TAMIE GUIBU DE ALMEIDA

**Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões
bovinos de touros de alta e baixa fertilidade**

São Paulo

2018

TAMIE GUIBU DE ALMEIDA

**Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões
bovinos de touros de alta e baixa fertilidade**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila
Assumpção

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3662
FMVZ

Almeida, Tamie Guibu de
Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade. / Tamie Guibu de Almeida. – 2018.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Produções *in vitro* de embriões. 2. Efeito paterno. 3. Cinética embrionária. 4. Expressão gênica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Cinética e desenvolvimento embrionário in vitro de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade", protocolada sob o CEUA nº 7170010816, sob a responsabilidade de **Mayra Elena Ortiz D' Ávila Assumpção e equipe; Tamie Guibu de Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Kinetics and embryo development of in vitro bovine embryos from bulls with high and low fertility", utilizing 1000 Bovines (1000 females), protocol number CEUA 7170010816, under the responsibility of **Mayra Elena Ortiz D' Ávila Assumpção and team; Tamie Guibu de Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2016** a **03/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **24 a 24 meses**

N: **1000**

Linhagem: **Bos taurus**

Peso: **450 a 450 kg**

Resumo: A produção in vitro de embriões (PIVE) é a técnica de eleição para produção de embriões bovinos no Brasil. Mesmo que bem estabelecida, a técnica pode ser ajustada para garantir melhor eficiência do processo. Um dos fatores que pode contribuir para esse fim é a seleção de touros de alta fertilidade para PIVE, que produzem taxas altas de blastocisto. Compreender o que diferencia um touro de alta fertilidade de um de baixa é de extrema relevância para otimizar a biotecnologia. A avaliação da cinética de desenvolvimento embrionário pode ser uma ferramenta para identificar os pontos de divergência entre os embriões provenientes dos touros desses dois grupos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é estabelecer qual o momento do desenvolvimento embrionário em que ocorre a divergência entre touros de alta e baixa fertilidade. Para isto, foram selecionados animais de um banco de dados comercial que diferiram na taxa de desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto/taxa de clivagem) sendo classificados como alta ou baixa fertilidade. Serão produzidos embriões in vitro dos dois grupos para avaliação da taxa de fecundação, velocidade de clivagem, taxa de desenvolvimento embrionário, contagem total e diferencial de células dos blastocistos e taxa de apoptose celular em blastocistos. ?

Local do experimento: Laboratório de Biologia do Espermatozóide

São Paulo, 18 de maio de 2018

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Tamie Guibu de Almeida

Título: Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico com amor aos meus pais,
os seres humanos que têm
meu maior respeito,
admiração e orgulho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, meus exemplos e inspirações. Pessoas que me incentivaram e me apoiaram em todos os caminhos trilhados. Obrigada pelas broncas, pelas conversas, pela aceitação e pelo amor incondicional.

Tenho que agradecer mais de uma vez ao meu namorado e melhor amigo Rodolfo. Obrigada por aguentar meus surtos, me consolar, me divertir, apoiar cada passo com carinho. Obrigada também pela sua contribuição intelectual neste trabalho, além da estatística, me ajudou até o último minuto e garantiu que essa dissertação fosse entregue. Agradeço a família que formamos: eu, você e a Luna, vulgo melhor cachorro do mundo.

Agradeço aos meus irmãos Felipe, Ana e aos meus sobrinhos Pedro e Leo pelo carinho, paciência e compreensão das ausências. Aos meus tios, primos e avôs, ainda que não se encontrem nesse plano, sempre torcem por mim. Agradeço à família do Rodolfo que me adotou e já faz parte da minha própria família.

À minha segunda mamis da faculdade, Profa. Mayra. Não tenho nem como agradecer por aceitar minha bipolaridade, crises, frustrações e ainda por cima me apoiar em todas elas. Obrigada pelos ensinamentos acadêmicos e principalmente, ensinamentos de vida. Espero que não tenha te decepcionado e que este trabalho esteja à altura da sua dedicação como professora.

À minha família da faculdade Amarula, Baranga, Cala, Dedada, Garga, Kathe, Ronaldao, Luf, Moranguete, Tinteressa pelo simples fato de existir e tornar a vida mais divertida.

Aos meus amigos queridos da vida Leehendry, Patricia, Kizumba, Hannah, Lina, Doda, Fet, Gê, Gabi, Ruiva, Joca, Batissaco, Doci, Borbs, Maracuda, Gabriel pois, mesmo que não estejam presentes no dia-a-dia, a amizade nunca muda.

