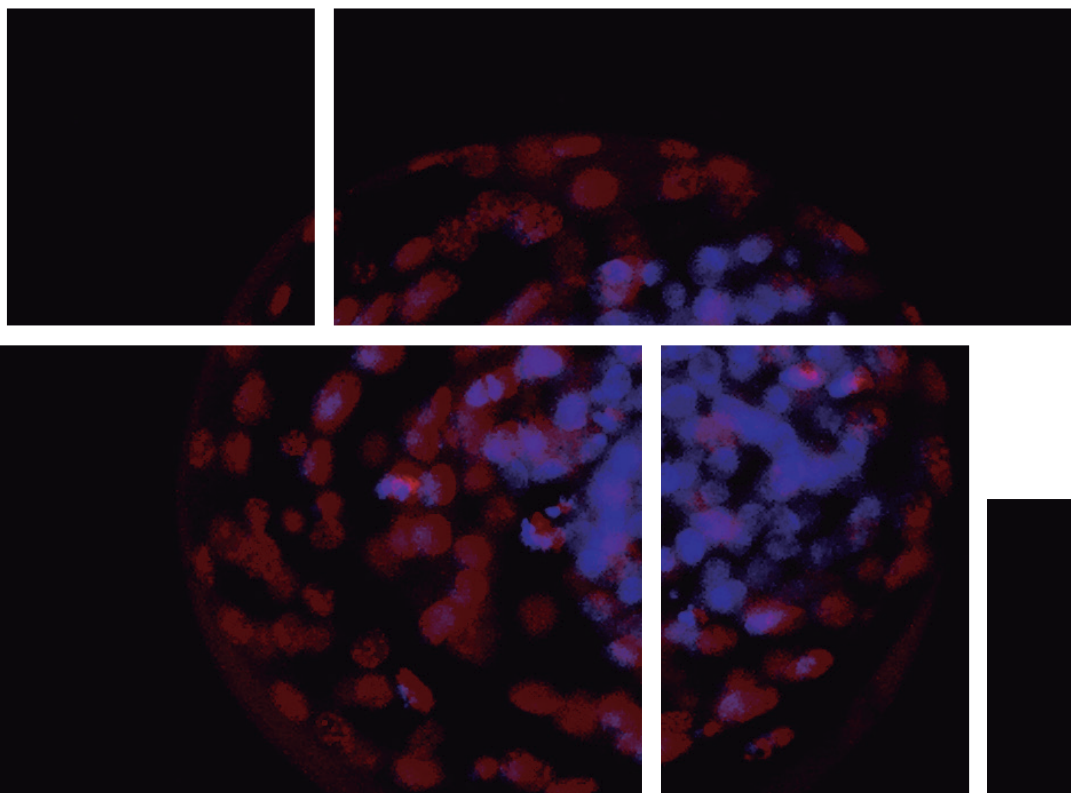


Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bovinos



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 363

Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bovinos

*Taynan Stonoga Kawamoto
Thais Preisser Pontello
Ricardo Alamino Figueiredo
Margot Alves Nunes Dode*

***Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2019***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na: Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
*Antonieta Nassif Salomão; Bianca Damiani
Marques Silva; Diva Maria Alencar Dusi;
Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista
Tavares da Silva; João Batista Teixeira;
Maria Cléria Valadares Inglis; Rosameres
Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Taynan Stonoga Kawamoto

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bo-
vinos / Taynan Stonoga Kawamoto ... [et al.]. – Brasília - DF : Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 2019.

31 p. : il. color. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
ISSN 0102-0110 ; 363).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.
Modo de acesso: World Wide Web:

1. Biotécnica reprodutiva. 2. Qualidade embrionária. 3. Eficiência reprodutiva. 4.
Transferência de embriões I. Kawamoto, Taynan Stonog. II. Pontello, Thais Preis-
ser. III. Figueiredo, Ricardo Alamino. IV. Dode, Margot Alves Nunes Série. V. Em-
brapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CDD (21. ed.) 577.55

Autores

Taynan Stonoga Kawamoto

Médica veterinária, mestre, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Thais Preisser Pontello

Médica veterinária, mestre, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Ricardo Alamino Figueiredo

Médico veterinário, doutor, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Margot Alves Nunes Dode

Médica veterinária, PhD, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Apresentação

A avaliação da qualidade do embrião é um fator determinante para o sucesso da produção in vitro de embriões (PIVE) e das demais técnicas de reprodução assistida, pois a seleção e transferência daqueles de melhor qualidade aumentam a taxa de gestação, melhorando a eficiência e reduzindo custos.

Rotineiramente, a seleção de embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida é realizada por avaliação morfológica. Porém, este método tem limitações por envolver observações subjetivas, como baixa repetibilidade e alta variação entre os avaliadores. Nos últimos anos, outros métodos têm sido desenvolvidos e utilizados na tentativa de se estabelecer uma seleção mais eficiente.

Um destes é o uso da coloração diferencial, método que informa, não somente sobre o número total de células, mas também identifica as células da massa celular interna, que darão origem ao embrião, e as células que darão origem à placenta. A identificação do número de cada um desses tipos celulares pode ser um indicativo mais preciso da qualidade embrionária.

As informações obtidas com essa técnica podem ser utilizadas juntamente com a morfologia para indicar, de forma mais precisa, a qualidade do embrião que foi produzido, auxiliando em biotécnicas reprodutivas tanto em bovinos como em outras espécies domésticas.

A técnica de coloração diferencial apresentada e discutida neste Documento pode ser associada a outros parâmetros, melhorando a precisão da avaliação geral em estudos que envolvem a produção de embriões in vitro, seja por fecundação in vitro, clonagem, ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides) ou outras biotécnicas reprodutivas. Por se tratar de uma técnica rápida, de baixo custo e que não exige equipamentos sofisticados, pode ser relativamente fácil de ser adotada por laboratórios de pesquisa e de ensino e também na conservação de recursos genéticos.

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe Geral

Sumário

Introdução	nº 9
Desenvolvimento embrionário inicial	nº 9
Importância da qualidade do embrião e métodos de avaliação	nº 11
Importância da avaliação da qualidade	nº 11
Avaliação morfológica	nº 12
Avaliações moleculares	nº 12
Cinética de desenvolvimento – idade e estágio embrionário	nº 14
Número de células totais e células apoptóticas	nº 14
Número de células totais, número de células do trofoblasto e o número de células da massa celular interna	nº 15
Técnica de coloração diferencial em embriões bovinos	nº 17
Material necessário	nº 17
Preparo das soluções	nº 18
Procedimento	nº 18
Estudos utilizando a coloração diferencial em embriões produzidos in vitro no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa	nº 20
Considerações Finais	nº 23
Referências	nº 24

Introdução

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 218,23 milhões de bovinos (IBGE, 2016), sendo 87,7% do rebanho de corte de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), dos quais se destaca a raça Nelore compondo 78% dos zebuínos do Brasil (Rosa et al., 2016). O país é considerado, ainda, o maior exportador de carne bovina, segundo maior produtor de carne, o quarto maior produtor de leite (FAO, 2017) e o maior produtor de embriões in vitro do mundo (Viana et al., 2017).

