

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

**PERFIL TRANSCRICIONAL DA CRIOTOLERÂNCIA
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DIANA PEDROSO CAETANO

Uruguaiiana

2018

DIANA PEDROSO CAETANO

**PERFIL TRANSCRICIONAL DA CRIOTOLERÂNCIA
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO***

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

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Sudano

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Mesquita

Uruguaiana

2018

Dedico esta realização
aos meus pais: Mareli e Paulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar e iluminar o meu caminho nos momentos difíceis.

Aos meus queridos pais, Mareli e Paulo, pela amizade, apoio e incentivo de sempre para que hoje eu estivesse aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mateus José Sudano, que desde o princípio foi extremamente solícito. Pela singular orientação, paciência, amizade, ensinamentos, conversas, e grande incentivo durante a pós-graduação. A ele minha total admiração, respeito e gratidão.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos meus colegas de laboratório, Roniele, Diego, Kelly, Janine e Jéferson, os quais foram imprescindíveis e colaboraram imensamente nesta caminhada.

Aos colegas e professores do PPGCA pela colaboração e por transmitirem seus conhecimentos durante este período.

A Universidade Federal do Pampa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realizar mais esta etapa.

Aos colaboradores, equipe *In Vitro* Brasil – IVB (Andrea Basso, Rafaela Rodrigues e Clara Barrela), Patrícia Fontes e Sônia Andrade que com suas importantes contribuições tornaram possível a realização deste experimento.

A banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Daiana Ávila e Prof^a. Dr^a. Francielli Cibin, pela atenção e disponibilidade.

Enfim, o meu muito obrigada a todos que de alguma forma ou outra, contribuíram ou torceram por mim.

RESUMO

A criotolerância embrionária é um processo complexo que envolve mudanças estruturais e moleculares dinâmicas. Informações a respeito do perfil transcricional embrionário após a criopreservação ainda são insuficientes. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o transcriptoma de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com alta e baixa criotolerância. Oócitos imaturos (n = 3926) foram recuperados de ovários derivados de abatedouro e maturados, fertilizados e cultivados *in vitro* sob condições padrão. A clivagem e produção de embriões foram registrados no dia três e sete após a fertilização. Blastocistos expandidos (n = 894) com qualidade excepcional (apenas grau I) foram vitrificados pelo método *Cryotop*. Os blastocistos vitrificados foram aquecidos, e a re-expansão e eclosão dos embriões foram registradas às 6 e 12h após o aquecimento, respectivamente. Uma rigorosa avaliação morfológica foi realizada e os embriões foram classificados em alta criotolerância (HC), re-expandido e baixa criotolerância (LC) após a criopreservação. A fim de aumentar a precisão das diferenças moleculares entre fenótipos, apenas blastocistos HC e LC (n = 3, total de 123 blastocistos por grupo, *pool* de 41/amostra) após a criopreservação foram submetidos à extração total de RNA (PicoPure, Applied Biosystems®). O RNA extraído foi avaliado através do 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies®). Somente amostras com integridade de RNA $\geq 7,7$ foram submetidas ao protocolo padrão de preparação da biblioteca NEBNext Ultra II (New England Biolabs®) e RNAseq (Illumina®). Os dados foram limpos (seqClean v1.3.12), mapeados (Tophat v.2.0.8), as leituras contadas (HTSeq-count v0.5.4p2), e foi realizada análise de expressão diferencial (DESeq v1.12.1 de R/Bioconductor). Para análise de enriquecimento gênico, foi utilizado o software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). As taxas de clivagem e produção de blastocistos foram 73,2% (2873/3926) e 29,0% (1137/3926), respectivamente. As taxas de re-expansão (89,2 vs. 73,4%) e de eclosão (23,7 vs. 8,4) foram maiores (P<0,05) às 12 h em comparação com 6 h após o aquecimento, respectivamente. Uma média total de 17,8 milhões de leituras por amostra foi utilizada na análise de expressão diferencial. As amostras dos grupos de blastocistos HC e LC foram claramente separadas com individualização pronunciada na análise de componentes principais bi e tridimensionais e agrupamento de “Heat Map” sustentando a caracterização fenotípica do modelo (alta *versus* baixa criotolerância). Um total de 9.422 genes foram identificados, 114 genes foram diferencialmente expressos (GDE; FDR: P <0,05), com 27 e 84 genes superexpressos em HC e LC, respectivamente. Na análise de enriquecimento dos GDEs (FDR: P <0,1), as cinco principais funções biológicas

identificadas foram movimento celular, o desenvolvimento celular, proliferação e crescimento celular e sobrevivência e morte celular. Na análise de predição do IPA, as funções biológicas de sobrevivência do organismo, sobrevivência e morte celular, crescimento e proliferação celular foram preditas como sendo mais ativadas ($z\text{-score} \geq +2$), enquanto movimento celular e a sinalização célula a célula foram preditos mais inibidos ($z\text{-score} \leq -2$). O presente trabalho forneceu uma análise abrangente do perfil transcricional da criotolerância de embriões bovinos e elucidou o envolvimento de um grande número de processos biológicos nobres na retomada do desenvolvimento após a criopreservação. Sobrevivência do organismo, movimento celular, sobrevivência e morte celular, crescimento e proliferação celular foram funções biológicas cruciais para a criopreservação de embriões.

Palavras Chave: Embriões, produção *in vitro*, criopreservação, transcriptoma, bovinos.

ABSTRACT

Embryo cryopreservation is an assisted reproductive technology that allows the storage of in vitro produced or in vivo derived embryos for long periods while are not commercialized or transferred. It is considered as one of the most challenging areas within the biotechnologies of reproduction. The reduced pregnancy rate of the cryopreserved embryos associated with an increase demand of qualified technician to handle this biotechnology could explain the reduced number of embryos being cryopreserved. Embryo cryosurvival is a complex process involving dynamic structural and molecular changes. Embryo transcriptional profile information after cryopreservation is still lacking. The aim of this work was to establish the transcriptome of in vitro produced bovine blastocysts with high and low cryosurvival. Immature oocytes (n= 3926) were recovered from slaughterhouse-derived ovaries and in vitro matured, fertilized and culture under standard conditions. Cleavage and embryo production were recorded on day three and seven after fertilization. Expanded blastocysts (n= 894) with exceptional quality (grade I only) were vitrified by the cryotop method. Vitrified blastocysts were warmed, and embryo re-expansion and hatching were recorded at 6 and 12 h after warming, respectively. A rigorous morphological evaluation was done by experienced technician considering: a) blastocoele re-expansion; b) hatching; c) inner cell mass and trofoectoderm integrity and organization; and d) color and extrusion of blastomeres. After morphological evaluation, embryos were classified as high cryosurvival (HC: blastocysts with the blastocoele completely re-expanded followed by hatching 12 h after warming and without or with mild and few signs of degeneration); re-expanded (blastocysts with the blastocoele completely re-expanded but not followed by hatching 12 h after warming and with mild and few signs of degeneration), and non-viable (low cryosurvival - LC: blastocysts without the blastocoele completely re-expanded followed by hatching 12 h after warming and with severe and frequently signs of degeneration) after cryopreservation. In order to increase accuracy of molecular differences among phenotypes, only HC and LC blastocysts (n= 3, total of 123 blastocysts per group, pool of 41 /sample) after cryopreservation and submitted to total RNA extraction (PicoPure, Applied Biosystems®). Extracted RNA was evaluated through 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies®). Only samples with RNA integrity ≥ 7.7 were submitted to through standard protocol of NEBNext Ultra II library preparation (New England Biolabs®) and RNAseq (Illumina®). Data were cleaned (seqyClean v1.3.12), mapped (Tophat v.2.0.8), reads counted (HTSeq-count v0.5.4p2), and differential expression analysis was performed (DESeq v1.12.1 from R/Bioconductor). For gene enrichment analysis, ingenuity pathway analysis (IPA) was used. Cleavage and blastocyst

production rates were 73.2 % (2873/3926) and 29.0 % (1137/3926), respectively. The re-expansion (89.2 vs. 73.4%) and hatching (23.7 vs. 8.4) rates were higher ($P < 0.05$) at 12h compared with 6h after warming, respectively. A mean 17.8 millions of reads per sample were used on different expression analysis. Blastocysts group samples were clearly separated with pronounced group individualization at two- and three-dimensional principal component analysis and heat map clustering sustaining the phenotype characterization of the model (high vs. low cryosurvival). A total of 9422 genes were identified, 114 were differently expressed genes (DEG; FDR: $P < 0.05$), with 27 and 84 genes up-regulated in HC and LC, respectively. At the enrichment analysis of the DGE (FDR: $P < 0.1$) the top five biological functions identified were cellular movement (66 molecules), cellular development (82 molecules), cell grown and proliferation (79 molecules), and cell death and survival (80 molecules). At IPA prediction analysis, the biological functions of organismal injury, cell death and survival, cell grow and proliferation were predicted to be more activated ($z\text{-score} \geq +2$), whereas cellular movement and cell-to-cell signaling were predicted to be more inhibited ($z\text{-score} \leq -2$). The present work provided a comprehensive analysis of the transcriptional profile of bovine embryo cryosurvival and elucidated the involvement of a great number of noble biological processes molecules in the embryo development resumption after cryopreservation. Organismal injury, cellular movement, cell death and survival, cell growth and proliferation were crucial biological functions for embryo cryosurvival.

Keywords: Embryos, in vitro production of embryos, cryopreservation, transcriptome, bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Método Open Pulled Straw (OPS).....	24
Figura 2 – Ferramenta de vitrificação Cryotop.....	25
Figura 3 – Análise de componentes principais bidimensionais (A) e tridimensionais (B).....	36
Figura 4 – Análise de agrupamento de Heat Map.....	37
Figura 5 – Diagrama de Venn ilustrando os genes pouco expressos (down-regulated) e superexpressos (up-regulated) em embriões com alta criotolerância (Viable).....	37
Figura 6– A. Principais funções biológicas identificadas. B. Heat Map demonstrando as funções preditas ativadas e inibidas nos embriões com alta criotolerância. C. Principais vias canônicas indicadas.....	39
Figura 7 – Via canônica da Sinalização STAT3. Na análise de enriquecimento do IPA, a via JAK2/STAT3 foi predita ativa, possivelmente estimulando processos anti-apoptóticos, crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e oncogênese (a nível citoplasmático), como também induziu a transcrição de fatores envolvendo proliferação e sobrevivência, migração/evasão e angiogênese.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxas de re-expansão e eclosão dos blastocistos vitrificados, avaliadas às 6 e 12 h de re-cultivo após o aquecimento.....	35
Tabela 2: Top 20 genes superexpressos em embriões HC.....	38
Tabela 3: Top 20 genes superexpressos em embriões LC.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- COCs – Cumulus oocyte complexes
DNA – Ácido desoxirribonucleico
GDEs – Genes diferencialmente expressos
HC – Alta criotolerância
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IETS – International Embryo Transfer Society
IL-9 – Interleucina-9
IPA – Ingenuity Pathway Analysis
IVD – Derivados *in vivo*
LC – Baixa criotolerância
MCI – Massa celular interna
mL – Mililitro
MCI – Massa celular interna
OPU – Ovum Pick-Up
Pas – Ativadores de plasminogênio
PIV – Produção *in vitro* de embriões
RNAm – RNA mensageiro
SFB – Soro Fetal Bovino
TE – Transferência de embrião

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Competência e qualidade embrionária	15
2.2. Abordagens holísticas transcricionais	18
2.3. Nível de transcritos de RNAm para genes preditores ou indicadores de competência embrionária	20
2.4. Criopreservação e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro	22
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos Gerais	26
3.2. Objetivos Específicos	26
4. HIPÓTESE(S)	26
5. CAPÍTULO I (ARTIGO)	26
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil destaca-se por possuir o maior rebanho comercial do mundo, com mais de 218 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2016). Neste cenário, a utilização de técnicas de reprodução assistida se tornou uma realidade cada vez mais comum, nos programas de melhoramento genético de bovinos, colaborando com a veloz disseminação de animais geneticamente superiores que expressam características econômicas importantes à produção. Dentre essas técnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIV) favorece a multiplicação animal, aumentando o número de produtos/vaca/ano, além de possibilitar a utilização de diferentes categorias animais como fêmeas pré-púberes, vacas em fase inicial de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e senis (GONÇALVES; *et al.*, 2008).

O Brasil é líder mundial e referência na produção *in vitro* de embriões, grande parcela desse sucesso está associada ao elevado número de oócitos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia em doadoras de raças zebuínas, as quais compõem grande parte do rebanho brasileiro, permitindo a aplicação comercial da técnica em programas de larga escala (PONTES *et al.*, 2010). Contudo, embora os avanços nos sistemas de produção e aumento na taxa embrionária alcançados nas últimas décadas, a eficiência da PIV ainda é considerada insatisfatória, com taxas de blastocisto em torno de 40%, assim como os índices de prenhes os quais também giram em torno de 40% (NEVES *et al.*, 2010).

A transferência comercial de embriões teve início na década de 70, no entanto o reduzido número de receptoras disponíveis para a transferência dos embriões sempre foi um fator limitante. Assim, os embriões produzidos eram mantidos somente por até 24 horas para serem transferidos ou até mesmo descartados (ALVES *et al.*, 2003). A criopreservação de embriões representa uma ferramenta indispensável para dinamizar e difundir o processo da PIV. Todavia, embriões bovinos oriundos da PIV são mais sensíveis à criopreservação quando comparados aos seus homólogos derivados *in vivo*.

Neste sentido, o método convencional de congelamento é considerado inviável para a criopreservação destes embriões (MEZZALIRA, 2004), sendo a vitrificação a técnica de eleição para embriões produzidos *in vitro* (KUWAYAMA, 2007). Atualmente, a criopreservação de embriões produzidos *in vivo* permite a obtenção de taxas de prenhez próximas àquelas alcançadas com a transferência de embriões a fresco. Entretanto, a maior sensibilidade a criopreservação de embriões PIV dificulta a existência de eficientes taxas de prenhez (PONTES *et al.*, 2009).