Aos meus migos de lab Adriano, Camila, Febem, Leticia, Luana, Vivian, Thais, por aguentaram crises existências, surtos psicóticos, falta de gasolina, reagentes, RNA, entre outros... Pena que não pudemos compartilhar tantos momentos de desespero/gordices juntos kkkkk.

Aos meus migos da IVB Luiz, Leandro, Joao, Gabi, Erika, Valdete, Valquiria, Bia, Tiago, Reginaldo, Mineirinho, Edgar e Roody. Finalmente eu acabei!!! Em especial, gostaria de agradecer a Mayra, que muito ajudou no desenvolvimento deste trabalho, e a Bruna (Prado obviamente). Amigas queridas e companheiras, obrigada por todo o apoio!

Obrigada à minhas ex chefinhas Andrea e Juliana, sem as quais esse projeto não teria sido possível. Obrigada a equipe IVB que permitiu a realização desse projeto.

Ao professor Marcelo e à Patrícia por auxiliar na etapa de análises do biomark. Patrícia, você salvou vidas kkkk! À professora Marcella por sempre me socorrer nos

momentos de angústias e dúvidas (foram diversos kkkk) e por toda sua colaboração neste trabalho!

Aos professores do departamento, sempre muito dispostos à auxiliar, especialmente a professora Carlinha que me orientou no curricular e na IC, a quem devo muitas lições e aprendizados. Aos funcionários da pós-graduação e do VRA pela disponibilidade e organização.

Finalmente, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal e à Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

ALMEIDA T. G. **Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade.** [Kinetics and embryo development of *in vitro* bovine embryos from bulls with high and low fertility]. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

Os resultados da produção *in vitro* de embriões (PIVE) sofrem variações que podem ser decorrentes do efeito do touro utilizado. Fatores paternos afetam o desenvolvimento embrionário desde as primeiras clivagens até após a ativação do genoma embrionário (AGE). Pouco se sabe sobre os mecanismos que promovem a diferença de fertilidade *in vitro* entre touros, muito menos as consequências no desenvolvimento do embrião. Por tanto, o objetivo do presente trabalho foi identificar o momento em que ocorre divergência entre embriões oriundos de touros com diferença de fertilidade e as causas para tal divergência. Para isto, 10 touros (Alta fertilidade, **AF**, n=5, Baixa fertilidade, **BF** n=5) foram retrospectivamente selecionados a partir de um banco de dados de 3 anos de um laboratório comercial de PIVE, com aproximadamente 140 touros, baseados nas taxas de desenvolvimento embrionário (taxa de blastocistos/taxa de clivagem). Embriões produzidos com o sêmen de cada um dos touros foram avaliados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (não clivados, 2 células, 3-4 células, 6 células, 8 células) às 24, 36, 48, 60, 72 horas pós inseminação (hpi) para estabelecer a cinética de desenvolvimento embrionário. A avaliação da taxa de fecundação foi feita a partir da contagem dos pronúcleos, a taxa de clivagem foi realizada no dia 3 (D3) de cultivo *in vitro*, e as taxas de desenvolvimento embrionário e a taxa de blastocisto (Grau I e Grau II, GI e GII respectivamente) foram avaliadas no dia 7 (D7). Embriões no estágio de 8 células e blastocistos foram coletados de cada touro e manipulação para avaliação da abundância de 96 transcritos. Além disso, blastocistos foram avaliados quanto a contagem total de células e a fragmentação de DNA (TUNEL). Não foram encontradas diferenças em relação à cinética de desenvolvimento nos momentos observados ($p>0,05$), nem na taxa de clivagem (AF=86,7%; BF= 84,9%; $p= 0,25$), entretanto, o grupo de alta fertilidade apresentou maior taxa de fecundação (72%) do grupo de baixa (62%) e também menor taxa de poliespermia (AF=16,2% BF=29,2%). Como esperado, a taxa de blastocisto (AF=29,4%; BF= 16,0%; $p<0,0001$), e a taxa de desenvolvimento embrionário (AF=33,9 % BF= 18,9%; $p<0,0001$) foram maiores no

grupo de alta fertilidade. No estágio de oito células, 30 transcritos foram diferencialmente representados entre os grupos experimentais ($p < 0,10$). Apenas PGK1, PPIA e TFAM tiveram maior representação no grupo de alta fertilidade. Genes relacionados a estresse embrionário (9/27, 33%), proliferação celular (8/27, 30 %), metabolismo lipídico (6/27, 22%), e outras funções celulares (4/27, 15%) foram mais representados no grupo de baixa fertilidade. Blastocistos apresentaram apenas 12 genes diferencialmente representados ($p < 0,10$), sendo apenas ACSL3, ELOV1, IFNT mais representados no grupo de alta fertilidade. Não foram encontradas diferenças entre os grupos na contagem de células totais, fragmentação de DNA ou porcentagem de blastocistos GI ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que mesmo não sendo observados efeitos paternos na cinética embrionária inicial, a fertilidade *in vitro* dos touros influencia a abundância de transcritos no estágio de oito células e blastocisto, sendo desde último, em menor proporção. Um aumento da representação de genes relacionados a estresse oxidativo e apoptose no momento de AGE sugere que o desenvolvimento do embrião é prejudicado no grupo de baixa fertilidade, consequentemente resultando em uma menor taxa de blastocistos.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões. Efeito paterno. Cinética embrionária. Expressão gênica.