O embrião bovino produzido in vitro (PIV) é utilizado em larga escala no Brasil, tanto para fins comerciais quanto para fins de pesquisa. Estudos têm como objetivo melhorar a qualidade deste embrião produzido in vitro para que haja maiores taxas de concepção após um programa de transferência de embriões para vacas receptoras. Uma das formas de avaliação de qualidade é a avaliação morfológica, em que um embrião de maior qualidade não apresenta ou apresenta pouca extrusão e uniformidade no tamanho e coloração dos blastômeros. Embora a avaliação morfológica seja um parâmetro de qualidade de fácil execução e baixo custo, é também muito subjetiva e apresenta baixa repetibilidade e alta variação entre os avaliadores. Para minimizar esse problema, outros parâmetros do desenvolvimento embrionário podem ser associados a essa avaliação, aumentando sua eficácia. Portanto, existe a necessidade de se utilizar outras metodologias que avaliem a qualidade embrionária, como as análises moleculares, cinética do desenvolvimento, avaliação do número de células totais e de células apoptóticas do embrião (TUNEL), e coloração de células totais e células do trofoblasto do embrião (coloração diferencial). Com a coloração diferencial, pode-se verificar o número total de células, alocação dos tipos celulares e a proporção de massa celular interna (MCI) em relação ao número total de células do embrião. Assim, é possível presumir o potencial de desenvolvimento do embrião, uma vez que a MCI contribui para a formação do tecido fetal e o trofoblasto, para a formação da placenta (Fouladi-Nashta et al., 2005). No entanto, esta técnica é invasiva e inviabiliza o embrião, portanto deve ser utilizada, apenas, em pesquisa com a finalidade de auxiliar na identificação dos embriões de melhor qualidade. O objetivo deste é apresentar alguns dos métodos de avaliação embrionária disponíveis e descrever a técnica de coloração diferencial de embriões para a avaliação da qualidade de embriões bovinos.

Desenvolvimento embrionário inicial

Um ovócito competente é aquele capaz de maturar, ser fecundado e formar um embrião que seja apto a chegar a termo (Sirard et al., 2006). Essa

competência é adquirida durante o desenvolvimento folicular, e se completa um pouco antes do pico pré-ovulatório de LH. A competência se refere ao acúmulo de elementos essenciais para o desenvolvimento embrionário inicial, incluindo proteínas, RNAm, ribossomos e polipeptídeos (revisado por Fair, 2003). Portanto, o ovócito deve ser competente quando for estimulado a retomar e completar a meiose no período entre o pico de LH e a ovulação. Nesse período ocorre a maturação ovocitária, que é a preparação do ovócito para a fecundação.

A maturação do ovócito compreende dois eventos, a maturação citoplasmática e a nuclear. A maturação citoplasmática envolve a migração das mitocôndrias, redistribuição de organelas e acúmulo de grânulos corticais na periferia do ovócito (Van den Hurk e Zhao, 2005). Já a maturação nuclear envolve a retomada da meiose, que é a saída do ovócito do estágio de diplóteno da prófase I e a sua progressão até o estágio de metáfase II, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Esses eventos preparam o ovócito para a fecundação, momento em que o ovócito é estimulado a completar a segunda divisão meiótica e a liberar o segundo corpúsculo polar.

A fecundação ocorre com a união do gameta feminino e masculino. Quando o espermatozoide chega ao citoplasma do ovócito, induz uma liberação de Ca^{++} e a ativação do ovócito. Esta ativação refere-se a uma cascata de eventos que envolvem o término da maturação nuclear, com expulsão do segundo corpúsculo polar e formação do pró-núcleo feminino e masculino. Os pró-núcleos se aproximam no centro do ovócito e se juntam, processo denominado singamia, para formação do zigoto (Gonçalves et al., 2008).

Inicia-se, assim, o processo de clivagem no qual a primeira etapa é meridional, dividindo o zigoto em dois blastômeros iguais (Figura 1A), e ocorre por volta de 24-32 horas pós-fecundação. Já na segunda clivagem, um dos blastômeros se divide meridionalmente e outro equatorialmente, sendo denominada rotacional, e ocorre de 1 a 3 dias pós-fecundação. Quando o zigoto atinge a fase de 8-16 células (Figura 1C e 1D), acontece a ativação do genoma embrionário bovino (Kues et al., 2008), que resulta na degradação dos transcritos maternos e, a partir desse ponto, o embrião começa a utilizar seu próprio genoma para a síntese das proteínas necessárias para o seu desenvolvimento. Isto promove a autonomia do embrião e possibilita a continuidade das divisões mitóticas, aumentando o número de blastômeros e fazendo com que o embrião chegue à fase de 32-64 células (Figura 1E).

Nesse momento, há o aumento das adesões intercelulares, que promoverão maior interação entre os blastômeros e a compactação da mórula (Van Soom et al., 1997; Figura 1F). Desse modo, há o início da primeira diferenciação celular, em que as células mais externas da mórula darão origem ao trofoblasto e as mais internas originarão a MCI (Plusa e Hadjantonakis, 2016), com consequente perda da pluripotência celular (Demant et al.,

2015).

Após a compactação da mórula, as células próximas à zona pelúcida estabelecem seus sistemas de transporte de íons, que permitirão a passagem de líquidos e, conseqüentemente, a formação do blastocisto (revisado por Lima e Souza, 2009). Assim, inicia-se a entrada de fluido seroso no embrião e a formação da blastocele. O blastocisto inicial (Figura 1G) apresenta mais de 50% de MCI em relação à blastocele, com presença de zona pelúcida espessa. Com o avançar do desenvolvimento, forma-se o blastocisto (Figura 1H), quando o embrião apresenta 50% de MCI e 50% de blastocele. Então, há a formação do blastocisto expandido (Figura 1I), quando a MCI passa a ocupar menos de 50% do espaço do embrião, e o restante é preenchido pela blastocele. Neste estágio, a zona pelúcida torna-se mais fina. Uma combinação de processos, como a produção de lisinas pelo embrião e pelo endométrio e a expansão física do embrião, promove uma maior elasticidade e afinamento da zona pelúcida, o que leva ao seu rompimento (revisado por Hammadeh et al., 2011). Isto culmina com a eclosão do blastocisto (Figura 1J), o que se dá aos 7-8 dias de desenvolvimento em bovinos.