Na literatura, a baixa capacidade de criopreservação está associada ao grande acúmulo lipídico nos embriões produzidos inteiramente *in vitro*. Os lipídios por sua vez, são armazenados nas gotículas lipídicas, e no caso de embriões bovinos, os triglicerídeos (TAG) constituem a maior parte dos lipídios presente no citoplasma (SUDANO *et al.*, 2011). Assim, o grande acúmulo de gotículas citoplasmáticas em embriões bovinos PIV tem sido atribuído a utilização de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo, uma vez que essa substância eleva o teor lipídico no embrião, seja pela absorção de suas lipoproteínas pelas células embrionárias, ou pela possível alteração na função β -oxidação na mitocôndria causada pelo desequilíbrio no processo redução-oxidação (PEREIRA *et al.*, 2007).

No entanto, apesar do conteúdo lipídico ser apontado como uma das principais causas da sensibilidade do embrião PIV a criopreservação, foi descrito que o perfil de fosfolipídios varia nos embriões bovinos de acordo com as subespécies (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) e quanto a sua origem (PIV x TE), e que não somente o conteúdo mas também a composição lipídica, estão envolvidos na criotolerância embrionária (SUDANO *et al.*, 2012). Contudo, embora todo envolvimento dos lipídios na elevada sensibilidade dos embriões PIV a reduzidas temperaturas, a competência dos embriões representada pela porcentagem de células em apoptose prediz melhor a sua competência e habilidade de sobreviver ao processo de criopreservação (SUDANO *et al.*, 2011).

Já foi descrito que o padrão de expressão gênica pode ser utilizado como marcador de qualidade embrionária, efetividade do meio de cultivo e capacidade de sustentar uma prenhez bem-sucedida (KUZMANY *et al.*, 2011; STINSHOFF *et al.*, 2011). Além disso, genes diferencialmente expressos (GDEs) já foram observados em embriões PIV quando comparados aos embriões TE (SUDANO *et al.*, 2012b), ainda no estudo de Leme *et al.* (2016), foi demonstrado um número de GDEs associados a resposta ao processo de vitrificação.

Deste modo, esforços para a compreensão a nível molecular do funcionamento e metabolismo embrionário são necessários para esclarecer as vias bioquímicas que estão envolvidas na competência embrionária.

Portanto, a presente proposta testou a hipótese de que GDEs em blastocistos com alta (HC) e baixa criotolerância (LC) após a criopreservação modulam processos biológicos nobres ligados a competência e capacidade embrionária após a criopreservação, tendo como objetivo identificar GDEs entre embriões HC e LC, afim de estabelecer assinaturas moleculares da competência e criotolerância embrionária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Competência e qualidade embrionária

A capacidade de avaliar com eficiência e agilidade a qualidade e viabilidade de embriões no período pré-implantação tem sido almejada durante muito tempo. A utilização de embriões que são mais propensos a promover prenhez ajudaria a otimizar o tempo, acelerar o progresso genético e reduzir perdas financeiras associadas às técnicas que envolvem a produção embrionária propriamente ditas, bem como a manutenção dos animais. Além disso, o valor comercial de um embrião comprovadamente competente seria valorizado (VAN SOOM *et al.*, 2001).

Na maioria das espécies mamíferas, a avaliação da morfologia do embrião utilizando um estereomicroscópio padrão, continua sendo o método mais aplicado para diferenciar embriões viáveis e não viáveis para transferência. É considerada uma abordagem prática e clinicamente útil, principalmente na transferência de embriões bovinos e humanos (ALIKANI *et al.*, 1999). Em contrapartida, esta abordagem pode ser considerada pouco precisa, visto que muitos embriões com morfologia fora do padrão também resultam em prenhez, e ainda existe a possibilidade de variações nos escores de avaliação entre os profissionais (FARIN *et al.*, 1999). Além disso, com a crescente aplicação das tecnologias de reprodução assistida, como a PIV, transferência nuclear e transgenia, tornou-se evidente que a competência embrionária pode ser gravemente comprometida sem alterações óbvias na morfologia embrionária (VAN SOOM *et al.*, 2001).

Além da morfologia, taxas de clivagem e de blastocistos têm sido critérios utilizados para avaliação da competência embrionária (ALIKANI *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos em embriões humanos indicam que o momento das divisões celulares embrionárias parece estar associado a viabilidade do embrião, relacionando o momento da primeira divisão à qualidade embrionária (LEMMEN *et al.*, 2008; CIRAY *et al.*, 2006). Em contrapartida, outros estudos sugerem que os embriões que se desenvolvem a um ritmo moderado são os mais competentes, e ainda desconfiam da qualidade de embriões de progressão muito rápida ou muito lenta (CUMMINS *et al.*, 1986; WEITZMAN *et al.*, 2010). No caso de embriões bovinos PIV, há relatos que descrevem que estes embriões apresentam desenvolvimento mais acelerado, menor número de células e deficiência no número de blastômeros em comparação aos produzidos *in vivo*, e que pode ser devido a diferente cinética de conversão a blastocistos (HOLM *et al.*, 1999). Além disso, uma avaliação rotineiramente utilizada é a taxa de eclosão, a qual geralmente

ocorre no dia 8 do cultivo, assim os embriões que eclodem até esta data são considerados melhores que aqueles que não eclodem (VAN SOOM, 1997).

Ainda, de acordo com a “Quiet Embryo Hypothesis” a qual propõe que embriões viáveis apresentam um metabolismo “mais tranqüilo”, este termo relaciona a gama de atividade metabólica a um fenótipo viável, ou seja, viabilidade (LEESE, 2002). A hipótese diz que em um embrião viável o genoma, transcriptoma e proteoma não se apresentam exageradamente comprometidos, assim sustentarão o desenvolvimento, sendo que esta condição leva a um menor consumo de oxigênio e nutrientes. Por outro lado, os embriões menos viáveis apresentam maiores danos moleculares/celulares estando desprovidos à nível de transcriptoma e proteoma para lidar com situações adversas. Neste caso, as células na tentativa de realizar reparos ou sofrer processos apoptóticos, consumirão uma maior quantidade de nutrientes, resultando em um metabolismo mais “ativo” (LEESE *et al.*, 2007).

A mortalidade embrionária precoce pode resultar de diferentes fatores, como defeitos intrínsecos no embrião, de um ambiente materno impróprio, assincronia entre a mãe e o embrião, ou ainda da incapacidade da fêmea associar adequadamente os sinais embrionários. No caso de embriões PIV estas possíveis falhas tornam-se mais evidentes ainda, na qual a maior incidência de mortalidade ocorre nas 2-3 semanas após a fertilização (HANSEN *et al.*, 2010). A competência em gerar prenhes após a transferência pode ser um problema, em especial, para os embriões PIV, visto que as taxas de prenhes de embriões transferidos a fresco são frequentemente inferiores nas transferências de embriões *in vitro* quando comparadas às de embriões obtidos *in vivo* (LONERGAN *et al.*, 2007; PONTES *et al.*, 2009). Além da reduzida sobrevivência embrionária após a transferência, a PIV de embriões está associada a alterações na expressão gênica. Frente a isso, mais importante que conseguir excelentes taxas de blastocistos na PIV, é alcançar embriões com competência e qualidade, para que além de gerar e manter a prenhez, proporcione o nascimento de animais devidamente saudáveis (HANSEN *et al.*, 2010).

Diversos fatores estão relacionados a competência embrionária, neste sentido, sabe-se que a viabilidade do oócito e o acúmulo de componentes fundamentais para o início do desenvolvimento embrionário são obtidos durante o processo de maturação. Sendo que a ausência da adequada sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear e a ocorrência de estresse oxidativo, são elementos que afetam o desenvolvimento e a qualidade do embrião, com consequências diretas na competência em garantir a gestação e criotolerância (ESFANDIARI *et al.*, 2007). Em adição, embriões produzidos a partir de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* demonstram propriedades moleculares e bioquímicas alteradas quando comparados aos

embriões obtidos *in vivo*. Este desvio da função embrionária está relacionado, em parte, a um ambiente de cultivo embrionário ineficiente, conforme estudo realizado por Rizos *et al.* (2002) demonstrou-se que embriões PIV cultivados fisiologicamente, ou seja, no oviduto de ovelhas após a fertilização apresentaram padrões de expressão gênica e criotolerância mais próximos ao perfil de um embrião produzido *in vivo* do que os produzidos inteiramente *in vitro*.

Alterações morfológicas e a nível molecular causadas pelo cultivo *in vitro* têm sido responsáveis pela reduzida qualidade e viabilidade após inovulação ou criopreservação dos embriões, figura 1 (Mc EVOY, 2003). Entre elas, estão o aumento do número de células apoptóticas e diminuição do número total de células, alterações da densidade (com acúmulo de lipídeos), do metabolismo (com elevação da produção de lactato) e da expressão gênica (KHURANA & NIEMANN, 2000; RIZOS *et al.*, 2003; LONERGAN *et al.*, 2006). Estudos demonstram uma maior incidência de células apoptóticas em embriões produzidos *in vitro* em comparação aos seus homólogos produzidos *in vivo* (LONERGAN; RIZOS; FAIR; *et al.*, 2003; RIZOS *et al.*, 2002).

O mecanismo de apoptose é uma forma altamente conservada de morte celular com papel fundamental no desenvolvimento embrionário e na homeostase do organismo. Atua como um mecanismo de controle da qualidade celular removendo células danificadas, não-funcionais, ou mesmo em excesso. Entretanto, a ocorrência desproporcional deste tipo de morte celular está relacionada à redução da viabilidade embrionária (RIZOS, 2003). A técnica de TUNEL permite a detecção *in situ* de células apoptóticas pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA gerado pela atividade de DNases endógenas durante o processo de apoptose (GJORRET *et al.*, 2003). Existem ainda moléculas marcadoras de apoptose que auxiliam no estudo deste mecanismo, como por exemplo a proteína anexina-V (HAYES *et al.*, 2004), as caspases 2-3 (LOLICATO *et al.*, 2015) e BCL-2 (DEB *et al.*, 2012).

Conforme Van Soom (1997) embriões PIV que possuem maior número de células apresentam maior probabilidade em manter a gestação, assim a contagem do número total de células vem sendo amplamente utilizada como marcador de viabilidade (KHURANA & NIEMANN, 2000; CORRÊA, 2008), este método pode ser aplicado a partir de corantes que possuem afinidade pelo DNA, deste modo o núcleo celular torna-se visível permitindo a contagem do número total de células. Como exemplos, há a coloração de *Hoechst* em microscopia de epifluorescência, a qual é amplamente utilizada, bem como o corante Orceina em microscopia de campo claro (CORRÊA, 2007; GUIMARÃES, 2013). No entanto, o método de coloração diferencial é considerado ainda mais preciso na avaliação da qualidade embrionária, onde as células do trofotoderma e da massa celular interna (MCI) podem ser

quantificadas individualmente. A correlação da proporção da MCI:Trofectoderma está relacionada a viabilidade embrionária, no qual blastocistos de ótima qualidade demonstram razão igual ou acima de 1:2 (AVELINO, 2004).

Apesar de ser considerada uma técnica estabilizada, a PIV ainda enfrenta um de seus fatores mais limitantes que é a alta sensibilidade dos embriões à criopreservação. Os embriões produzidos *in vitro* são considerados mais sensíveis a criopreservação quando comparados aos seus homólogos derivados *in vivo*, esta sensibilidade está fortemente associada principalmente ao elevado conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões, incluindo diversas diferenças morfológicas, fisiológicas e metabólicas. Entre essas diferenças pode-se mencionar maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, menor quantidade de células totais e zona pelúcida mais frágil (CROSIER *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002). Como também elevadas taxas de anormalidades metabólicas (“efeito *crabtree*” e “*quiet metabolism*”), superexpressão gênica, maior taxa de apoptose, maior teor lipídico e reduzida criotolerância (MUCCI *et al.*, 2006; SUDANO, *et al.*, 2011).

Muitas das diferenças na qualidade desses embriões podem ser atribuídas às condições de cultivo *in vitro*. Exemplo disto, SFB nos meios de cultivo, o qual tem sido responsabilizado pelo aumento no acúmulo de lipídios no interior dos blastômeros, tornando esses embriões mais sensíveis ao processo de congelamento, seja pelo maior aporte de lipídios fornecidos pelo meio, seja por distúrbios no metabolismo mitocondrial (ABE *et al.*, 2002).

2.2. Abordagens holísticas transcricionais

O transcriptoma é todo o conjunto de moléculas de RNA (transcritos) de uma célula, tecido ou organismo em um estágio específico de desenvolvimento ou condição fisiológica, o qual representa um elo chave entre a informação codificada, entre o DNA e o fenótipo. Assim, o seu entendimento é fundamental para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares das células e dos tecidos, e desta forma compreender o seu desenvolvimento (WANG *et al.*, 2009). Ademais, o custo e a facilidade do sequenciamento do transcriptoma quando comparado ao sequenciamento do genoma o fazem uma alternativa economicamente mais plausível para muitos pesquisadores (CHAPELEV *et al.*, 2009).

A capacidade de mensurar os níveis de expressão de RNA mensageiro (RNAm) de milhares de genes simultaneamente proporcionou um grande impulso à pesquisa biológica desde a introdução dos microarranjos, há aproximadamente 10 anos. O qual, atualmente, é o

método mais comum para a avaliação do transcriptoma, no entanto, estes são utilizados para estudos comparativos e fornecem apenas informações limitadas sobre os níveis absolutos da expressão gênica (HELD *et al.*, 2006; AUER *et al.*, 2010).

O microarranjo é um conjunto de sequências de DNA (DNA complementar ou oligonucleotídeo) projetadas artificialmente, complementares aos transcritos dos genes que se deseja questionar a expressão, e distribuídas em sítios específicos (*spots* ou *probe cell*) em uma superfície sólida. Cada *spot* contém centenas de cópias das sequências de desoxirribonucleotídeos complementares a um único RNA alvo (KAUFFMANN & HUBER, 2010).

Neste sentido, na área da pesquisa médica, a análise do perfil de expressão gênica por microarranjos surge como uma excelente ferramenta para auxiliar na compreensão de doenças, identificação de novos alvos terapêuticos, e subclassificação de doenças para indicar estratégias mais individualizadas de tratamento (AUER *et al.*, 2010). Além disso, sua análise também possibilita acessar o perfil molecular de uma determinada amostra; revelar novos biomarcadores; como também proporcionar informações para fazer novas anotações do genoma. As duas análises principais desta técnica baseiam-se em testar GDEs entre duas ou mais condições, e observar as categorias funcionais mais representadas pelos GDEs em um determinado estudo (KAUFFMANN & HUBER, 2010).

