Faculdade de Veterinária da UFF, Niterói, Rio de Janeiro (RJ).

Niterói, 10 de janeiro de 2019

Prof. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Dr. Fabio Otero Ascoli
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

8.2 RESUMO PREMIADO NA SEMAMBRA

Resumo apresentado na SEMAMBRA pela bolsista de iniciação científica, Nathalia Oliveira, vinculada a este estudo na “I Mostra de Trabalho da Semana Acadêmica Américo Braga”, na Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói (Brasil). No período de 24 a 25 de outubro de 2019, recebendo prêmio de destaque.

Qualidade embrionária e taxa de re-expansão de embriões ovinos submetidos às técnicas de vitrificação e congelação lenta

Viviane Lopes Brair¹, Nathalia Oliveira Barbosa^{1*}, Jasmine Bantim de Souza Pinheiro¹, Paulo Victor dos Santos Pereira¹, Lucas Francisco Leodido Correia¹, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista², Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, Brasil; ²Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) - Diamantina, MG.

E-mail: nathaliaoliveirabarbosa@id.uff.br

A criopreservação de embriões excedentes, por vitrificação ou congelação lenta, é bastante associada à múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) para preservação de germoplasma de ovelhas superiores, e comercialização. Portanto o objetivo deste estudo foi avaliar como as duas técnicas interferem nas taxas de re-expansão e no perfil de expressão de genes de qualidade embrionária. Foram (n=46) sincronizadas, superovuladas e submetidas a monta natural e coleta de embriões não cirúrgica. (FONSECA et al., 2016). Todas as estruturas recuperadas foram classificadas de acordo com a sua qualidade/estágio e divididas em três grupos de forma homogênea: vitrificação (VIT- 43 embriões); congelação lenta (CONG- 42 embriões); e controle (C-15 embriões congelados a seco). Protocolos de criopreservação consagrados em pequenos ruminantes foram utilizados para congelação lenta (MARTINEZ et al., 2006) e vitrificação (GIBBONS et al., 2011). Após o descongelamento (CONG- 27 embriões) e aquecimento (VIT- 28 embriões) dos embriões, eles foram cultivados *in vitro* (CIV) em meio SOFaa, por 48h, para avaliação Da taxa de re-expansão em 24/48h, e três grupos de cinco embriões foram congelados a seco para biologia molecular de cada grupo. Para expressão gênica foi utilizado o RNeasyMicro Kit (Qiagen Inc., Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante onde foi avaliado genes associados a qualidade embrionária (BAX, BCL2). As avaliações de re-expansão foram analisadas pelo Teste de Fisher e para a expressão gênica a eficiência do primer foi avaliada pelo LinRegPCR e quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método de Ct comparativo. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) na taxa de re-expansão dos embriões após o CIV entre o grupo de CONG e VIT, e foram respectivamente: 24h 29,6% (8/27) e 14,2% (4/28), e 48h 48,1% (13/27) e 32,1% (9/28). Na expressão do gene BAX, que possui características pró-apoptóticas, observou-se sua maior expressão ($p < 0.05$) em embriões do grupo VIT do que no grupo CONG. O gene BCL-2, com características anti-apoptóticas, observou-se maior expressão em embriões do grupo VIT ($p > 0,05$), do que no grupo CONG. Assim, esta técnica apresenta maior

influência na viabilidade/qualidade embrionária pós-aquecimento. Conclui-se que as duas técnicas se assemelham em relação a taxa de re-expansão *in vitro*, mas vitrificação apresentou maior expressão de genes relacionados a reguladores apoptóticos em relação a técnica de congelamento lenta.

Palavras-chave: criopreservação, expressão gênica