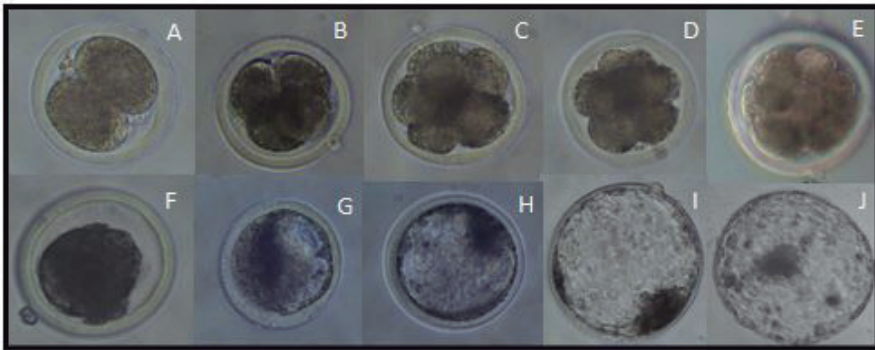


Figura 1. Embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. A: Embrião com duas células. B: Embrião com quatro células. C: Embrião com 8 células. D: Embrião com 16 células. E: Mórula inicial. F: Mórula compacta. G: Blastocisto inicial. H: Blastocisto. I: Blastocisto expandido. J: Blastocisto eclodido.

Importância da qualidade do embrião e métodos de avaliação

Importância da avaliação da qualidade

Um embrião de qualidade é aquele capaz de gerar prenhez e nascimento. Na produção *in vitro* de embriões, a taxa de fecundação dos ovócitos fica em torno de 75-80% (Gonçalves et al., 2014; Guimarães et al., 2014; Zhou et al., 2013), porém, apenas cerca de 40% desses possíveis zigotos

formam embriões, e destes, 30% a 40% serão capazes de gerar prenhez (Guemra et al., 2014; Wang et al., 2013). Esses resultados indicam a necessidade de se tornar mais acurados os métodos existentes e/ou se desenvolver novos parâmetros mais robustos para garantir que somente os melhores embriões sejam transferidos. Quanto mais acurado for o método, maior a chance de o embrião selecionado manter a gestação, aumentando assim a taxa de prenhez e a eficiência no uso das biotécnicas reprodutivas.

Avaliação morfológica

A avaliação morfológica é realizada visualmente sob estereomicroscópio e considera-se a idade do embrião, seu brilho, a presença de blastômeros irregulares, extrusão celular, vacuolização, morte ou fragmentação, alterações de cor ou tamanho, ausência de compactação e danos na zona pelúcida como parâmetros para avaliação (Viana, 2009). Assim, segundo a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS; Stringfellow e Seidel, 1998), os embriões produzidos *in vitro* podem ser classificados em graus I, II, III e IV. Essa classificação foi estabelecida por meio das características morfológicas observadas nos embriões produzidos *in vivo*. O embrião grau I é aquele que não apresenta ou apresenta pouca extrusão (pelo menos 85% de células embrionárias intactas) e é compatível com seu estágio de desenvolvimento esperado. O embrião grau II é aquele que apresenta extrusão celular, porém possui, pelo menos, 50% das células embrionárias intactas. O grau III possui extrusões celulares comprometendo mais de 50% das células embrionárias, com pouco potencial de desenvolvimento. E o grau IV é o embrião em degeneração, não viável.

A avaliação morfológica de embriões é a técnica mais utilizada para avaliação de qualidade por não ser invasiva. Nessa avaliação, aqueles embriões, classificados como os de alta qualidade, apresentam maiores taxas de prenhez em animais domésticos (revisado por Rocha et al., 2016) e em humanos (Balaban et al., 2000; Gardner e Schoolcraft, 1999). Entretanto, essa avaliação varia entre os técnicos por ser uma análise subjetiva e, além disso, diferenças nos sistemas de cultivo entre os laboratórios dificultam a comparação entre os embriões, apresentando pouca repetibilidade na avaliação.

Avaliações moleculares

Além da avaliação morfológica de qualidade do embrião, a análise de expressão de genes em embriões (Diógenes et al., 2017; Machado et al., 2013a; Machado et al., 2013b; Machado et al., 2012; Mundim et al., 2009;

Corrêa et al., 2008;) tem sido uma importante ferramenta para qualificar os embriões em diferentes estágios de desenvolvimento de forma mais objetiva. A seleção de genes, relacionados com desenvolvimento embrionário e taxas de prenhez, permite que sejam identificados biomarcadores de qualidade embrionária.

Vários estudos têm demonstrado diferenças entre a abundância relativa de alguns transcritos em embriões produzidos *in vivo* quando comparados aos produzidos *in vitro* (Machado et al., 2013a; Machado et al., 2013b). Essas alterações na expressão gênica poderiam explicar as diferenças na qualidade dos embriões PIV (Machado et al., 2013a; Machado et al., 2013b; Mundim et al., 2009;). Em geral, a escolha dos genes a serem utilizados é baseada nas diferenças encontradas no transcriptoma dos embriões com alta e baixa qualidade. Alguns genes já foram identificados como diferencialmente expressos em embriões, e têm sido utilizados como marcadores para qualidade embrionária, como HSP70, SLC2A1, SLC2A3, PIAC8, IGFIIPGK; DNMT3A, IFNT2, EGR1, YEAF, IDH, H2A e GPX1 (Diógenes et al., 2017; Bernal-Ulloa, et al., 2014; Valleh et al., 2014; Machado et al., 2013a; Machado et al., 2013b; Machado et al., 2012; Goovaerts et al., 2011; Stinshoff et al., 2011; Dode et al., 2006).

Recentemente, avaliações para observar alterações nos padrões epigenéticos também têm sido realizadas visando relacioná-las à qualidade embrionária. A dinâmica epigenética, que ocorre em embriões, pode ser alterada em resposta à biotécnica reprodutiva, à qual essas estruturas são submetidas. A produção *in vitro* de embriões, por exemplo, tem sido amplamente utilizada para aumentar a produção de animais com características de interesse, entretanto, sabe-se que estes embriões são menos viáveis do que aqueles produzidos *in vivo* (revisado por Urrego et al., 2014). Estes autores verificaram que esta menor qualidade poderia ser explicada por alterações epigenéticas que ocorrem durante o cultivo *in vitro*. A metilação em regiões satélites do DNA, por exemplo, difere entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Bernal-Ulloa et al., 2016). Assim, o padrão epigenético de embriões também deve ser estudado e melhor compreendido, visando estabelecer perfis que auxiliem na determinação de embriões de melhor qualidade.

A partir de painéis de biomarcadores, seria possível identificar embriões com maior capacidade de gerar prenhez, utilizando-se de informações de expressão gênica e de avaliações epigenéticas; também, como métodos de avaliação de qualidade embrionária. Entretanto, avaliações moleculares são invasivas e levam à morte do embrião utilizado. Por isso, a alternativa para se realizar estas avaliações sem causar danos irreversíveis para o embrião, seria o uso da biópsia em que apenas alguns blastômeros são removidos e utilizados para as análises, mantendo a viabilidade do embrião (de Sousa et al., 2017).