Apesar de existirem algumas limitações na técnica de microarranjos, como por exemplo, sua incapacidade de descobrir novos RNA mensageiros, necessidade de conhecimento prévio das sondas utilizadas para hibridização, mensuração relativa da expressão gênica (visto que se mede a intensidade de luz emitida), ineficiência no estudo de genes raros e de isoformas, ela pode ser considerada uma tecnologia consolidada e muito bem-sucedida para a análise de transcriptoma (Revisado por MALONE & OLIVER, 2011).

Atualmente, a técnica de microarranjo vem sendo substituída pelo sequenciamento de RNA em larga-escala (RNA-seq), uma das técnicas de sequenciamento de última geração (*next-generation sequencing* - NGS), a qual supera as limitações proporcionadas pelo microarranjo. Esta técnica não requer o conhecimento prévio das sequências dos genes do organismo em estudo, e utiliza de maneira direta a contagem das sequências dos RNAs sequenciados como medida de expressão de cada gene; apresentando, dessa forma, maior reprodutibilidade de resultados. De modo geral, a técnica de RNA-seq se define por converter RNA em uma biblioteca de fragmentos de cDNA, de maneira que cada molécula pode ser sequenciada produzindo pequenas sequências (*reads*) com tamanho variando entre 21 e 500 pares de bases (WANG *et al.*, 2009). Contudo, acredita-se que a sua existência não extinguirá a utilização dos

microarranjos, a escolha estará relacionada ao custo, disponibilidade, e a necessidade de cada pesquisa.

2.3. Nível de transcritos de RNAm para genes preditores ou indicadores de competência embrionária

O processo de desenvolvimento embrionário em mamíferos inicia durante a oogênese quando as populações de RNAm materno e proteínas são acumuladas, à medida que, o oócito se desenvolve e amadurece. A embriogênese inicia após a fertilização dos gametas feminino e masculino, e seus estágios iniciais de desenvolvimento são regulados por componentes herdados maternalmente armazenados no oócito. Ao passo que o embrião se desenvolve, as moléculas informacionais herdadas do oócito se deterioram, o embrião torna-se então dependente da expressão de informações genéticas derivadas do seu próprio genoma. Este processo é conhecido como ativação do genoma embrionário, o qual ocorre na fase de 8 a 16 células. Os principais eventos que caracterizam o momento da mudança do controle do genoma materno para o embrionário incluem: 1) perda ou decomposição de moléculas de RNAm de origem materna, 2) ativação da transcrição do genoma embrionário, 3) bloqueio no desenvolvimento na presença de inibidores da transcrição e 4) alterações qualitativas marcadas em padrões sintéticos de proteína de um estágio para o seguinte (TELFORD *et al.*, 1990).

A avaliação precisa da viabilidade do embrião é fundamental para o estabelecimento e manutenção da gestação após a transferência embrionária. Apesar da avaliação mais fidedigna de viabilidade ser, de fato, a prenhez e o nascimento de uma prole saudável, este procedimento é demorado e oneroso. Assim, é necessário o estabelecimento de testes confiáveis e práticos para avaliar-se a qualidade do embrião. O principal critério que vem sendo utilizado é baseado especialmente na morfologia do embrião (VAN SOOM *et al.*, 2003).

No mecanismo das células eucariontes, os RNAm são moléculas amplamente distribuídas em todo citoplasma, são sintetizadas no núcleo através do processo de transcrição do DNA. Sendo os responsáveis pela transferência da informação genética do DNA aos ribossomos, local onde ocorre a síntese de proteínas (CHAMAYOU *et al.*, 2011). Neste contexto, os padrões de expressão de RNAm aliados a outros parâmetros de qualidade podem ser vistos como critérios de seleção, facilitando a distinção entre embriões considerados viáveis e não viáveis (KUZMANY *et al.*, 2011).

A expressão gênica tem um papel fundamental na coordenação dos mecanismos homeostáticos e metabólicos do organismo ao longo da vida. Nas espécies domésticas, existem

evidências de que as condições de cultivo *in vitro* podem alterar a expressão de genes no embrião em desenvolvimento, com consequente efeito sobre sua qualidade (WRENZYCKI, C *et al.*, 2001). Este é o caso, não somente quando sistemas de cultivo *in vitro* e *in vivo* são comparados, mas também quando se comparam diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (LONERGAN *et al.*, 2003; NATALE *et al.*, 2001; RIZOS *et al.*, 2002). Neste sentido a análise das diferenças dos níveis de transcritos de RNAm pode esclarecer os contrastes observados na criotolerância entre embriões PIV e produzidos *in vivo* e possibilitar a modificação da expressão de genes através da adaptação de sistemas de cultivo, superando a reduzida viabilidade embrionária após o descongelamento (RIZOS *et al.*, 2002).

Aksu *et al.* (2012) compararam o padrão de expressão global de embriões bovinos frescos e vitrificados oriundos da PIV utilizando palhetas de 0,25 mL, o trabalho demonstrou uma evidente diferença na expressão gênica provocada pelo processo de vitrificação, foram encontrados 962 genes GDEs entre os grupos. Já Sudano *et al.* (2014) realizaram um estudo comparativo entre as subespécies *Bos indicus* e *Bos taurus*, em que embriões produzidos *in vitro* foram vitrificados utilizando a técnica de vitrificação, demonstrando que o transcriptoma de ambas as subespécies foi significativamente afetado pelo processo de criopreservação. Neste mesmo trabalho, também foram encontrados 532 GDEs entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*.

E quando pela primeira vez, foram testados os efeitos da vitrificação pelo método de *Cryotop* no perfil de expressão gênica de embriões bovinos, demonstrou-se a partir da análise de microarranjo um discreto número de GDE associados a resposta da vitrificação. O fator de transcrição *FOSL 1* foi superexpresso em embriões vitrificados, sugerindo que o mecanismo de apoptose está envolvido na resposta a criopreservação, indicando a ativação de uma resposta protetora ou que a apoptose fora induzida pelos danos provocados às células (LEME *et al.*, 2016).

Neste contexto, diversos genes vem sendo analisados e considerados potenciais marcadores de qualidade e viabilidade embrionária, dentre os quais podemos apontar genes relacionados a diferenciação e implantação: *CDX2*, *DSC2*, *IFNT2* (RAYON *et al.*, 2016; STINSHOFF *et al.*, 2011); ao desenvolvimento embrionário: *B2M*, *EGFR*, *IGF2* (ARIAS *et al.*, 2013; KLIEM *et al.*, 1998; KUIJK *et al.*, 2007); a pluripotência: *NANOG*, *REST*, *POU5F1* (MAO *et al.*, 2011; OZAWA *et al.*, 2012; WU; SCHÖLER, 2014); a viabilidade: *FOXO3*, *GPX4* (SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011; KUSCU; CELIK-OZENCI, 2015); ao metabolismo: *PGK1*, *SLC2A1*, *SLC2A3* (ARIAS-ALVAREZ *et al.*, 2011; EL-SAYED *et al.*, 2006; STINSHOFF *et al.*, 2011); ao metabolismo lipídico: *ACSL6*, *ACSL5* (SUDANO *et al.*, 2014;

BOWMAN *et al.*, 2016). Além de serem vistos como potenciais marcadores de qualidade embrionária, os níveis de expressão de RNAm podem estar relacionados a efetividade do meio de cultivo e capacidade de sustentar uma prenhez bem-sucedida (STINSHOFF *et al.*, 2011). Assim, a compreensão da expressão de genes envolvidos no processo de desenvolvimento embrionário pré-implantação em resposta a diferentes estímulos apoiará a seleção de genes candidatos a marcadores de qualidade embrionária, promovendo o conhecimento sobre o mecanismo de desenvolvimento embrionário e melhorando os sistemas de produção embrionária (GAD *et al.*, 2012).

2.4. Criopreservação e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*

A criopreservação embrionária é uma tecnologia assistida da reprodução que possibilita o armazenamento de embriões excedentes derivados da produção *in vitro* e programas de transferência de embriões, a fim de comercializá-los ou transferi-los no momento mais conveniente. É considerada uma estratégia para superar problemas de logística associados com a transferência de grande número de embriões frescos e principalmente para incrementar a expansão da comercialização de embriões entre diferentes países (SUDANO *et al.*, 2012).

Desde o primeiro sucesso da criopreservação de embriões, quando Whittingham e seus colaboradores no ano de 1971, obtiveram êxito com a transferência de embriões de camundongos criopreservados, diferentes procedimentos foram desenvolvidos para a criopreservação de embriões. As técnicas fundamentam-se nos princípios da criobiologia, ramo da biologia que descreve a vida em reduzidas temperaturas. O principal princípio da criobiologia é a redução da temperatura seguida por uma severa queda do metabolismo celular até a obtenção de um estado de repouso (quiescente), sem reações bioquímicas notáveis ocorrendo. Este estado possibilita o armazenamento do recurso genético por um período de tempo indeterminado, com a capacidade de restabelecimento das funções celulares após o descongelamento/aquecimento (SUDANO *et al.*, 2016).

A criopreservação de embriões é rotineiramente utilizada em programas comerciais de transferência de embriões (TE) bovinos produzidos *in vivo*; de acordo com a “*International Embryo Transfer Society*” (IETS), em 2015, aproximadamente 61% das transferências de embriões bovinos produzidos *in vivo* foram realizados utilizando embriões criopreservados. O número de embriões PIV criopreservados e transferidos, de oócitos obtidos a partir de “*Ovum Pick-Up*” (OPU), teve um aumento de 45% do ano de 2014 para 2015. No entanto, em 2015, a

TE criopreservados foi de apenas 24% a nível mundial, o que revela a preferência pela utilização de embriões frescos (PERRY, 2016).

Atualmente, duas técnicas básicas regem o campo da criopreservação de oócitos e embriões, o congelamento lento ou clássico e a vitrificação. Em meados de 1949, o glicerol foi designado como um eficiente crioprotetor para proteger espermatozoides durante o congelamento e curvas de congelamento lento foram apontadas como uma abordagem eficiente para a criopreservação celular (POLGE *et al.*, 1949). A primeira técnica, afim de criopreservar embriões, desenvolvida foi a de congelamento lento (WHITTINGHAM, 1971), a qual possui a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores, no entanto, permite a formação de cristais de gelo, responsáveis por causar lesões às membranas e organelas. A queda da temperatura é controlada mantendo-se uma curva constante até alcançar a temperatura de -32°C, quando as palhetas são expostas ao nitrogênio líquido. Sendo considerada a técnica de eleição para embriões produzidos *in vivo*, na qual o crioprotetor mais utilizado é o etilenoglicol (DODE *et al.*, 2013).

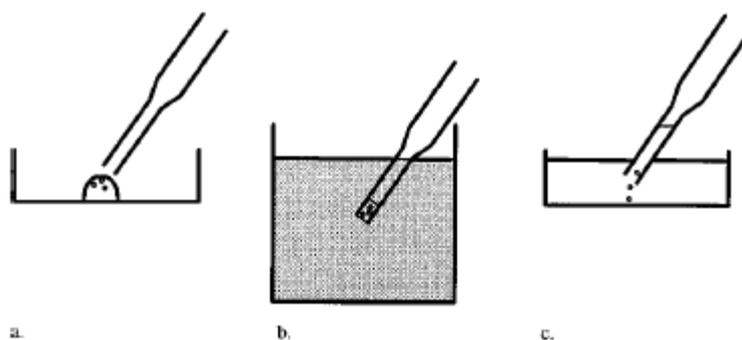
Em contraste com os espermatozoides, no qual a técnica de congelamento lento é quase que exclusivamente utilizada, e métodos alternativos são utilizados apenas a nível experimental (ISACHENKO, 2004) na criopreservação de embriões de mamíferos e especialmente oócitos, a vitrificação tornou-se uma alternativa promissora às abordagens clássicas. Ainda, a sobrevivência e as estatísticas de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* fornecem evidências de que os efeitos cumulativos tóxicos e osmóticos durante a vitrificação são inferiores aos causados pelo congelamento lento (KUWAYAMA, 2007).

O processo de vitrificação é a solidificação de uma solução à base de água sem a formação de quaisquer cristais de gelo, o que evita danos causados pela formação destes. É caracterizada por uma extrema elevação da viscosidade durante o resfriamento, resultando na formação de uma forma sólida muito semelhante a vidro. Para induzir este fenômeno sob condições práticas, existem dois requisitos: concentrações relativamente elevadas de crioprotetores, substâncias penetrantes ou não-penetrantes que interferem na formação de cristais de gelo e proteção de estruturas biológicas, e maiores taxas de resfriamento e aquecimento ($> 20.000^{\circ} \text{C}/\text{min}$). Assim, a vitrificação contorna dois dos principais fatores limitantes para o sucesso na criopreservação: as lesões de resfriamento e formação de cristais de gelo (VAJTA, 2000). No entanto, além da vitrificação, não possibilitar a transferência direta de embriões, a toxicidade dos crioprotetores utilizados no método é elevada e as células apenas podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (VAJTA *et al.*, 1998).

A velocidade de resfriamento depende do volume da solução utilizada, de modo que quanto menor o volume da amostra, maior a taxa de resfriamento. Neste caso, o contato direto com o nitrogênio líquido também colabora com as altas taxas de resfriamento. Com o objetivo de evitar a formação de cristais de gelo altas concentrações de crioprotetores são utilizadas, as quais foram descritas como tóxicas para as células. Contudo, a combinação destes pode atenuar a toxicidade individual específica, na qual a mais comumente utilizada é etilenoglicol, dimetilsulfóxido e sacarose (Revisado por MORATÓ *et al.*, 2008).

Para desenvolver a técnica e propiciar mudanças extremamente rápidas de temperatura, foram desenvolvidas ferramentas específicas como a “*Open Pulled Straw*” (VAJTA, *et al.*, 1998) e o “*Cryotop*” (KUWAYAMA *et al.*, 2005). Ambas as técnicas permitem o carregamento de amostras em volumes muito pequenos (< 1 uL) e proporcionam o contato direto entre a solução e o nitrogênio líquido, como também nas soluções de aquecimento, nas quais essas ferramentas são submersas. A técnica de “*Open Pulled Straw*” (figura 1) provocou um grande impacto no uso da vitrificação, sendo uma técnica bastante utilizada para ovócitos e embriões de diversas espécies de mamíferos. Vários autores relataram resultados positivos com o uso dessa técnica em embriões, demonstrando boas taxas de re-expansão e eclosão (VAJTA *et al.*, 1998; SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011).