Cinética de desenvolvimento – idade e estágio embrionário

Outra avaliação não invasiva e que pode ser correlacionada com qualidade embrionária é a cinética/velocidade de desenvolvimento após a fecundação *in vitro*. Estudos, avaliando a cinética do desenvolvimento (Carrocera et al., 2016; Garcia et al., 2015; Asgari et al., 2012; Peippo et al., 2001; Holm et al., 1997), demonstraram que embriões com estágio mais avançado de desenvolvimento, às 44 horas após a inseminação, tiveram maiores taxas de desenvolvimento em mórulas e blastocistos do que aqueles menos desenvolvidos (Carrocera et al., 2016). Os embriões que clivam mais cedo são, possivelmente, os de melhor qualidade, e têm maior possibilidade de atingir o estágio de blastocisto do que os que clivam mais tarde. Além do momento da primeira clivagem, o estágio de desenvolvimento dos embriões no dia 7 do cultivo (D7) também pode ser utilizado para selecionar embriões. Estudos têm mostrado que, entre os blastocistos que são inseminados concomitantemente, os que se desenvolvem mais rápido são os de melhor qualidade (Wang et al., 2014). Além disso, os embriões com desenvolvimento mais acelerado tiveram maiores taxas de sobrevivência após a vitrificação (Asgari et al., 2012) e menores quantidades de células apoptóticas (Garcia et al., 2015). Portanto, a qualidade se refere, não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento, mas também à idade ou velocidade em que os embriões atingem determinado estágio do desenvolvimento.

A cinética de desenvolvimento pode ser avaliada pelo estágio do embrião, seja em horas pré-definidas (após a fecundação, padronizam-se determinados momentos para que os embriões sejam retirados da estufa e avaliados quanto ao seu estágio) ou por meio do método *time lapse*. A avaliação em horas pré-definidas pode ser realizada identificando-se os embriões que apresentam quatro ou mais células, quando se faz a avaliação da clivagem no segundo dia de cultivo (D2). Já com a tecnologia do *time lapse*, várias fotografias são registradas em intervalos de tempo fixo, sem a necessidade de se retirar e de manipular os embriões. Isso possibilita um contínuo monitoramento do embrião permitindo a observação do seu desenvolvimento de maneira dinâmica. A avaliação de cinética do desenvolvimento é, portanto, uma abordagem não invasiva, permitindo selecionar embriões de maior qualidade e com maior probabilidade de gerar prenhez (Aparicio et al., 2013; Herrero et al., 2013; Wong et al., 2013).

Número de células totais e células apoptóticas

A apoptose é um tipo de morte celular programada e tem grande importância durante o desenvolvimento embrionário. Elevadas taxas de apoptose levam a um embrião de menor qualidade e, conseqüentemente, com

baixa probabilidade de gerar prenhez (Matwee et al., 2000). Dentre as avaliações de apoptose por coloração destaca-se a técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), em que é avaliado o número de células totais por coloração com Hoechst 33342 e células apoptóticas, com Alexa Flúor. Nessa técnica, quando os blastômeros possuem o DNA fragmentado, há exposição das hidroxilas final 3', as quais servem de terminais iniciadores para a deoxinucleotidil terminal transferase (TdT), que tem como função a adição de deoxiribonucleotídeos marcados com BrdUTP (5-Bromo-2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate). Este é detectado com anticorpos anti-BrdU marcados com corante fluorescente. Esta análise permite avaliar o número total de células e a proporção de células apoptóticas, porém, não permite avaliar a quantidade de células da MCI e do trofoblasto e, assim, não informa sobre a alocação celular.

Número de células totais, número de células do trofoblasto e o número de células da massa celular interna

Estudos que têm por objetivo avaliar a qualidade do embrião utilizam técnicas de coloração com reagentes que têm afinidade por ácidos nucléicos, visando à contagem de células totais do embrião. Essa avaliação revela se determinado tratamento realizado durante o cultivo teve influência na quantidade total de células e, conseqüentemente, na qualidade do embrião (Laskowski et al., 2017; Inaba et al., 2016; Valleh et al., 2014). Considerando que embriões PIV, com maior número de células, têm maior probabilidade de manter a gestação, a contagem do número total de células tem sido extensivamente utilizada como indicador da qualidade embrionária (Caixeta et al., 2017; Guimarães et al., 2015; Corrêa et al. 2008; Pereira et al., 2005). Embora o número total de células também informe sobre a qualidade embrionária, esta é uma informação pouco consistente se analisada isoladamente. Um embrião com maior número de células totais é considerado um embrião de melhor qualidade, mas existem embriões no mesmo estágio de desenvolvimento, porém, de diferentes tamanhos e, conseqüentemente, com número de células totais diferente. No entanto, quando esses embriões são analisados quanto à proporção de células da MCI e trofoblasto, nota-se que, apesar do número total de células ser diferente, eles podem ter proporções celulares dentro da normalidade, fazendo com que eles possuam qualidades semelhantes.

Nesse sentido, surgiu a necessidade de avaliar o embrião analisando os diferentes tipos celulares e suas proporções a fim de se obter uma avaliação de qualidade embrionária mais consistente. Existem dois tipos celulares em um embrião de D7, que são as células da MCI e as do trofoblasto. As células da MCI contribuem para a formação do tecido fetal e parte das mem-

branas extraembrionárias; além de exercer importante função no processo de implantação, as células do trofoblasto são importantes para a formação da placenta e reconhecimento materno da gestação (Ochota et al., 2016; Fouladi-Nashta et al., 2005). Assim, a identificação do número de cada um desses tipos celulares é um indicativo mais preciso da qualidade embrionária do que apenas o conhecimento do número total de células. A coloração diferencial é o único método em que as células do trofoblasto e da MCI podem ser contadas de forma individual. Essa técnica pode ser realizada com anticorpos conjugados a corantes fluorescentes, o que, no entanto, a torna mais cara e trabalhosa. Outra maneira, de menor custo e simples de realizá-la é através de protocolo baseado no tempo de exposição, funcionalidade e permeabilidade da membrana celular a fluorocromos, como iodeto de propídeo (IP) e Bis-benzimides (Hoechst H33342). Enquanto o H33342 penetra em todas as células, o IP é incapaz de penetrar em células com membrana íntegra. Porém, após uma rápida exposição do embrião a um detergente, como o Triton-X, ocorre uma permeabilização das células do trofoblasto ao IP. Desta forma, todas as células são coradas com Hoechst, enquanto as células do trofoblastos são coradas com IP, permitindo a contagem diferencial destas células (Selokar et al. 2012; Van Soom, et al., 2001).

Estudos têm mostrado que embriões, que apresentam proporções de 20-40% de MCI em relação ao total de células, são considerados de boa qualidade e com potencial de sobrevivência após a transferência (Russel et al., 2006; Iwasaki et al., 1990). Já, embriões, que apresentam essa proporção abaixo de 20% ou acima de 40%, são considerados de baixa qualidade (Velazquez et al., 2012; Koo et al., 2002).