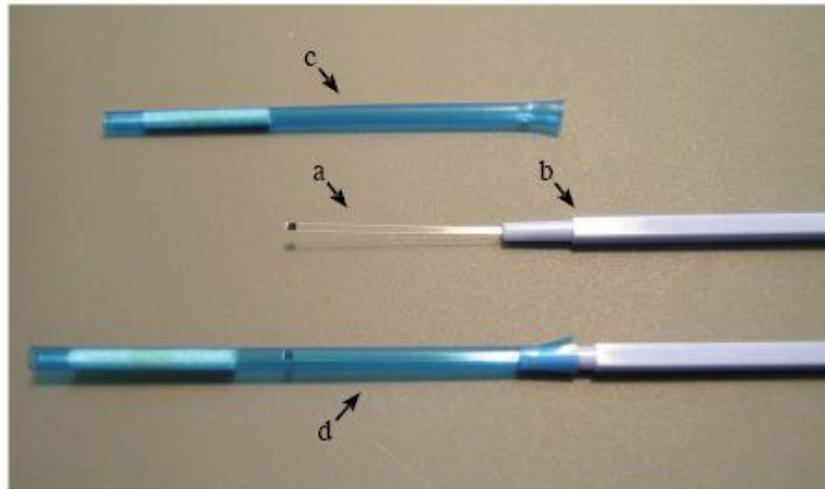
Figura 1 – Método *Open Pulled Straw* (OPS)



Na legenda da figura 1: a) Os ovócitos ou embriões são carregados na extremidade estreita da palheta por efeito capilar; b) O resfriamento é realizado pela introdução direta em N₂; c) No aquecimento, as palhetas são imersas no meio “holding”, o meio de vitrificação torna-se líquido e é imediatamente diluído. Mediante efeito da sedimentação, os embriões saem da palheta para o meio (VAJTA *et al.*, 1998).

A abordagem de volume mínimo do método *Cryotop* (figura 2) aumenta as taxas de resfriamento e especialmente as de aquecimento (até 40,000° C/min) o que pode contribuir com a sobrevivência e taxas de desenvolvimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Pode ser utilizada uma variedade de soluções crioprotetoras com este método e os padrões de equilíbrio e diluição podem variar conforme os requisitos específicos da espécie ou fase de desenvolvimento. O etilenoglicol, como um crioprotetor altamente permeável com toxicidade moderada, é considerado um componente padrão das soluções de vitrificação mais bem-sucedidas (KUWAYAMA, 2007).

Figura 2 – Ferramenta de vitrificação *Cryotop*



Na descrição da figura 2, a tira de polipropileno a) é presa a uma alça de plástico rígido; b) Após a vitrificação, uma tampa de plástico rígido; (c) é fixada para proteger a tira durante o armazenamento em N₂ (KUWAYAMA *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Estabelecer o modelo de alta e baixa criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*;

Identificar genes diferencialmente expressos entre embriões com alta e baixa sobrevivência após a criopreservação para o estabelecimento de assinaturas moleculares da competência e criotolerância embrionária.

3.2. Objetivos Específicos

Conduzir uma abordagem holística do padrão diferencial de expressão gênica entre blastocistos com alta e baixa criotolerância através da tecnologia de sequenciamento de nova geração (RNA-seq) visando identificar assinaturas moleculares de processos biológicos nobres associados com a competência e criotolerância embrionária para apontar mecanismos de resposta celular e retomada do desenvolvimento após a vitrificação e identificar potenciais moléculas moduladoras de tais eventos.

4. HIPÓTESE

Genes diferencialmente expressos em blastocistos com alta (HC) e baixa criotolerância (LC) modulam processos biológicos nobres ligados à competência e capacidade de sobrevivência embrionária após a criopreservação.

5. CAPÍTULO I

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito, que segue.

ARTIGO CIENTÍFICO

PERFIL TRANSCRICIONAL DA CRIOTOLERÂNCIA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Diana P. Caetano¹, Rafaela Rodrigues², Clara Barreira², Andrea Basso², Fernando S. Mesquita¹, Sonia C.S. Andrade³, Mateus J. Sudano^{1*}

¹School of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, Uruguai - RS, Brazil.

²In Vitro Brasil – IVB | ABS Pecplan, Mogi Mirim – SP, Brazil.

³Department of Genetics and Evolutionary Biology, University of São Paulo, São Paulo – SP, Brazil.

*Corresponding author: Mateus José Sudano, Rod. BR 472, Km 587, CP 118, 97.500-970, Uruguai/RS/Brasil: mjsudano@gmail.com

Abstract

Embryo cryosurvival is a complex process involving dynamic structural and molecular changes. The aim of this work was to establish the transcriptome of bovine blastocysts with high and low cryosurvival. Immature oocytes (n= 3926) were recovered from slaughterhouse-derived ovaries and in vitro matured, fertilized and culture under standard conditions. Cleavage and embryo production were recorded on day three and seven after fertilization, respectively. Expanded blastocysts (n= 894) with exceptional quality (grade I only) were vitrified by the cryotop method. Vitrified blastocysts were warmed and embryo re-expansion and hatching were recorded at 6 and 12 h after warming, respectively. A rigorous morphological evaluation was done by experienced technician and embryos were classified as high cryosurvival (HC: blastocysts with the blastocoel completely re-expanded followed by hatching 12 h after warming and without or with mild and few signs of degeneration); re-expanded (blastocysts with the blastocoel completely re-expanded but not followed by hatching 12 h after warming and with mild and few signs of degeneration), and low cryosurvival (LC: blastocysts without the blastocoel completely re-expanded followed by hatching 12 h after warming and with severe and frequently signs of degeneration) after cryopreservation. In order to increase accuracy of molecular differences among phenotypes, only HC and LC blastocysts (n= 3, total of 123 blastocysts per group, pool of 41 /sample) were used. Extracted RNA (PicoPure, ThermoFisher®) was evaluated through 2100-Bioanalyzer (Agilent®). Only samples with RNA integrity ≥ 7.7 were submitted to NEBNext Ultra II library preparation (New England Biolabs®) and RNAseq (Illumina®). Data were cleaned (seqClean), mapped (Tophat), reads counted (HTSeq-count), and differential expression analysis was performed (DESeq, R/Bioconductor). For gene enrichment analysis, ingenuity pathway analysis (IPA) software was used. Cleavage and blastocyst production rates were 73.2% (2873/3926) and 29.0% (1137/3926), respectively. The re-expansion (89.2 vs. 73.4%) and hatching (23.7 vs. 8.4) rates were higher ($P < 0.05$) at 12h compared with 6h after warming, respectively. A total of 17.8 millions of reads per sample were used in different expression analysis. Blastocysts samples were clearly separated with pronounced group individualization at two- and three-dimensional

principal component analysis and heat clustering mapping sustaining the phenotype characterization (high vs. low cryosurvival). A total of 9422 genes were identified, 114 were differently expressed genes (p-adjusted <0.05), with 27 and 84 genes up-regulated in HC and LC, respectively. Among the top five biological functions identified (p-adjusted <0.1), organismal survival, cell death and survival, cellular growth and proliferation were predicted to be activated (z-score $\geq +2$) whereas cellular movement and cell-to-cell signaling were predicted to be inhibited (z-score ≤ -2) at IPA. Therefore, the present work provided a comprehensive analysis of the transcriptional profile of bovine embryo cryosurvival and elucidated the involvement of a great number of noble biological processes molecules in the embryo development resumption after cryopreservation.

Keywords: Embryos, in vitro production, cryopreservation, cryotolerance, transcriptome, bovine.

Resumo

A criotolerância embrionária é um processo complexo que envolve mudanças estruturais e moleculares dinâmicas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer o transcriptoma de blastocistos bovinos com alta e baixa criotolerância. Os oócitos imaturos (n = 3926) foram recuperados de ovários derivados de abatedouros e maturados, fertilizados e cultivados sob condições padrão. A clivagem e a produção embrionária foram registradas no dia três e sete após a fertilização, respectivamente. Blastocistos expandidos (n= 894) com qualidade excepcional (apenas grau I) foram vitrificados pelo método *Cryotop*. Os blastocistos vitrificados foram aquecidos e a re-expansão e eclosão foram registradas às 6 e 12 h após o aquecimento, respectivamente. Uma avaliação morfológica rigorosa foi realizada por técnicos experientes e os embriões foram classificados como alta criotolerância (HC: blastocistos com a blastocele completamente re-expandida) seguido de eclosão 12 h após o aquecimento, sem sinais de degeneração); re-expandido (blastocistos com a blastocele completamente re-expandida, mas não seguido de eclosão 12 h após o aquecimento, com leves e poucos sinais de degeneração), e baixa criotolerância (LC: blastocistos com ausência de blastocele completamente re-expandida seguido de eclosão 12 h após o aquecimento, e com sinais graves e frequentes de degeneração) após a criopreservação. A fim de aumentar a precisão das diferenças moleculares entre os fenótipos, foram utilizados apenas blastocistos de HC e LC (n = 3, total de 123 blastocistos por grupo, pool de 41/amostra). O RNA extraído (PicoPure, ThermoFisher®) foi avaliado através do 2100-Bioanalyzer (Agilent®). Apenas amostras com integridade de RNA $\geq 7,7$ foram submetidas à preparação da biblioteca NEBNext Ultra II (New England Biolabs®) e RNAseq (Illumina®). Os dados foram limpos (seqyClean), mapeados (Tophat), as leituras contadas (HTSeq-count) e análise de expressão diferencial realizada (DESeq, R / Bioconductor). Para a análise do enriquecimento gênico, foi utilizado o software “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA). As taxas de clivagem e produção de blastocistos foram 73,2% (2873/3926) e 29,0% (1137/3926), respectivamente. As taxas de re-expansão (89,2 vs. 73,4%) e de eclosão (23,7 vs. 8,4) foram maiores (P <0,05) às 12 h em comparação com 6 h após o aquecimento, respectivamente. O total de 17,8 milhões de leituras por amostra foi utilizado em diferentes análises de expressão. Amostras de blastocistos foram claramente separadas com individualização de grupo pronunciada na análise de componentes principais bi e tridimensionais e mapeamento de agrupamento térmico sustentando a caracterização do fenótipo (alta *versus* baixa criotolerância). Um total de 9.422 genes foram identificados, 114 foram diferencialmente expressos (p <0,05), com 27 e 84 genes superexpressos em HC e LC,

respectivamente. Entre as cinco principais funções biológicas identificadas ($p < 0,1$), a sobrevivência do organismo, sobrevivência e morte celular, proliferação e crescimento celular foram preditos ativados (escore $z \geq +2$), enquanto movimento celular e sinalização célula a célula foram preditos inibidos (escore $z \leq -2$) no IPA. Portanto, o presente trabalho forneceu uma análise abrangente do perfil transcricional da criopreservação de embriões bovinos e elucidou o envolvimento de um grande número de processos biológicos nobres na retomada do desenvolvimento embrionário após a criopreservação.

Palavras-chave: Embriões, produção *in vitro*, criopreservação, criotolerância, transcriptoma, bovinos.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação embrionária é uma tecnologia da reprodução assistida que possibilita o armazenamento de embriões excedentes derivados da produção *in vitro* (PIV) e *in vivo* (IVD) por longos períodos, enquanto não são comercializados ou transferidos. É considerada uma das áreas mais desafiadoras dentre as biotecnologias da reprodução, a qual promove efeitos estruturais e bioquímicos prejudiciais à viabilidade embrionária (SUDANO *et al.*, 2011). Os embriões PIV criopreservados apresentam reduzidas e heterogêneas taxas de prenhez após a transferência, as quais giram em torno de 10-40%. Já embriões IVD criopreservados demonstram taxas mais elevadas e homogêneas de prenhez (40-60%) muito próximas as obtidas com embriões PIV e IVD frescos (50-60%) (NEDAMBALE *et al.*, 2004; SARAGUSTY AND ARAV, 2011).

Atualmente, na criopreservação de embriões PIV e especialmente oócitos, a vitrificação tornou-se uma alternativa promissora às abordagens clássicas, pois contorna dois dos principais fatores limitantes para o sucesso na criopreservação: as lesões de resfriamento e a formação de cristais de gelo (VAJTA, 2000). No entanto, a toxicidade dos crioprotetores utilizados no método é elevada e as células apenas podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (VAJTA *et al.*, 1998). Contudo, a sobrevivência após a vitrificação e as taxas de desenvolvimento *in vitro* evidenciam que os efeitos cumulativos tóxicos e osmóticos durante a vitrificação são inferiores aos danos causados pela técnica de congelamento lento (KUWAYAMA, 2007).

A avaliação da morfologia embrionária ainda é o método mais utilizado para diferenciar embriões viáveis e não viáveis para a transferência (ALIKANI *et al.*, 1999). No entanto, esta abordagem pode ser considerada pouco precisa, além de existir a possibilidade de variações nos escores de avaliação entre os profissionais (FARIN *et al.*, 1999). Além da morfologia, taxas de clivagem e de blastocistos (ALIKANI *et al.*, 2002), taxa de eclosão (VAN SOOM, 1997),

cinética embrionária (LEMMEN *et al.*, 2008), metabolismo embrionário (LEESE, 2002), bem como a avaliação molecular são utilizados no intuito de prever a viabilidade e competência do embrião.

É bem descrito que o processo de criopreservação de embriões PIV afeta a sobrevivência e qualidade embrionária, diversos estudos investigaram os efeitos a nível molecular do congelamento lento e vitrificação nestes embriões demonstrando a presença de genes diferencialmente expressos (GDEs) (STINSHOFF *et al.*, 2010; LARMAN *et al.*, 2011; LEME *et al.*, 2016). No estudo de Gupta *et al.*, (2017) melhores taxas de re-expansão embrionária foram demonstradas em mórulas vitrificadas quando comparadas as criopreservadas pelo método de congelamento lento, no entanto dados de microarranjo revelaram um perfil transcricional perturbado (comprometimento da implantação e placentação no útero, etc.) dos blastocistos sobreviventes desenvolvidos à partir de mórulas vitrificadas.