A validação dessa técnica, como indicativo de qualidade embrionária, foi relatada por vários autores (Bernal-Ulloa et al., 2014; Velazquez et al. 2012; Iwasaki et al., 1990). Nesses trabalhos, foi observado, pela técnica de coloração diferencial, que embriões bovinos produzidos *in vitro* são de pior qualidade quando comparados aos *in vivo* (Bernal-Ulloa et al., 2014; Iwasaki et al., 1990). No estudo de Velazquez et al. (2012), buscando mimetizar a condição de síndrome de ovário policístico em humanos, revelou-se que, quando ovócitos bovinos foram cultivados na presença de concentrações suprafisiológicas de IGF-I, os embriões formados eram hiperplásicos (com mais de 40% de proporção de MCI sobre o total de células), o que foi associado a perdas embrionárias precoces. Essa mesma característica foi observada em embriões produzidos pela técnica de transferência nuclear de células somáticas, em que a maioria dos embriões eram hiperplásicos (Koo et al., 2002) e, em geral, apresentavam altas perdas embrionárias e fetais.

Apesar de ser uma técnica invasiva, ela é de baixo custo, de rápida execução e fornece dados relevantes da qualidade embrionária. Esse tipo de avaliação é uma ferramenta fundamental para a pesquisa na área de embrio-

logia, uma vez que indica malefícios ou benefícios que diferentes técnicas de produção de embrião, alterações no meio de cultivo, variações ambientais, condições hormonais adversas e, até mesmo, a criopreservação possam causar aos embriões.

Técnica de coloração diferencial em embriões bovinos

Material necessário

- Embriões no estágio de blastocisto expandido
- Microscópio de fluorescência
- Lâmpada ultravioleta e microscópio com filtros de excitação de 460 nm (azul e vermelho) e 560nm (vermelho, apenas)
- Lâmina
- Lamínula
- Papel alumínio
- Slow Fade®
- Placa de Petri
- Placa de 4 poços
- Pipetas
- Ponteiras
- Contador de células
- Reagentes
- Hoechst 33342; Sigma®.
- Iodeto de propídeo – Propidium iodide; Molecular probe®
- Na₂HPO₄.2H₂O; Sigma®.
- Na₂HPO₄; Sigma®.
- NaCl; Sigma®.
- Polivinilpirrolidona (PVP); Sigma®.
- Paraformaldeído; Sigma®.
- Triton X-100; Sigma®.

Preparo das soluções

A técnica de coloração diferencial estabelecida no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA foi adaptada de Block et al. (2009).

1- 100 mM NaPO₄, pH 7.4

A solução de 100 mM de NaPO₄ é feita por meio da mistura de duas outras:

1a - 100 mM de NaH₂PO₄.2H₂O: 0,69 g de NaH₂PO₄ + q.s.p. 50 mL

de água MilliQ.

1b – 100 mM Na₂HPO₄: 0,71g de Na₂HPO₄ + q.s.p. 50 mL de água MilliQ.

Reservar 15 mL da solução 1b em um tubo e acrescentar a solução 1a, até o pH atingir o valor de 7,4.

2- PBS 10 mM

Utilizar 20 mL da solução 100 mM de NaPO₄, pH 7.4, + 1,8 g de NaCl + q.s.p. 200 mL de água MilliQ.

3- 10 mM PBS/PVP

Utilizar 50 mL de PBS 10 mM + 0,05 g de PVP (polivinilpirrolinona).

4- 4% de paraformaldeído

Preparar a solução de paraformaldeído a 20%, deixando-a estocada a 4°C. No dia da manipulação, preparar solução de paraformaldeído a 4%. Para a preparação do paraformaldeído a 4%, utilizar 200 µL de paraformaldeído a 20% e 800 µL de PBS/PVP.

5- Triton X-100 (0,3%)

Preparar nova solução de Triton X-100 a cada manipulação. Para isso, 3 µL de Triton X-100 são diluídos em 997 µL de PBS/PVP.

6- Iodeto de Propídeo (100 µg/mL) - IP

Preparar solução de IP (iodeto de propídeo) e armazenar a -20 °C na concentração de 2,0 mg/mL. No dia da coloração, pipetar 50 µL de IP e adicionar em 950 µL de solução de Triton X-100 (0,3%).

7- Hoechst 33342 (1µg/mL) - H33342

Preparar solução de Hoechst 33342 na concentração de 5,0 mg/mL e congelar (-20 °C) em alíquotas de 5 µL. No dia da coloração, pipetar 0,2 µL da alíquota de H33342 e adicionar em 1000 µL de Paraformaldeído a 4%.

Procedimento

Para a coloração dos embriões, são utilizadas duas placas de quatro poços. Na primeira placa, adicionam-se 500 µl da solução de iodeto de propídeo (IP), no primeiro poço e, 500 µl de PBS/PVP, nos outros três poços. Na segunda placa, adicionam-se 500 µl de solução de Hoechst 33342 (H33342) e 500 µl PBS/PVP nos demais poços (Figura 2). As soluções são, então, mantidas em placa aquecedora a 36 °C por, pelo menos, cinco minutos antes do início da coloração.

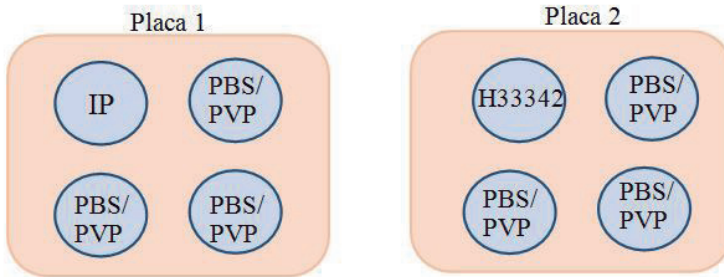


Figura 2. Esquema das duas placas para coloração diferencial.

Os embriões são colocados na solução de IP por 30 segundos. Para que este tempo não seja ultrapassado, os embriões são pipetados e mantidos na ponteira junto com a solução de IP, até completarem os 30 segundos, para, assim, serem transferidos para as três gotas de banho, no tempo exato. Após os banhos, os embriões são colocados, por 15 minutos, na solução de H33342. Em seguida, estes são lavados em três gotas de PBS/PVP, para então serem colocados em lâminas. Um círculo de *slowfade*® é feito na lâmina, e os embriões são colocados no interior desse círculo e cobertos com uma lamínula (Figura 3). Para a coloração correta dos embriões, muita atenção deve ser dada aos tempos de execução de cada passo, principalmente na etapa do IP, pois, nessa fase, caso ultrapassem os 30 segundos, o embrião irá corar-se por completo em vermelho, em vez de ter apenas o trofoblasto corado.

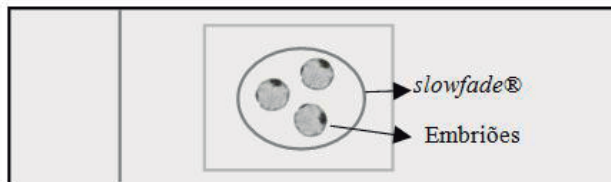


Figura 3. Montagem de lâmina.