Os avanços e a maior parte das alterações nos protocolos de criopreservação basearam-se em medidas empíricas, avaliando-se taxas de sobrevivência e subsequente desenvolvimento embrionário, e em última análise, como um indicador mais aprimorado do sucesso de um protocolo, o potencial de implantação e a gestação a termo (LARMAN, 2011). Assim, o perfil molecular pode ser utilizado como marcador de qualidade embrionária, efetividade do meio de cultivo e capacidade de sustentar uma prenhez bem-sucedida (KUZMANY *et al.*, 2011; STINSHOFF *et al.*, 2011). Além disso, GDEs já foram observados em embriões PIV quando comparados aos embriões IVD (SUDANO *et al.*, 2012), ainda no estudo de Leme *et al.* (2016), foi demonstrado um número de GDEs associados a resposta ao processo de vitrificação. Contudo, ainda há uma grande lacuna no conhecimento de como a criopreservação afeta o funcionamento embrionário. Neste sentido, na busca do melhor entendimento e aperfeiçoamento de uma técnica de criopreservação, a combinação do estudo da biologia celular e molecular é muito promissora (GARDNER *et al.*, 2007).

O conhecimento da expressão gênica global de embriões com alta e baixa criotolerância permitirá aos pesquisadores obter informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na sobrevivência embrionária após a criopreservação e contribuir com o melhoramento genético e aumento da lucratividade nos rebanhos bovinos. Muito pouco se conhece acerca do perfil transcricional de embriões PIV com alta e baixa criotolerância após reduzidas temperaturas.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma análise de transcriptoma em embriões com alta e baixa criotolerância após a vitrificação, a fim de elucidar estratégias e entender os mecanismos envolvidos na capacidade de sobrevivência de embriões

PIV após a criopreservação, bem como identificar diferenças no perfil transcricional entre os fenótipos embrionários.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos relativos à PIV de embriões, criopreservação e re-cultivo embrionário foram realizados nos laboratórios da *In Vitro Brasil* – IVB | ABS Pecplan, Mogi Mirim, SP. O RNA-seq foi realizado em um laboratório de facilidades genômicas.

2.2. Coleta e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos

Os oócitos foram obtidos de ovários *Bos taurus* (predominantemente *Bos taurus indicus*) coletados em abatedouro e transportados até o laboratório a 35°C por até 6 horas. Foram aspirados os folículos ovarianos entre 2 e 8 mm de diâmetro, com agulha 21-gauge acoplada a seringas de 10 mL. O fluido folicular foi mantido em tubo cônico de 15 mL com temperatura de 38°C para a seleção dos complexos *cumulus* oócitos (CCOs) que apresentavam ooplasma homogêneo e com mais de 3 camadas de células do *cumulus*. Um total de 3926 oócitos foram maturados *in vitro* e incubados a temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, durante 24h. O processo de maturação foi conduzido em grupo de 25 a 30 CCOs, em gotas contendo 90 µL de meio MIV (Meio *In Vitro* Brasil – IVB | ABS Pecplan, Mogi Mirim, SP), alocadas em placa de Petri, e cobertas com óleo mineral.

2.3. Fecundação *in vitro*

Após o período de maturação, grupos de 25-30 oócitos foram transferidos a gotas contendo 90 uL de meio de fertilização, cobertas com óleo mineral. Os oócitos foram submetidos a fertilização *in vitro* (FIV) com sêmen congelado proveniente de 3 touros com fertilidade comprovada. Os espermatozoides foram selecionados pelo método de Percoll (PARRISH, 1995), na concentração de 2×10^6 espermatozoides/mL. A fertilização ocorreu em Tyrodes modificado para o meio de fertilização *in vitro* (Meio *In Vitro* Brasil – IVB | ABS Pecplan, Mogi Mirim, SP). Os oócitos e espermatozoides foram co-cultivados sob as mesmas condições que a MIV durante aproximadamente 18 horas.

2.4 Cultivo *in vitro*

Após o co-cultivo entre oócitos e espermatozoides, os prováveis zigotos foram desnudados (Tyrode modificado sêmen) através de sucessivas pipetagens e transferidos aleatoriamente para placas de cultivo em gotas (25-30 estruturas) de 90 uL de mSOF, cobertas com óleo mineral. O período de cultivo realizou-se em meio mSOF (Meio *In Vitro* Brasil – IVB | ABS Pecplan, Mogi Mirim, SP). Os embriões permaneceram incubados a temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂, balanço de N₂ e umidade saturada até o dia 7 após a fertilização.

2.5. Vitrificação dos embriões

Todos os embriões no estágio de blastocisto expandido (Bx) no dia 7 do cultivo, foram vitrificados de acordo com o método *Cryotop*, como descrito por Sanches *et al.*, (2013). Brevemente, blastocistos expandidos de excelente qualidade (grau I) foram lavados em meio base (TCM-HEPES + 20% de SFB), e após transferidos para solução V1, a qual consiste em meio base suplementado com 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO (WakoPure Chemical Industries Co.) por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução V2, consistindo 20% de etilenoglicol, 20% de DMSO e 0,5 M de sacarose em meio base, mantidos durante 20 segundos à temperatura ambiente, e carregados até o topo da faixa de polipropileno de um *Cryotop* (de três a cinco embriões) com uma quantidade mínima de solução de vitrificação e rapidamente imerso em nitrogênio líquido (N₂).

2.6. Aquecimento e re-cultivo dos embriões

Após o armazenamento por mais de 2 meses em N₂ líquido, os blastocistos foram expostos a temperatura ambiente durante 4 segundos, aquecidos por imersão da faixa de polipropileno em meio base (TCM-HEPES + 20% SFB e 0,3 M sacarose) a 35°C e transferidos imediatamente ao meio base a temperatura ambiente, em duas diluições sequenciais, (0,3 e 0,15 M sacarose por 5 minutos cada). Os blastocistos foram re-cultivados em gotas de 90 µL de meio mSOF (Meio *In Vitro* Brasil – IVB | ABS Pecplan) sob óleo mineral a 38,5°C, umidade saturada, e atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e balanço de N₂. Após aquecimento e re-cultivo durante 12h, os blastocistos foram submetidos a avaliação morfológica considerando: a) expansão da blastocele; b) eclosão da blastocele; c) organização e integridade da massa celular interna e trofotoderma; e d) coloração e extrusão de blastômeros. Em seguida, baseado na avaliação morfológica, os blastocistos foram estratificados em três grupos distintos: 1) Blastocistos viáveis após a criopreservação (alta criotolerância – definido como blastocistos

que apresentaram a blastocele completamente re-expandida seguida da eclosão com 12h de re-cultivo após o aquecimento, e sem sinais de degeneração); 2) Blastocistos re-expandidos após a criopreservação (definido como blastocistos que apresentaram a blastocele completamente re-expandida não seguida da eclosão com 12h de re-cultivo após o aquecimento, e com poucos sinais leves de degeneração); 3) Blastocistos não viáveis após a criopreservação (baixa criotolerância - definido como blastocistos que não apresentaram a blastocele completamente re-expandida não seguida da eclosão com 12h de re-cultivo após o aquecimento, e com sinais severos e frequentes de degeneração).

Após estratificação dos blastocistos nos três grupos (fenótipos), foram utilizados apenas os grupos extremos, ou seja, blastocistos classificados como viáveis/alta criotolerância (HC) ou não-viáveis/baixa criotolerância (LC) após a criopreservação (grupos 1 e 3) para reduzir a chance de ocorrer alguma eventual sobreposição dos fenótipos estabelecidos. Os demais embriões (grupo 2) não foram utilizados.

2.7. Determinação de genes diferencialmente expressos por RNA-seq

Três réplicas de blastocistos HC e três réplicas de blastocistos LC após a criopreservação (3 pools contendo 41 blastocistos em cada; total de 123 por grupo) foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (RNA-seq) para a investigação do perfil holístico transcricional em um laboratório de facilidades genômicas. O RNA total de cada réplica foi extraído e purificado utilizando o Kit Pico Pure RNA Isolation (Life Technologies), incluindo a digestão com DNase I na purificação com coluna (Qiagen). As réplicas foram submetidas por todas as avaliações de controle de qualidade pré-sequenciamento, e então submetidas ao RNA-Seq.

A qualidade do RNA foi avaliada com o Qubit 3 (Invitrogen) e a integridade foi verificada com o 2100 Bioanalyzer (Agilent). Todas as amostras apresentaram boa qualidade e RIN (RNA integrity number) $\geq 7,7$ sendo consideradas adequadas. Para a análise dos perfis de expressão, as bibliotecas foram preparadas usando um protocolo NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England, Biolabs, MA, EUA), de acordo com a recomendação do fabricante.

A filtragem de qualidade foi realizada por seqyClean v1.3.12. (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean/get/stable.zip>) utilizando um mínimo de 26 vetores de qualidade Phred e sequências de adaptadores do banco de dados Univec (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/>) foram utilizadas como guia para remover possíveis e comprimento mínimo de leituras de 65 bases. Apenas sequências de alta

qualidade pareadas foram mantidas para análises posteriores. As leituras foram mapeadas com Tophat v.2.0.8 (KIM *et al.*, 2013) e Bowtie2 v2.1.0 (LANGMEAD & SALZBERG, 2012) no genoma bovino “mascarado” (*Bos taurus* UMD 3.1, NCBI). As isoformas foram obtidas com o pacote Cufflinks v.2.1.1 (TRAPNELL *et al.*, 2012), com o arquivo de anotação (.gtf) como guia através da opção – G (o conjunto RABT) e especificamente as isoformas do gene PGR foram pesquisadas.

O arquivo de mapeamento foi classificado usando SAMTools v 0.1.18 (LI *et al.*, 2009) e as contagens de leitura foram obtidas usando o script de HTSeq-count v0.5.4p2 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/count.html>). A análise de expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq v1.12.1 (ANDERS, 2010), de R/Bioconductor (GENTLEMAN *et al.*, 2004). Utilizando a função “estimar fatores de tamanho”, foram obtidas as contagens normalizadas (valores baseMean, que são o número de leituras dividido pelo fator de tamanho ou constante de normalização). O desvio padrão ao longo dos valores baseMean também foi calculado para cada transcrição. A fim de evitar artefatos causados por baixos perfis de expressão e alta variância de expressão, apenas transcritos que obtiveram uma média de baseMean > 5 e a média maior que a variação padrão foram analisados. O método para testar a expressão diferencial foi a distribuição binomial negativa, através da função nbinom Test no DESeq. O limiar para avaliar a significância foi obtido pela aplicação de um valor p de 0,05 FDR-Benjamini-Hochberg.

2.8. Análise Funcional da expressão diferencial de genes

O programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems; <http://www.ingenuity.com>) foi utilizado para identificar os processos biológicos e as funções dos transcritos diferencialmente expressos e estabelecer interações entre os GDEs dentro da base de dados, com outras moléculas da base de dados do IPA, para elucidar o que está direcionando sua transcrição. Adicionalmente, o IPA foi usado também para gerar vias canônicas e as vias de interações dos genes (networks) que são enriquecidas significativamente com os GDEs identificados entre embriões HC e LC.

2.9. Análise estatística

Para análise estatística, modelos uni e multivariados de dados foram utilizados com o auxílio de softwares estatísticos robustos capazes de avaliar uma grande quantidade de dados. Resumidamente, os dados do RNA-Seq foram avaliados com auxílio do com o pacote DESeq v1.12.1 do software R. A análise de enriquecimento foi realizada com os softwares Ingenuity

Pathway Analysis (IPA). Adicionalmente, o procedimento GLIMMIX (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado pelo método dos quadrados mínimos. Fontes de variação nos modelos incluindo criotolerância (HC e LC após a criopreservação) e réplica foram consideradas como efeito fixo e aleatório, respectivamente. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$) para a análise de expressão gênica diferencial e criotolerância, enquanto de 10% ($P < 0,1$) para análise de enriquecimento.

3. RESULTADOS

Durante o experimento, a taxa média de clivagem foi de 73,2% e de produção de blastocistos foi de 29,0%, na avaliação em D7 após a fertilização. Dos 1137 blastocistos expandidos (Bx) produzidos, 894 Bx foram classificados como grau I e selecionados para a técnica de vitrificação. A partir de avaliações morfológicas, a taxa de re-expansão dos embriões aquecidos com 6 horas de re-cultivo foi menor ($P < 0,0001$) comparada com a de 12 horas. Da mesma forma, a taxa de eclosão com 6 h de re-cultivo foi menor ($P < 0,0001$) quando comparada com 12 horas após o aquecimento (Tabela 1).

Tabela 1: Taxas de re-expansão e eclosão dos blastocistos vitrificados, avaliadas às 6 e 12 h de re-cultivo após o aquecimento.

Horas após Aquecimento	Re-expansão (%)	Eclosão (%)
6hs	73,4 (656/894) ^a	8,4 (72/894) ^a
12hs	89,2 (797/894) ^b	23,7 (212/894) ^b
P value	< 0,0001	< 0,0001

^{a,b} Sobrescritos incomuns na mesma coluna indicam diferença.

3.1. Análise do transcriptoma

A análise de RNA-seq foi realizada para comparar o perfil da expressão gênica em embriões LC e HC após a criopreservação. Uma média total de 17,8 milhões de leituras por amostra foi utilizada nas análises de expressão diferencial. As amostras de grupos de blastocistos HC e LC foram claramente separadas com individualização pronunciada na análise de componentes principais bi e tridimensionais (Figura 1: A e B, respectivamente) e agrupamento de Heat Map (Figura 2), sustentando a caracterização fenotípica do modelo (alta vs. baixa criotolerância). Do total de 9.422 transcritos, 114 foram expressos de forma diferente

(DEG; FDR: $P < 0,05$), dos quais 87 genes demonstraram reduzida expressão e 27 genes estavam superexpressos nos embriões HC (Figura 3). Os 20 principais genes superexpressos nos embriões HC e LC, respectivamente, encontram-se na tabela 2 e 3.