Análise das lâminas

As lâminas são, então, visualizadas em microscópio de fluorescência (Axiophot 2, Zeiss) sob luz ultravioleta com excitação de 460 nm para o H33342 e 560 nm para o IP (Figura 4). As células são contadas no aumento de 40x, com auxílio de contador manual, sendo avaliadas em diferentes planos. Devem ser corados, apenas, 10 embriões por vez, devido ao tempo de permanência do embrião na solução de IP ser restrito. Durante o preparo da lâmina, alguns embriões podem se romper, dificultando sua posterior contagem, devendo ser, portanto, excluídos. Nessa contagem, o ideal é sempre iniciar da mesma maneira para minimizar os erros de contagem. Geralmente, inicia-se contando as células do trofoblasto, deixando as células da MCI para o final.

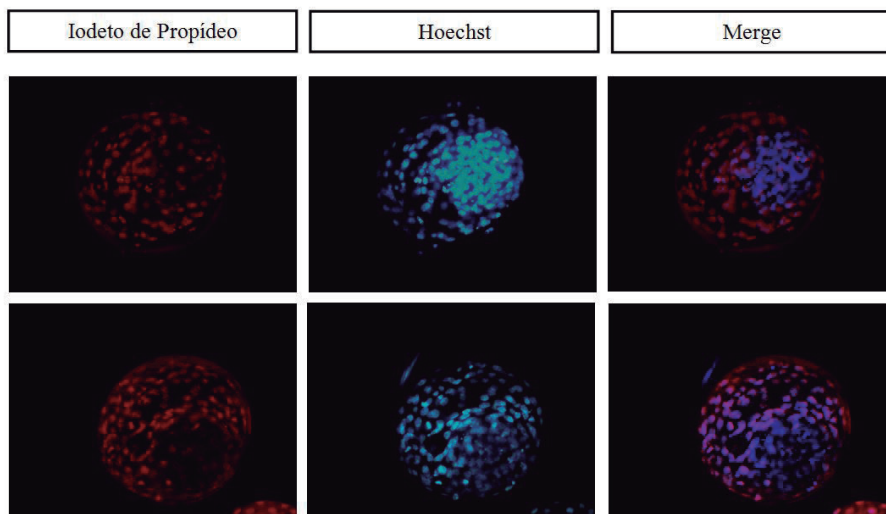


Figura 4. Blastocistos expandidos, corados pela técnica de coloração diferencial no laboratório de reprodução animal (LRA).

Estudos utilizando a coloração diferencial em embriões produzidos in vitro no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa

Estudos foram realizados no LRA utilizando a coloração diferencial. Em um primeiro experimento, foi avaliada a qualidade do embrião produzido com soro fetal bovino (SFB) no sistema de cultivo. No segundo experimento, verificou-se o efeito do uso do *scriptaid* (inibidor de HDAC), durante a pré-maturação e maturação in vitro (MIV), por meio da qualidade e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos com albumina sérica bovina (BSA). Somen-

te blastocistos expandidos (D7) foram utilizados no protocolo de coloração diferencial previamente descrito.

Na avaliação dos embriões produzidos com SFB, observaram-se, em média, $57,25 \pm 4,43$ células da MCI, $123,08 \pm 6,91$ células do TE e $180,33 \pm 8,30$ células totais (Tabela 1). Além disso, nesse estudo, 66,6% dos embriões produzidos com SFB apresentaram proporções de 20-40% de MCI/Total de células (Tabela 1), o que corrobora os dados da literatura (Zullo et al., 2016).

Tabela 1. Variáveis da alocação celular de embriões in vitro produzidos com SFB no laboratório de reprodução animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Variável	SFB (n=23) média \pm EP
Número de células da MCI	57,25 \pm 4,43
Número de células do TE	123,08 \pm 6,91
Número total de células	180,33 \pm 8,30
Proporção de MCI/total de células %	31,71 \pm 1,97
0-20% de MCI/Total de células-n(%)	2 (8,3%)
20-40% de MCI/Total de células-n(%)	16 (66,6%)
>40% de MCI/Total de células-n(%)	6 (25%)

MCI, massa celular interna; TE, trofoblasto.

Embriões com 20-40% de MCI/Total de células são considerados embriões de boa qualidade; abaixo de 20% e acima de 40%, são considerados embriões de baixa qualidade e estão associados com perdas embrionárias (Zullo et al., 2016; Velazquez et al., 2012; Koo et al., 2002). Assim, a quantidade de embriões produzidos com SFB, dentro da proporção normal, corrobora o observado em outros estudos publicados (Zullo et al., 2016), demonstrando que a qualidade do embrião produzido no LRA está de acordo com o relatado na literatura.

No segundo experimento, os embriões foram produzidos com BSA e foi avaliado o efeito do *scriptaid* durante a pré-maturação e MIV de ovócitos bovinos na qualidade e desenvolvimento embrionário. Nesse estudo, as taxas de blastocistos em D7 diferiram ($p < 0,05$) entre os grupos, mostrando que os ovócitos tratados com *scriptaid* tiveram um pior desenvolvimento embrionário. Corroborando estes resultados, o uso do *scriptaid* durante a matura-

ção do ovócito foi prejudicial para a qualidade embrionária, pois os embriões produzidos nesse grupo apresentaram menor número de células totais (Tabela 2). Além disso, esse grupo também apresentou menor ($p < 0,05$; Tabela 3; Figura 5) proporção de embriões com a quantidade de células dentro do limite considerado como adequado (20-40%). Isso demonstra que o tratamento dos ovócitos com *scriptaid* foi prejudicial para a qualidade embrionária, e que isto pôde ser observado por meio da coloração diferencial.

Tabela 2. Variáveis da alocação celular e taxa de blastocisto (D7) de embriões produzidos com Albumina Sérica Bovina (BSA) durante o cultivo in vitro (Controle) e de embriões submetidos a tratamento com *scriptaid* durante a Pré-MIV e MIV.

Variável	Controle BSA (n=39) média \pm EP	Pré-MIV + MIV com adição de <i>scriptaid</i>
Número de células da MCI	59,48 \pm 2,9	47,87 \pm 3,2
Número de células do TE	133,10 \pm 4,6	113,67 \pm 6,2
Número total de células	192,59 \pm 5,5 ^a	161,63 \pm 7,4 ^b
Proporção de MCI/total de células (%)	30,95 \pm 1,1	30,01 \pm 1,6
Taxa de Blastocisto D7 n (%)	82 (34,7) ^a	32 (18,1) ^b

^{a, b} Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística por ANOVA, $p < 0,05$. Quando os dados não seguiram normalidade, foram analisados por Kruskal-Wallis, $p < 0,05$. MCI, massa celular interna; TE, trofoblasto.

Tabela 3. Proporções de MCI/total de células de embriões produzidos com Albumina Sérica Bovina (BSA) durante o cultivo in vitro (Controle) e de embriões submetidos a tratamento com *scriptaid* durante a Pré-MIV e MIV.

MCI/Total	0-20%	20-40%	40-60%	Total
Embriões BSA n (%)	1(2,6%) ^b	34(87,1%) ^a	4(10,3)	39
Embriões Pré-MIV/MIV com <i>scriptaid</i> n (%)	5(16,7%) ^a	20(66,7%) ^b	5(16,7%)	30

^{a, b} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística por Qui-Quadrado, $p < 0,05$. MCI, massa celular interna.