Figura 3 – Análise de componentes principais bidimensionais (A) e tridimensionais (B)

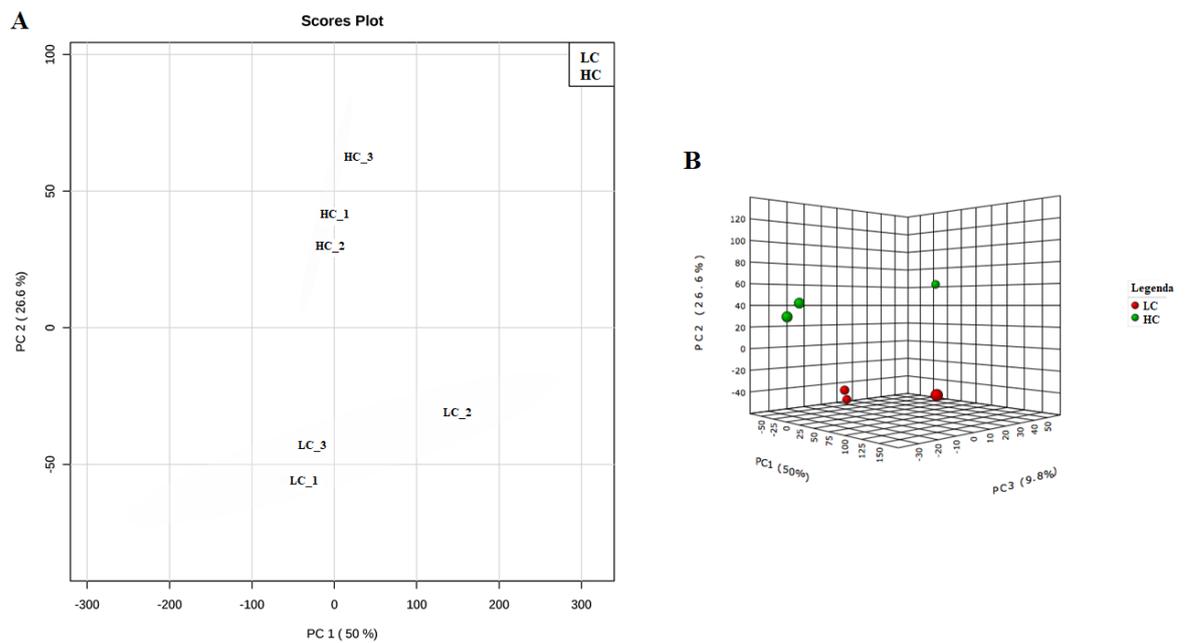


Figura 4 – Análise de agrupamento de Heat Map.

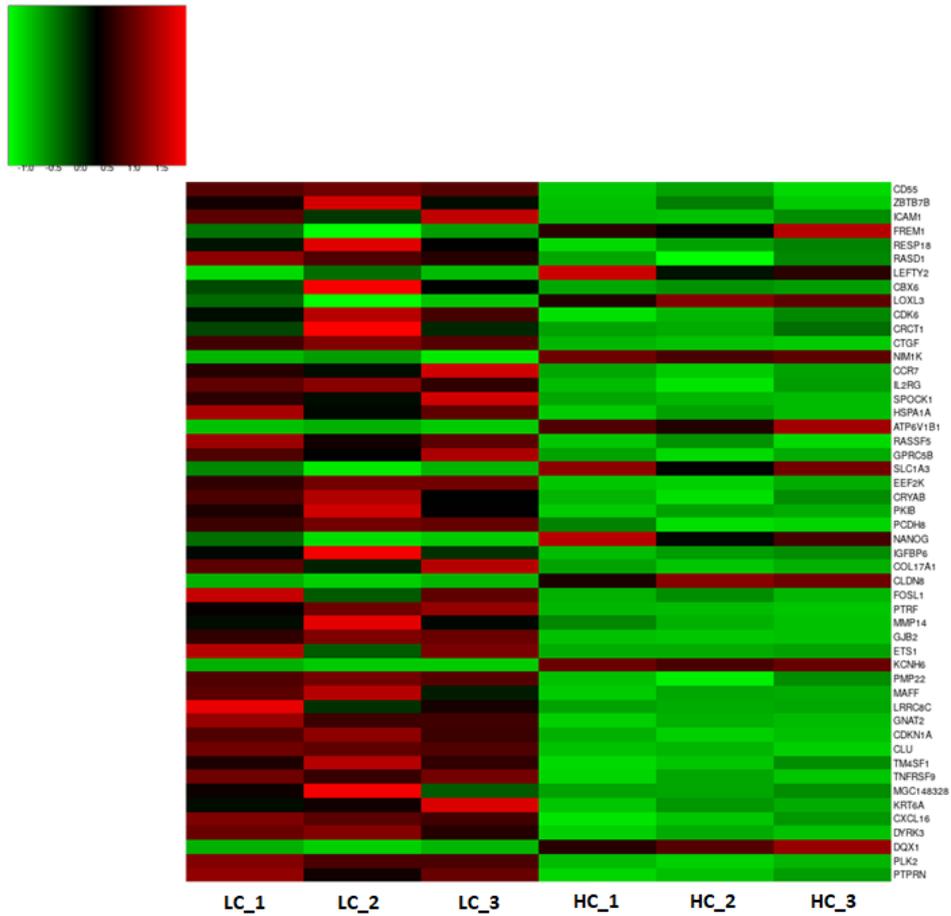


Figura 5 – Diagrama de Venn ilustrando os genes pouco expressos (*down-regulated*) e superexpressos (*up-regulated*) em embriões com alta criotolerância (*Viable*).

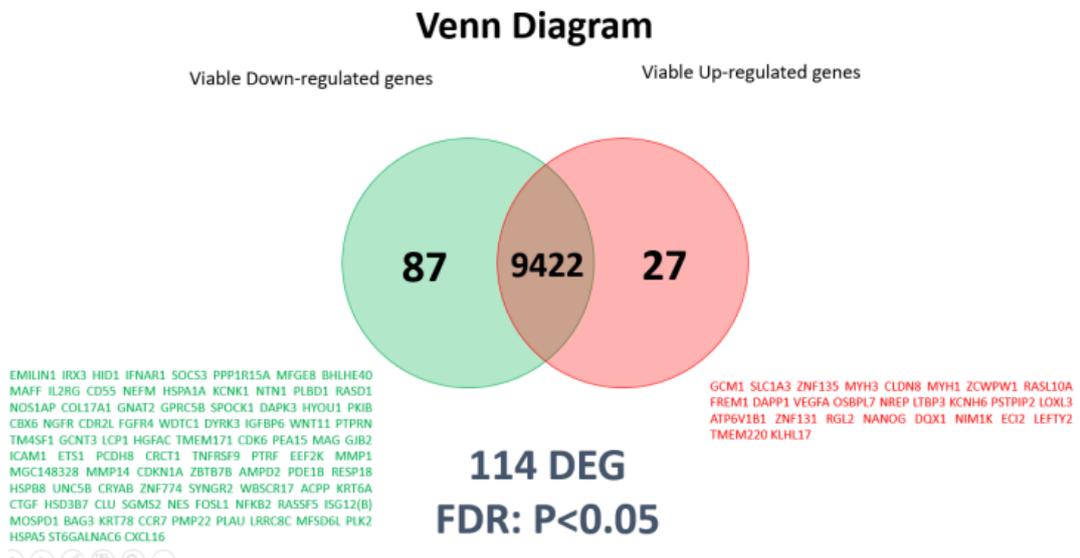


Tabela 2: Top 20 genes superexpressos em embriões HC.

Gene	Nome	Fold Change	P-adjusted
<i>DQX1</i>	DEAQ-box RNA dependent ATPase 1	2,740	0,000
<i>KCNH6</i>	potassium voltage-gated channel subfamily H member 6	2,399	0,001
<i>CLDN8</i>	claudin 8	2,066	0,002
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	2,383	0,002
<i>SLC1A3</i>	solute carrier family 1 member 3	2,144	0,002
<i>ATP6V1B1</i>	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit B1	1,864	0,002
<i>NIM1K</i>	NIM1 serine/threonine protein kinase	4,410	0,004
<i>LOXL3</i>	lysyl oxidase like 3	2,236	0,006
<i>LEFTY2</i>	left-right determination factor 2	2,959	0,008
<i>FREM1</i>	FRAS1 related extracellular matrix 1	2,541	0,009
<i>PSTPIP2</i>	proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2	1,795	0,013
<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A	1,880	0,013
<i>ZCWPW1</i>	zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1	2,811	0,015
<i>RGL2</i>	ral guanine nucleotide dissociation stimulator like 2	1,715	0,017
<i>ZNF135</i>	zinc finger protein 135	2,496	0,018
<i>OSBPL7</i>	oxysterol binding protein like 7	1,809	0,018
<i>RASL10A</i>	RAS like family 10 member A	2,029	0,021
<i>MYH1</i>	myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult	2,524	0,023
<i>ZNF131</i>	zinc finger protein 131	1,683	0,033
<i>ECI2</i>	enoyl-CoA delta isomerase 2	1,720	0,038

Tabela 3: Top 20 genes superexpressos em embriões LC.

Gene	Nome	Fold Change	P-adjusted
<i>PTPRN</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type N	3,343	0,000
<i>PLK2</i>	polo like kinase 2	2,566	0,000
<i>DYRK3</i>	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 3	2,911	0,000
<i>CXCL16</i>	C-X-C motif chemokine ligand 16	2,824	0,000
<i>KRT6A</i>	keratin 6A	6,078	0,000
<i>MGC148328</i>	uncharacterized LOC783058	11,819	0,000
<i>TNFRSF9</i>	TNF receptor superfamily member 9	4,505	0,000
<i>TM4SF1</i>	transmembrane 4 L six family member 1	3,385	0,000
<i>CLU</i>	clusterin	2,330	0,000
<i>CDKN1A</i>	cyclin dependent kinase inhibitor 1A	2,274	0,000
<i>GNAT2</i>	G protein subunit alpha transducin 2	2,651	0,000
<i>LRRC8C</i>	leucine rich repeat containing 8 family member C	5,755	0,000
<i>MAFF</i>	MAF bZIP transcription factor F	2,436	0,000
<i>PMP22</i>	peripheral myelin protein 22	3,287	0,001
<i>ETS1</i>	ETS proto-oncogene 1, transcription factor	2,943	0,001
<i>GJB2</i>	gap junction protein beta 2	4,896	0,001
<i>MMP14</i>	matrix metalloproteinase 14	2,337	0,001
<i>PTRF</i>	polymerase I and transcript release factor	2,431	0,001
<i>FOSL1</i>	FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit	2,724	0,002
<i>COL17A1</i>	collagen type XVII alpha 1 chain	2,298	0,002

3.2 Caracterização Funcional

As características funcionais dos transcritos diferencialmente expressos foram analisadas pelo programa IPA. Na análise de enriquecimento dos GDE's (FDR: $P < 0,1$), as cinco principais funções biológicas identificadas foram movimento celular (66 moléculas), desenvolvimento celular (82 moléculas), crescimento e proliferação celular (79 moléculas) e morte e sobrevivência celular (80 moléculas), Figura 4A. O IPA foi usado também para estabelecer as interações entre os GDEs dentro dos dados e com outras moléculas na base de dados do programa. As vias moleculares mais importantes geradas pelo programa, além de estarem associadas as cinco principais funções citadas acima, foram associadas ao tráfego de células imunes, sobrevivência do organismo, injúrias e anormalidades do organismo, desenvolvimento do organismo e sinalização célula-célula.

Na análise de predição do IPA, as funções biológicas sobrevivência do organismo, sobrevivência e morte celular, crescimento e proliferação celular pareciam ser mais ativadas ($z\text{-score} \geq 2$), ao passo que o movimento celular e a sinalização de célula a célula pareciam ser mais inibidas ($z\text{-score} \leq -2$) conforme a figura (Figura 4B). A classificação ontológica dos GDEs no programa mostrou um pequeno número de moléculas importantes nas principais vias canônicas (Figura 4C), dentre elas a sinalização para IL-9 e IL-10, junções de oclusão, resposta de fase aguda e via STAT 3 (Figura 5).

Figura 6 – A. Principais funções biológicas identificadas. B. Heat Map demonstrando as funções previstas ativadas e inibidas nos embriões com alta criotolerância. C. Principais vias canônicas indicadas.

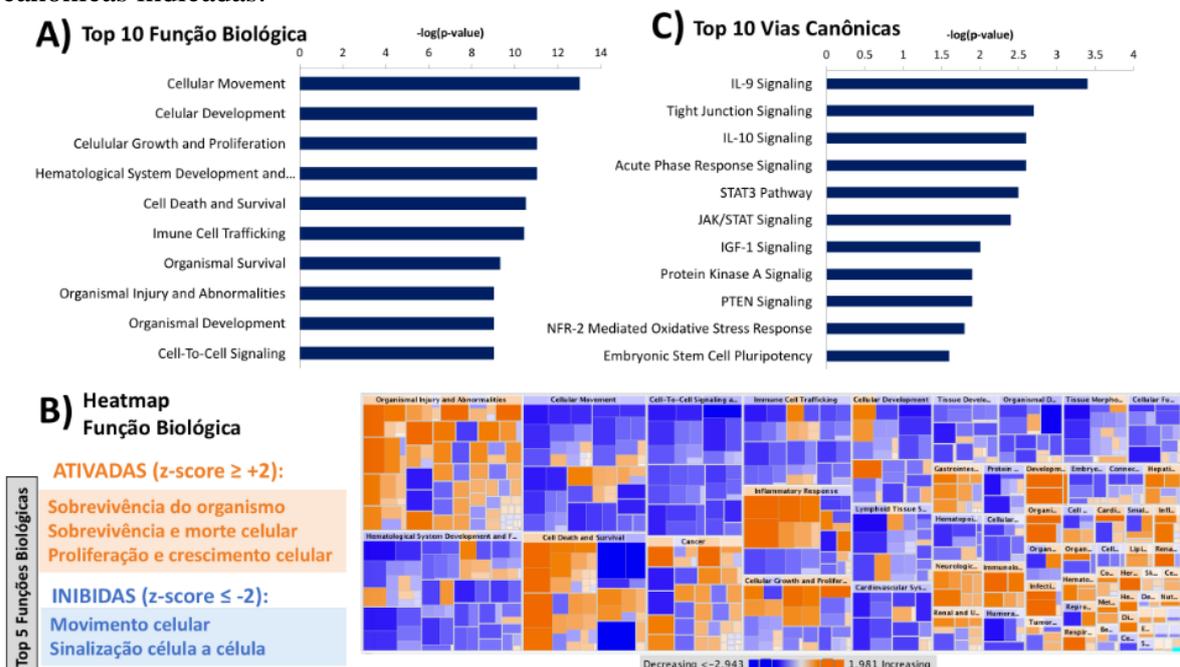
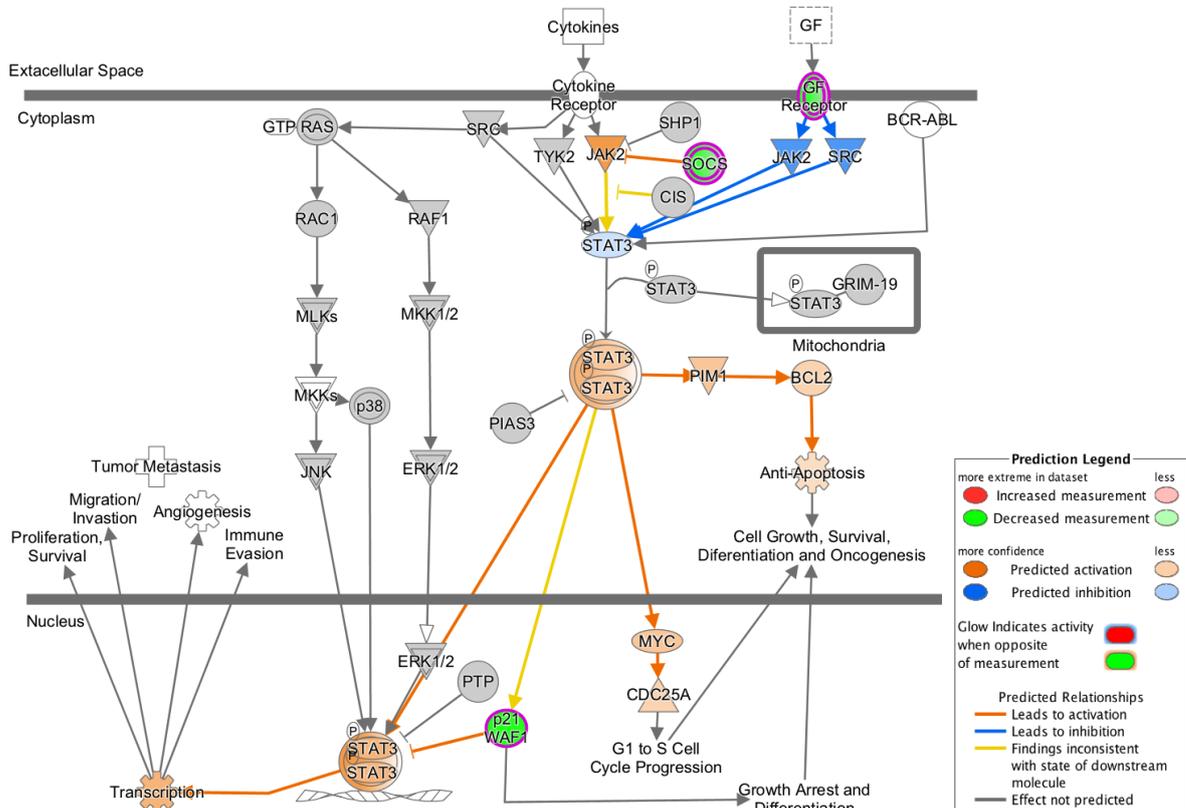