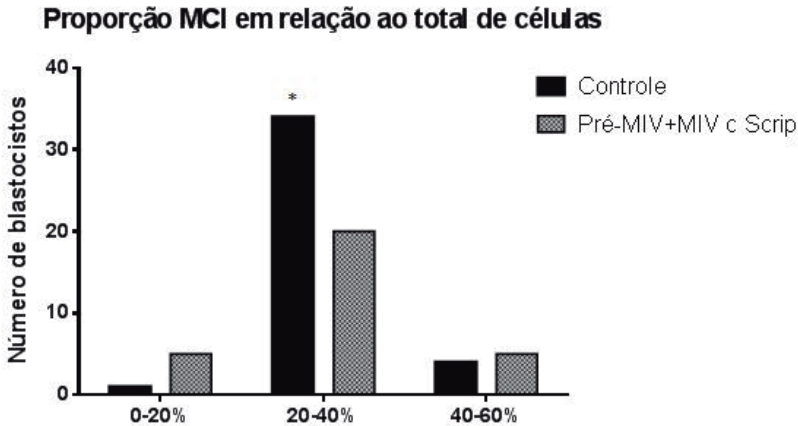


Figura 5. Distribuição dos embriões produzidos in vitro de acordo com a razão MCI/células totais de 0-20%, 20-40% e >40%. * Indicam diferença estatística para os grupos dentro da mesma característica ($p < 0,05$). MCI, massa celular interna

Considerações Finais

A técnica de coloração diferencial é uma metodologia de baixo custo que permite avaliar a qualidade do embrião, porém esta análise exige atenção durante sua execução, já que o resultado correto depende de tempos precisos para sua realização. Alguns estudos no LRA corroboram o uso da técnica de coloração diferencial para embriões bovinos como um parâmetro de qualidade, no qual os embriões controle mostraram-se melhores do que os que receberam tratamento durante a maturação, revelando que alterações feitas durante a maturação do ovócito podem implicar em prejuízo ao desenvolvimento embrionário. Além disso, a quantidade de embriões produzidos com SFB, dentro da proporção normal (20-40% de células da MCI em relação ao total de células do embrião), corrobora o relatado em outros estudos publicados, demonstrando que a qualidade do embrião produzido no LRA está de acordo com o observado na literatura.

Portanto, a técnica de coloração diferencial aqui apresentada e discutida pode ser mais uma alternativa para se melhor avaliar a qualidade de embriões. Assim, essa técnica pode ser associada a outros parâmetros, melhorando a acurácia da avaliação geral em estudos que envolvem a produção de embriões in vitro, seja por fecundação in vitro, clonagem, ICSI (injeção

intracitoplasmática de espermatozoides) ou outras biotécnicas reprodutivas. Por se tratar de uma técnica rápida, de baixo custo e que não exige equipamentos sofisticados, pode ser relativamente fácil de ser adotada por laboratórios de pesquisa e de ensino.

Referências

APARICIO, B.; CRUZ, M.; MESEGUER, M. Is morphokinetic analysis the answer? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 6, p. 654-663, 2013.

ASGARI, V.; HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: effect of embryonic block and developmental kinetics. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 278-283, 2012.

BALABAN, B.; URMAN, B.; SERTAC, A.; ALATAS, C.; AKSOY, S.; MERCAN, R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 74, p.282-7, 2000.

BERNAL-ULLOA, S. M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; HADELER, K. G.; ALDAG, P.; WINKLER, S.; PACHE, D.; BAULAIN, U.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Cyclic AMP affects oocyte maturation and embryo development in prepubertal and adult cattle. **PLoS one**, v. 11, n. 2, e0150264, 2016.

BERNAL-ULLOA, S. M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; TIMMERMANN, B.; BAULAIN, U.; GROßFELD, R.; DIEDERICH, M.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. **Zygote**, v. 23, n. 3, p. 367-377, jun. 2014.

BLOCK, J.; FIELDS, S. D.; HANSEN, P. J. **Simple protocol for differential staining of inner cell mass and trophectoderm of bovine embryos** – 2009. Disponível em: <http://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab_protocol_docs/differential_staining_bovine_embryos.pdf>. Acesso em: 08 set. 2017.

CAIXETA, F. M. C.; SOUSA, R. V.; GUIMARÃES, A. L.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W.; NETTO, S. S.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Meiotic arrest as an alternative to increase the production of bovine embryos by somatic cell nuclear transfer. **Zygote**, v. 25, n. 1, p. 32-40, 2017.

CARROCERA, S.; CAAMAÑO, J. N.; TRIGAL, B.; MARTÍN, D.; DÍEZ, C. Developmental kinetics of in vitro–produced bovine embryos: An aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 822-827, 2016.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 132-142, 2008.

DE SOUSA, R. V.; DA SILVA CARDOSO, C. R.; BUTZKE, G.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 90, p. 25-31, mar. 2017.

DEMANT, M.; DEUTSCH, D. R.; FRÖHLICH, T.; WOLF, E.; ARNOLD, G. J. Proteome analysis of early lineage specification in bovine embryos. **Proteomics**, v. 15, n. 4, p. 688-701, 2015.

DIÓGENES, M. N.; GUIMARÃES, A. L. S.; LEME, L. O.; MAURÍCIO, M. F.; DODE, M. A. N. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 190-198, 2017.

DODE, M. A. N.; DUFORT, I.; MASSICOTTE, L.; SIRARD, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 288-297, 2006.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 20 oct. 2017.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.

FOULADI-NASHTA, A. A.; ALBERIO, R.; KAFI, M.; NICHOLAS, B.; CAMPBELL, K. H. S.; WEBB, R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 4, p. 497-502, 2005.

GARCIA, S. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M.; MEIRELLES, F. V. Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation source and developmental

kinetics. **PloS one**, v. 10, n. 3, e0119463, 2015.

GARDNER, D. K.; SCHOOLCRAFT, W. B. **In vitro culture of human blastocyst**. In: JANSEN, R.; MORTIMER (Eds.) *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Carnforth: Parthenon Press, p. 378-88, 1999.

GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S. S.; ARRUDA, R. P. D.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Heparin and penicillamine–hypotaurine–epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 50, n. 1, p. 39-47, 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIREDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GUEMRA, S.; DA SILVA SANTO, E.; ZANIN, R.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C.; OHASHI, O. M.; VERDE LEAL, C. L.; ADONA, P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus–oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 982-987, 2014.

GUIMARÃES, A. C. G.; LEIVAS, F. G.; SANTOS, F. W.; SCHWENGBER, E. B.; GIOTTO, A. B.; MACHADO, C. I. U.; GONÇALVES, C. G.; FOLCHINI, N. P.; BRUM, D. S. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3-4, p. 103-110, 2014.

GUIMARÃES, A. L. S.; PEREIRA, S. A.; LEME, L. O.; DODE, M. A. N. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 83, n. 1, p. 52-57, 2015.