Figura 7 – Via canônica da Sinalização STAT3. Na análise de enriquecimento do IPA, a via JAK2/STAT3 foi predita ativa, possivelmente estimulando processos anti-apoptóticos, crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e oncogênese (a nível citoplasmático), como também induziu a transcrição de fatores envolvendo proliferação e sobrevivência, migração/evasão e angiogênese.



4. DISCUSSÃO

Neste estudo buscou-se identificar, pelo sequenciamento de nova geração (RNA-seq), o efeito da criopreservação no perfil transcricional de embriões bovinos com alta (HC) e baixa (LC) criotolerância. A vitrificação foi escolhida pelo fato de, atualmente, ser o método mais indicado para embriões PIV, além de existirem evidências claras que esta pode minimizar danos, elevar taxas de sobrevivência e eclosão quando comparada a técnica de congelamento lento (VAJTA *et al.*, 2006; STINSHOFF *et al.*, 2011).

No presente trabalho, foram identificados um total de 9422 genes, e ao comparar os perfis transcricionais de embriões PIV, foram encontrados 114 GDEs, com 27 e 84 genes superexpressos em HC e LC, respectivamente. Na análise de enriquecimento, um total de 177 genes foram considerados e as cinco principais funções biológicas identificadas foram movimentação celular (66 moléculas), desenvolvimento celular (82 moléculas), proliferação e

crescimento celular (79 moléculas) e morte e sobrevivência celular (80 moléculas). Na análise de predição do IPA, revelou que nos embriões HC as funções biológicas de sobrevivência do organismo, sobrevivência e morte celular, proliferação e crescimento celular pareciam mais ativadas ($z\text{-score} \geq +2$), ao passo que movimento celular e sinalização de célula a célula pareciam mais inibidas ($z\text{-score} \leq -2$).

O principal fundamento da criobiologia é a redução da temperatura seguida por uma severa queda do metabolismo celular até a obtenção de um estado de repouso (quiescente), sem a ocorrência de reações bioquímicas notáveis. Este estado possibilita o armazenamento do recurso genético por um período de tempo indeterminado, com a capacidade de reestabelecimento das funções celulares após o descongelamento/aquecimento (SUDANO *et al.*, 2016). Neste sentido, o embrião PIV possui características distintas quando comparado ao produzido *in vivo*, diferenças que envolvem condições morfológicas (PAPIS *et al.*, 2000) e moleculares que comprometem a qualidade e o desenvolvimento embrionário (ENRIGHT *et al.*, 2000), reduzindo a criotolerância e as taxas de prenhez (TESFAYE *et al.*, 2004; ENRIGHT *et al.*, 2000). Assim, a criopreservação deixa efeitos deletérios nestes embriões, podendo acometer com frequência a membrana plasmática e o citoesqueleto celular (ZERON *et al.*, 2002; DOBRINSKY *et al.*, 2000). Adicionalmente, Aksu *et al.*, (2012), também descreveram uma maior sensibilidade dos embriões PIV frente a criopreservação a nível molecular, representada por um maior número de GDEs entre embriões PIV frescos *x* vitrificados (962 genes) comparado aos frescos *x* vitrificados (17 genes) produzidos *in vivo*.

Como resposta fisiológica das células quando expostas a condições desfavoráveis, por exemplo, a exposição abrupta a diferentes temperaturas, mecanismos de defesa são ativados, os quais envolvem diferentes moléculas, incluindo as proteínas de choque térmico (HSPs) (BECKER & CRAIG, 1994). Na criopreservação, os embriões são expostos a uma variação de temperatura muito grande, a passagem da temperatura ambiente para -196°C , e novamente no descongelamento, que retornam a 35°C . Neste estudo, a expressão dos transcritos de *HSPA5* e *HSPB8* apresentaram-se superexpressos nos embriões LC, sugerindo um elevado estresse e menor capacidade deste grupo em vencer os desafios impostos pela técnica. Bem como no estudo de Sudano *et al.*, (2014) no qual a expressão de *HSPA5* também apresentou-se superexpressa em embriões PIV comparados a embriões produzidos *in vivo*, estando associada a viabilidade embrionária reduzida, seguida de uma redução da sobrevivência após a criopreservação.

Na análise de enriquecimento, duas importantes vias canônicas foram apontadas, a via de sinalização IL-9 e a via de sinalização STAT3. O STAT3 é um membro da família STATs

(Transdutores de sinal e ativadores de transcrição), é fundamental no desenvolvimento embrionário, de modo que a sua perda causa letalidade embrionária precoce (TAKEDA *et al.*, 1997). STAT3 foi originalmente identificado como fator de resposta de fase aguda, podendo ser ativado em resposta a uma variedade de citocinas, como por exemplo a IL-9. Já foi descrito seu papel no combate a apoptose em muitos tipos de células e é considerado um oncogene (LIU *et al.*, 2010). A grande variedade de citocinas e fatores de crescimento podem ativar a sinalização de Jak-STAT3, incluindo interferons (IFNs), interleucinas, proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros (O'SHEA *et al.*, 2002). Assim, a cascata JAK/STAT traduz um sinal extracelular em uma resposta transcricional em resposta a estímulos celulares, e por isso tem um papel vital em vários processos celulares envolvendo apoptose e crescimento celular (VOGEL *et al.*, 2015). A via JAK2/STAT3 foi predita ativa, possivelmente estimulando processos anti-apoptóticos, crescimento celular, sobrevivência, diferenciação e oncogênese (a nível citoplasmático), como também induziu a transcrição de fatores envolvendo proliferação e sobrevivência, migração/evasão e angiogênese. Logo, esta via pode indicar ser de fundamental importância na retomada embrionária após a criopreservação.

Em blastocistos bovinos o gene *KRT18* pode ser utilizado como marcador para diferenciação celular do trofotoderma (GOOSSENS *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, os níveis de transcritos para *KRT6A* e *KRT78* apresentaram-se superexpressos em embriões LC; achados similares foram encontrados anteriormente em embriões com qualidade inferior e com níveis de transcritos elevados para *KRT18* (SUDANO *et al.*, 2014). Apesar desses genes estarem relacionados com a ocorrência de um processo biológico nobre ao longo do desenvolvimento embrionário inicial, acredita-se que deva ocorrer um equilíbrio transcricional associado a diferenciação e formação do trofotoderma para a adequada formação de um blastocisto, e com uma qualidade superior, representada por uma elevada criotolerância.

Há relatos de que o gene *FOS*-like antigen 1 (*FOSL1*) é sinalizado como resposta ao estresse, sua superexpressão foi demonstrada em linhagens de cultivo celular, estando relacionada ao aumento da apoptose (SHIRSAT & SHAIKH, 2003). No estudo de Leme *et al.*, (2017) o gene *FOSL1* apresentou-se superexpresso em embriões submetidos a vitrificação, os autores sugeriram que o aumento da expressão para este gene pode tanto indicar que o embrião está se protegendo do estresse ou que a apoptose foi induzida por algum dano celular, nossos resultados estão de acordo com esses achados, visto que *FOSL1* apresentou-se superexpresso nos embriões LC, ou seja, embriões que não foram capazes de retomar o seu desenvolvimento após a criopreservação.

Claudin 8 (*CLD8*) codifica um membro da família Claudin. As claudinas são as principais constituintes envolvidas nas junções celulares. Estas junções regulam o transporte paracelular (o movimento de água e solutos entre as células epiteliais) e a manutenção da polaridade das células epiteliais (WATSON, 2004). Uma reduzida expressão de genes relacionados a Claudina e Actina foi associada com o atraso da eclosão de blastocistos após a vitrificação (GUPTA *et al.*, 2017). Ainda no estudo de Stinshoff *et al.*, (2011) a vitrificação causou reduzida expressão em genes relacionados a junções celulares e diferenciação celular (*DSC2*) em blastocistos bovinos. Neste estudo, Claudin 8 apresentou-se superexpresso em embriões com HC, o que pode ser considerado um marcador de viabilidade embrionária pós-criopreservação, após uma adequada re-expansão da blastocele, seguida de eclosão, após o aquecimento, visto que as junções celulares suportam os processos de expansão e eclosão embrionária (WATSON, 2004).

O gene *NANOG* possui um importante papel na auto-renovação de células-tronco embrionárias (CHAMBERS *et al.*, 2003) e na manutenção da MCI (MITSUI *et al.*, 2003), estando superexpresso em múltiplos estágios iniciais de embriões bovinos, principalmente na MCI logo em que o blastocisto é formado (KHAN *et al.*, 2012). Ainda, na análise de Hart *et al.*, (2004) foi demonstrado pela primeira vez que *NANOG* é expresso em epiblasto no embrião pós-implantação e está presente em níveis reduzidos em muitos tecidos adultos. No presente trabalho, a abundância de RNAm do *NANOG* apresentou-se superexpresso em embriões com HC, provavelmente ativando processos biológicos associados a proliferação de células da MCI e epiblasto, sugerindo que sua expressão é necessária para a manutenção da pluripotência e retomada do desenvolvimento do embrião após a vitrificação.

Da mesma maneira, os níveis de transcritos de RNAm para o gene *VEGFA* (fator de crescimento endotelial vascular A) estavam elevados nos blastocistos com maior sobrevivência após a criopreservação. A expressão de VEGF foi estudada pela primeira vez em blastocistos bovinos por Harvey *et al.*, (2004) estando relacionada a diferentes concentrações de O₂ no meio de cultivo. Estudos anteriores relataram a sua expressão tanto em embriões *in vitro* e *in vivo* em camundongos (INGMANN *et al.*, 2002), e em blastocistos humanos (KRÜSSEL *et al.*, 2001). O papel específico de VEGF expressado pelo blastocisto ainda é pouco elucidada, sugere-se que este gene pode ser fundamental na indução da angiogênese durante a implantação inicial no embrião humano (KRÜSSEL *et al.*, 2001). Além disso, Ferrara *et al.*, (1996) demonstraram que a perda de um único alelo de VEGF é letal em embriões de camundongo, resultante de modelos de *knockout*. Pela primeira vez demonstramos a expressão de *VEGFA* em embriões

com elevada sobrevivência após a criopreservação, estando possivelmente associado com a retomada do desenvolvimento embrionário após a criopreservação.

Os ativadores de plasminogênio (PAs) são serinas-proteases, que convertem o plasminogênio inativo em protease potente. O plasminogênio e seus ativadores e inibidores estão envolvidos no processo de implantação em humanos e ratos (AFLALO *et al.*, 2004; KHAMSI *et al.*, 1996). A redução da expressão do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (*PLAU*) foi associada a reabsorção de embriões bovinos (EL-SAYED *et al.*, 2006) como também a falha de implantação em camundongos (AXELROD, 1985), ambos os estudos realizados em embriões frescos. Contrariando os achados anteriores, neste estudo, o gene *PLAU* demonstrou-se pouco expresso em embriões HC, no entanto, sabe-se que as alterações no transcriptoma podem ser diferentes quando se trata de embriões criopreservados x frescos, como também descrito por Gupta *et al.*, (2017) em que o gene *PLAU* também apresentou-se pouco expresso em blastocistos oriundos de mórulas vitrificadas.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo fornece o perfil global molecular de embriões com alta e baixa criotolerância, um significativo número de GDEs associados com a resposta a criopreservação foi identificado na análise de RNA-seq, demonstrando diferenças evidentes no nível transcricional dos diferentes fenótipos. Foram identificados genes diferencialmente expressos com papéis conhecidos e genes cujas funções ainda precisam ser esclarecidas dentro do contexto estudado. A partir da análise de enriquecimento as funções biológicas sobrevivência do organismo, movimento celular, sobrevivência e morte celular, proliferação e crescimento celular parecem ser cruciais para a criotolerância e retomada do desenvolvimento embrionário após a criopreservação. Adicionalmente, os genes relacionados ao estresse térmico (*HSPA5*, *HSPB8*), diferenciação (*KRT6A*, *KRT7*), pluripotência (*NANOG*), implantação (*VEGFA*) podem estar associados a capacidade de sobrevivência após a criopreservação. Assim, os dados gerados neste estudo poderão servir de suporte para experimentos futuros no âmbito da criopreservação embrionária.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFLALO E.D. Differences in the implantation rates of rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*: possible role for plasminogen activators. **Fertility and Sterility**, v. 81, p. 780–785, 2004.