GOOVAERTS, I. G. F.; LEROY, J. L. M. R.; RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSSEN, E. P. A.; BOLS, P. E. J. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1293-1303, 2011.

HAMMADEH, M. E.; FISCHER-HAMMADEH, C.; ALI, K. R. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 2, p. 119-128, 2011.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. **Development**, v. 107, n. 3, p. 597-604, 1989.

HERRERO, J.; TEJERA, A.; ALBERT, C.; VIDAL, C.; DE LOS SANTOS, M. J.; MESEGUER, M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. **Fertility and Sterility**, v.100, p. 1602–9, 2013.

HOLM, P.; VAJTA, G.; BOOTH, P. J.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine IVP embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 1, n. 47, p. 324, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - 2016 Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf>. Acesso em: 05 may 2018.

INABA, Y.; MIYASHITA, S.; SOMFAI, T.; GESHI, M.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; NAGAI, T. Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 86-92, 2016.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 1, p. 279–84, 1990.

KOO, D. B.; KANG, Y. K.; CHOI, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, H. N.; OH, K. B.; SON, D. S.; PARK, H.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 2, p. 487–92, 2002.

KUES, W. A.; SUDHEER, S.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; LEHRACH, H.; ADJAYE, J.; NIEMANN, H. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, n.50, p. 19768–19773, 2008.

LASKOWSKI, D.; BAGE, R.; HUMBLLOT, P.; ANDERSSON, G.; SIRARD, M. A.; SJUNNESSON, Y. Insulin during in vitro oocyte maturation has an impact on development, mitochondria, and cytoskeleton in bovine day 8 blas-

tocysts. **Theriogenology**, USA v. 101, p. 15-25, 2017.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e Sobrevivência de Embrões no Período de Préimplantação: Enfoque em Ruminante. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 194-202, 2009.

MACHADO, G. M.; CAIXETA, E. S.; LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 123-134, 2012.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A. R.; PIVATO, I.; FIDELIS, A.; SPRICIGO, J. F.; PAULINI, F.; LUCCI, C. M.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 11, p. 936-947, nov. 2013a.

MACHADO, G. M.; FERREIRA, A. R.; GUARDIEIRO, M. M.; BASTOS, M. R.; CARVALHO, J. O.; LUCCI, C. M.; DIESEL, T. O.; SARTORI, R.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. Morphology, sex ratio and gene expression of day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 4, p. 600-608, 2013b.

MALLOL, A.; SANTALÓ, J.; IBÁÑEZ, E. Comparison of three differential mouse blastocyst staining methods. *Systems biology in reproductive medicine*, v. 59, n. 2, p. 117-122, 2013.

MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W. A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, n. 1, p.57-68, 2000.

MUNDIM, T. C.; RAMOS, A. F.; SARTORI, R.; DODE, M. A.; MELO, E. O.; GOMES, L. F.; RUMPF, R.; FRANCO, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and molecular research**, v. 8, n. 4, p. 1398-1407, 2009.

OCHOTA, M.; WOJTASIK, B.; NIŻAŃSKI, W. Total cell number and its allocation to trophectoderm and inner cell mass in in vitro obtained cats' blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 339-345, 2016.

PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2001.

PEREIRA, D. C., DODE, M. A. N., & RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 63, n. 4, p.1131-1141, 2005.

PLUSA, B.; HADJANTONAKIS, A. K. Mammalian development: mechanics drives cell differentiation. **Nature**, v. 536, n. 7616, p. 281, 2016.

ROCHA, J. C.; PASSALIA, F.; MATOS, F. D.; MASERATI JR, M. P.; ALVES, M. F.; DE ALMEIDA, T. G.; CARDOSO, B. L.; BASSO, A. C.; NOGUEIRA, M. F. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard?. **JBRA assisted reproduction**, v. 20, n. 3, p. 150, 2016.

ROSA, A. N. F.; DE OLIVEIRA MENEZES, G. R.; SULEIMAN, K. O valor do zebu. **AgroANALYSIS**, v. 36, n. 7, p. 23-24, jul, 2016.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1255–70, 2006.

SELOKAR, N. L.; SAINI, M.; MUZAFFER, M.; KRISHNAKANTH, G.; SAHA, A. P.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R.; PALTA, P.; MADAN P.; SINGLA, S. K. Roscovitine treatment improves synchronization of donor cell cycle in G0/G1 stage and in vitro development of handmade cloned buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Cellular Reprogramming**, v. 14, n.2, p. 146-154, 2012.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRÜNING, K.; WRENZYCKI, C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n.8, p. 1433-1441, 2011.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias. 3. ed. [Uberlândia] : Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 180 p. Original publicado em abril de 1998 por International Embryo Transfer Society, Illinois, USA. Traduzido por Enoch Borges de Oliveira Filho.

THOUAS, G. A.; KORFIATIS, N. A.; FRENCH, A. J.; JONES, G. M.; TROUNSON, A. O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. **Reproductive biomedicine online**, v. 3, n. 1, p. 25-29, 2001.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803-815, 2014.

VALLEH, M. V.; HYTTEL, P.; RASMUSSEN, M. A.; STRØBECH, L. Insulin-like growth factor 2: A modulator of anti-apoptosis related genes (HSP70, BCL2-L1) in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 82, n. 7, p. 942-950, 2014.

VANDENHURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, 1717-1751, 2005.

VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; DE KRUIF, A. Blastocyst evaluation by means of differential staining: a practical approach. **Reproduction in domestic animals**, v. 36, n. 1, p. 29-35, 2001.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 47, n. 1, p. 47-56, may 1997.

VELAZQUEZ, M. A.; HADELER, K. G.; HERRMANN, D.; KUES, W. A.; RÉMY, B.; BECKERS, J. F.; NIEMANN, H. In vivo oocyte IGF-1 priming increases inner cell mass proliferation of in vitro-formed bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 517-527, 2012.

VIANA, J. H. M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico, 59).

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 476-481, 2017.

WANG, Z.; FU, C.; YU, S. Green tea polyphenols added to IVM and IVC media affect transcript abundance, apoptosis, and pregnancy rates in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 186-192, 2013.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHOU, Y.; TAN, D.; ZHU, S.; DAI, Y.; LIU, G. Melatonin improves the quality of in vitro produced (IVP) bovine embryos: implications for blastocyst development, cryotolerance, and modifications of relevant gene expression. **PloS one**, v. 9, n. 4, 2014.

WONG, C.; CHEN, A. A.; BEHR, B.; SHEN, S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. **Reproductive biomedicine online**, v. 26, p. 120-129, 2013.

ZHOU, G. B.; ZENG, Y.; MENG, Q. G.; LIU, Y.; DAI, Y. P.; ZHU, S. E.; BUNCH, T. D.; HOU, Y. P. Decreased expression of CD9 in bovine oocytes after cryopreservation and the relationship to fertilization capacity. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 6, p. 451-459, 2013.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; DE CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 688-697, mar. 2016.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



CGPE: 15160