AKSU, D. A. *et al.* Gene expression profiles of vitrified *in vitro* and *in vivo*-derived bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, p. 1–13, 2012.

ANDERS, S; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, p. 1-12, 2010.

AXELROD, H. R. Altered trophoblast functions in implantation-defective mouse embryos. **Dev. Biol** v. 108, p. 185–190, 1985.

BECKER, J. & CRAIG, E.A. Heat shock proteins as a molecular chaperon. **European Journal of Biochemistry**, v. 219, p. 11–23, 1994.

CHAMBERS, I. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643–655, 2003.

DOBRINSKY, J.R. *et al.* Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, n. 62, p. 564–570, 2000.

EL-SAYED, A., *et al.* Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006.

ENRIGHT, B. P. *et al.* Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 659-73, 2000.

FERRARA, N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v. 380, p. 439-442, 1996.

GENTLEMAN, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, 2004.

GOOSSENS, K. *et al.* Identification and expression analysis of genes associated with bovine blastocyst formation. **BMC Dev. Biol.** v. 7, n. 64, p. 1-12, 2007.

GUPTA, A. *et al.* Transcriptomic difference in bovine blastocysts following vitrification and slow freezing at morula stage. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. 1-20, 2017.

HARVEY, A.J. *et al.* Oxygen-Regulated Gene Expression in Bovine Blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1108-1119, 2004.

HART, A.H. Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in mouse and human. **Developmental Dynamics**, v. 230, n. 1, p. 187-198, 2004.

INGMANN, S.C. *et al.* Expression of VEGF-system mRNAs in mouse blastocysts is not affected by in vitro culture. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 271–272, 2002.

KHAMSI, F; ARMSTRONG, D.T; ZHANG, X. Expression of urokinase-type plasminogene activator in human preimplantation embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 273–276, 1996.

KHAN, D. *et al.* Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1-12, 2012.

KIM, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, v. 14, p. 1-13, 2013.

KRÜSSEL, J. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 57 - 63, 2001.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73-80, 2007.

LANGMEAD, B; SALZBERG, SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat. Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2013.

LARMAN, M. *et al.* Analysis of global gene expression. following mouse blastocyst cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 26, n. 10, p. 2672-2680, 2011.

LEME, L. O. *et al.* Effect of vitrification using the cryotop method on the gene expression profile of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 724–733, 2016.

LI, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

LIU, Y. *et al.* Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in: human liver cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 35, p. 27429-27439, 2010.

LOUTRADI, K. E. *et al.* Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. 186-93, 2008.

MITSUI, K. *et al.* The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, p. 631–642, 2003.

MORATO, R. *et al.* Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, n. 2, p. 137-141, 2008.

NEDAMBALE, T. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 437-449, 2004.

O'SHEA, J.J.; GADINA, M.; SCHREIBER, R.D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. **Cell**, v. 109, n. 2, p. 121-131, 2002.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-8, 2000.

PARRISH, J. J. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171–1180, 1988.

SANCHES, B. V. *et al.* Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372–377, 2013.

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

SHIRSAT, N. V. & SHAIKH, S. A. Overexpression of the immediate early gene fra-1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces tumorigenicity of c6 glioma cells. **Experimental Cell Research**, v. 291, n. 1, p. 91-100, 2003.

STINSHOFF, H. *et al.* Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433–1441, 2011.

SUDANO M. J. *et al.* Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro* - and *in vivo* -produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129–1141, 2014.

SUDANO, M.J. *et al.* Cryopreservation of Bovine Embryos. In: MARCELO MARCONDES SENEDA, KATIA CRISTINA SILVA-SANTOS E LUCIANA SIMÕES RAFAGNIN MARINHO. **Biotechnology of Animal Reproduction**, 1ª edição. 1ed. Nova York: Nova Science publishers, 2016, v.1, p. 1-33.

TAKEDA, K. *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, n. 8, p. 3801-3804, 1997.

TESFAYE, D. *et al.* A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 396 - 404, 2004.

TRAPNELL, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc.**, v. 7, n. 3, p. 562–578, 2012.

VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–364, 2000.

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

VOGEL, T.P.; MILNER, J.D.; COOPER, M.A. The ying and yang of STAT3 in human disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 35, n. 7, p. 615-623, 2015.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 583-592, 2004.

ZERON, Y., *et al.* The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v. 45, p. 143-152, 2002.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho forneceu uma análise abrangente do perfil transcricional da criotolerância de embriões bovinos e elucidou o envolvimento de um grande número de moléculas e processos biológicos nobres associados a retomada do desenvolvimento após a criopreservação. Ainda, os resultados encontrados demonstraram que embriões com alta e baixa criotolerância apresentam diferentes perfis transcricionais.

Conforme a análise de enriquecimento do IPA as funções biológicas sobrevivência do organismo, movimento celular, sobrevivência e morte celular, proliferação e crescimento celular parecem ser cruciais para a retomada do desenvolvimento embrionário após a criopreservação.

Adicionalmente, foram identificados GDEs com papéis conhecidos, bem como, genes cujo as funções ainda precisam ser esclarecidas dentro do contexto estudado. Neste sentido, os genes relacionados ao estresse térmico (*HSPA5*, *HSPB8*), diferenciação (*KRT6A*, *KRT7*), pluripotência (*NANOG*), implantação (*VEGFA*) podem estar associados a capacidade de sobrevivência após a criopreservação. Assim, os dados gerados neste estudo poderão servir de suporte para experimentos futuros no âmbito da criopreservação embrionária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002.

AKSU, D. A. *et al.* Gene expression profiles of vitrified *in vitro* and *in vivo*-derived bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, p. 1–13, 2012.

ALIKANI M, *et al.* Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility and Sterility**, v. 71, p. 836–842, 1999.

ALVES, D. F. *et al.* Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 279–286, 2003.

ARIAS-ALVAREZ, M. *et al.* Effect of leptin supplementation during *in vitro* oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 887–896, 2011.

ARIAS-ALVAREZ, M. E.; ROSS, P. J.; FELMER, R. N. *Culture medium composition affects the gene expression pattern and in vitro development potential of bovine somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos*, **Biological Research**, v. 46, p. 452-462, 2013.

AUER, P. L.; DOERGE, R. W. Statistical Design and Analysis of RNA Sequencing Data. **Genetics**, v. 185, n. 2, p. 405-416, 2010.

AVELINO, K.B. Estimulação e inibição da síntese de glutationa em oócitos bovinos: efeitos sobre a maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BOWMAN, T. A. *et al.* Acyl Coa Synthetase 5 (ACSL5) ablation in mice increases energy expenditure and insulin sensitivity and delays fat absorption. **Molecular Metabolism**, v. 5, p. 210-220, 2016.

CIRAY, H.N. *et al.* Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 358-365, 2006.

CHAMAYOU, S. *et al.* Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. **Cryobiology**, v. 62, n. 2, p. 130–134, 2011.

CHAPELEV, I.; WEI, G.; TANG, Q.; ZHAO, K. Detection of single nucleotide variations in expressed exons of the human genome using RNA-Seq. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 106. 2009.

CORRÊA, G.A., *et al.* 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, p. 132-142, 2007.

CROSIER, A.E. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

CUMMINS, J.M., *et al.* A formula for scoring human embryo growth rates in *in vitro* fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison, with visual estimates of embryo quality. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 3, p. 284–295, 1986.

DEB, G. K., *et al.* 9-cis Retinoic acid inhibits cumulus cell apoptosis during the maturation of bovine *cumulus*-oocyte-complexes1. **Journal of Animal Science**. v, 90, p. 1798-1806, 2012.

DODE, M. A N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.

ESFANDIARI, N., *et al.* Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in pre-implantation mouse embryos. **Fertility and Sterility**, v. 87, p. 1214-1217, 2007.

EL-SAYED, A., *et al.* Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006.

FARIN, P. W., SLENNING, B. D., BRITT, J. H. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Theriogenology**, v. 52, p. 659–670, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de imprensa, notícia: Rebanho bovino alcança a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças. 2016. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&dnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alcanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabeças-producao-leite>. Acesso em 18 de maio 2017.

ISACHENKO, V. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, dna integrity, and fertilization ability. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 4, p. 1167–1173, 2004.

GAD, A. *et al.* Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1–2, p. 76–83, 2012.

GJORRET, J.O *et al.* Cronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1193-1200, 2003.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo: ROCA, p. 261-291, 2008.

GUIMARÃES ALS. Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 84p. Dissertação de Mestrado, 2013.

HANSEN, P.J., et al. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 59-66, 2010.

HAYES, M.J.; MOSS, S.E. Annexins and disease. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 322, p. 1166-1170, 2004.

HELD, G. A; GRINSTEIN G; Y, TU: Relationship between gene expression and observed intensities in DNA microarrays – a modeling study. **Nucleic Acids Research.**, v. 34, p. 1-15, 2006.

HOLM, P. *et al.* High bovine blastocyst development in a system using SOFa Medium supplemented with sodium citrate and Myo-Inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683-700, 1999.

KAUFFMAN, A.; HUBER, W. Microarray data quality control improves the detection of differentially expressed genes. **Genomics**, v. 95, n. 3, p. 138-42, 2010.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, p. 741- 756, 2000.

KLIEM, A. *et al.* Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. **Molecular Reproduction Development**, v. 412, p. 402–412, 1998.

KUIJK, E. W. *et al.* Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. **Bio Med Central**, v. 8, p. 1–8, 2007.

KUSCU, N.; CELIK-OZENCI, C. FOXO1 , FOXO3 , and FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo. **Gene Expression Patterns**, v. 18, p. 16–20, 2015.

KUZMANY, A. *et al.* Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 482–494, 2011.

KUZMANY, A. *et al.* Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, p. 300-308, 2005.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73–80, 2007.

LEESE HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **Bioessays**, v. 24, p. 845–849, 2002.

LEESE HJ, STURMEY RG, BAUMANN CG, MCEVOY TG. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. **Human Reproduction**, v. 22, p. 3047–3050, 2007.

LEME, L. DE OLIVEIRA *et al.* Effect of vitrification using the cryotop method on the gene expression profile of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 724–733, 2016.

LEMMEN JG, AGERHOLM I, ZIEBE S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF-ICSI-fertilized oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 17, p. 385-91, 2008.

LOLICATO, F. *et al.* The Cumulus Cell Layer Protects the Bovine Maturing Oocyte Against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity. **Biology of Reproduction**, v. 92, p. 1-16, 2015.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIE, A.; *et al.* Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Reproductive BioMedicine** v. 1431, p. 1424–1431, 2003.

LONERGAN, P. *et al.* Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**. v. 65, p. 137–152, 2003.

LONERGAN, P., WOODS, A., FAIR, T., CARTER, F., RIZOS, D., WARD, F., QUINN, K., and EVANS, A. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 861–868, 2007.

MAO, C. *et al.* Neuronal transcriptional repressor rest suppresses an *atoh7*-independent program for initiating retinal ganglion cell development. **Developmental Biology**, v. 349, n. 1, p. 90–99, 2011.

MALONE, J.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC Biology**, 2011, **9**:34.

Mc EVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction Domestic Animal**, v. 38, p. 268-275, 2003.

MEZZALIRA, A. Vitrification of bovine PIV embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Archives of Veterinary Science** v. 1, p. 107–111, 2004.

MORATÓ, R. *et al.* Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, n. 2, p. 137–141, 2008.

MUCCI, N. *et al.* Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551–1562, 2006.

NATALE, D. R. *et al.* Review sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display rt-PCR. **Reproduction**, v. 122, p. 687–693, 2001.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 414 - 421, 2010.

OZAWA, M. *et al.* Global gene expression of the inner cell mass and trophectoderm of the bovine blastocyst. **BMC Development Biology**, p. 1–13, 2012.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t, 12c CLA*). **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 293-301, 2007.

PERRY, G. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n. 4, p. 14–26, 2016.

PONTES, J. H., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B. V., ERENO-JUNIOR, J. C., UVO, S., BARREIROS, T. R., OLIVEIRA, J. A., HASLER, J. F., SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690–697, 2009.

PONTES, J. H. F. *et al.* Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *bos taurus*, *bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349–1355, 2010.

RAYON, T. *et al.* Distinct mechanisms regulate CDX2 expression in the blastocyst and in trophoblast stem cells. **Nature**, v. 6, p. 1–10, 2016.

RIZOS, D. *et al.* Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 595, p. 589–595, 2002.

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

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Review article transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular, Reproduction and Developmental**, v. 100, 1990.

SIQUEIRA FILHO. *et al.* Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 585–590, 2011.

SOOM, A. VAN *et al.* Article assessment of mammalian embryo quality : what can we learn from embryo morphology? **Reproductive BioMedicine**, v. 7, n. 6, p. 664–670, 2003.

SOOM, A. VAN, YSEBAERT MT, 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**, v. 47, p. 47-56, 1997.

SOOM, A. VAN, MAHMOUDZADEH AR, CHRISTOPHE A. *et al.* Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freez ability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 169–176, 2001.

STINSHOFF, H. *et al.* Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433–1441, 2011.

SUDANO, M. J. *et al.* Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211–1220, 2011.

_____. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130–130, 2012.

_____. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro* - and *in vivo* -produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129–1141, 2014.

_____. Cryopreservation of Bovine Embryos. In: MARCELO MARCONDES SENEDA, KATIA CRISTINA SILVA-SANTOS E LUCIANA SIMÕES RAFAGNIN MARINHO. **Biotechnology of Animal Reproduction**, 1. ed. Nova York: Nova Science publishers, 2016, v.1, p. 1-33.

VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–364, 2000.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 57-63. 2009.

WEITZMAN, VN, *et al.* Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 658–662, 2010.

WHITTINGHAM, DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125–126, 1971.

WRENZYCKI, C. *et al.* Effects of culture system and protein supplementation on mrna expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**. v. 16, n. 5, p. 893–901, 2001.

WU, G.; SCHÖLER, H. R. Role of oct4 in the early embryo development. **Cell Regeneration**, v. 3, p. 1–10, 2014.