ABSTRACT

ALMEIDA T. G. **Kinetics and embryo development of *in vitro* bovine embryos from bulls with high and low fertility**. [Cinética e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade]. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2018.

The use of different sires influences *in vitro* embryo production (IVP) outcome. Paternal effects are observed from the first cleavages until after embryonic genome activation (EGA). Little is known about the mechanisms that promote *in vitro* fertility differences, even less about the consequences on embryo development. Therefore, the objective of the present work was to identify divergence moment between embryos from high and low fertility bulls and identify the causes for this divergency. For that, ten bulls were retrospectively selected in high (HF; n=5) and low (LF; n=5) *in vitro* fertility from a database of approximately 140 bulls used in commercial IVP ranked based on embryo development rate (blastocyst/cleaved rate). IVP embryos from 5 manipulations were classified by their stage of development (2 cell, 3-4 cell, 6 cell, 8 cell), at 24, 36, 48, 60, 72 hpi, to evaluate embryo kinetics. Pronuclei were evaluated 24 hpi, cleavage rate was assessed on day 3 (D3) of *in vitro* culture, development rate and blastocyst rate (Grade I and II) were assessed on day 7 (D7). Abundance of 96 transcripts was analyzed in embryos at 8-cell stage and blastocysts from each bull and each manipulation. Total cell counting, and DNA fragmentation were assessed on blastocysts as well. There was no difference in early embryo kinetics ($p>0.05$), and cleavage rate (HF=86.7%; LF= 84.9%; $p= 0.25$). However, fertilization rate was higher on high fertility group (72%) than low fertility (62%) and polyspermy rate was lower on high fertility compared to low fertility group (HF:16,2% LF:29,2%). As expected, blastocyst rate (HF=29.4%; LF= 16.0%; $p<0.0001$) and development rate (HF=33.9 % LF= 18.9%; $p<0.0001$) were higher in the high fertility group than in the low fertility. At 8 cell stage, 30 transcripts were differentially represented ($p<0.10$) between the two groups. Only PGK1, PPIA and TFAM levels were higher in high fertility group. Stress related genes (9/27, 33%), cell proliferation (8/27, 30 %), lipid metabolism genes (6/27, 22%), and other cellular functions (4/27, 15%) were highly expressed on low fertility embryos. Blastocysts had only 12 differentially represented transcripts ($p<0.10$); only ACSL3, ELOV1 and IFNT were higher in high fertility. Lipid metabolism genes (3/9, 33%) and other cellular functions (6/9, 67%) were higher in low fertility group. Results

demonstrate that although there was no paternal effect on early *in vitro* embryo kinetics, sire *in vitro* fertility influences the content of transcripts at 8-cell stage and at blastocyst stage, but at a lower extent. An increase in apoptotic and oxidative stress genes at EGA stage suggest that embryo development is impaired in LF group causing reduction of blastocyst rate.

Keywords: *In vitro* embryo production. Paternal effect. Embryo kinetics. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxas de clivagem, taxa de blastocistos Grau I e Grau II e de desenvolvimento embrionário entre os grupos de alta e baixa fertilidade	38
Figura 2 - Taxas de fecundação positiva normal (2PN), fecundação positiva com poliespermia (>2PN), e fecundação negativa (1 PN) entre os grupos de alta e baixa fertilidade	39
Figura 3 – Microscopia de epifluorescência de presumíveis zigotos corados com Hoechst (filtro DAPI); A = <i>Poliespermia</i> ; B = <i>Fecundação Negativa</i> ; C = <i>Fecundação Normal</i>	39
Figura 4 -Taxa de presumíveis zigotos clivados às 24, 36, 48, 60 e 72 horas pós inseminação nos grupos de alta e baixa fertilidade.....	40
Figura 5 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos genes diferencialmente expressos no estágio de oito células	43
Figura 6 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos genes diferencialmente expressos no estágio de blastocisto	44
Figura 7 – Microscopia de epifluorescência de embriões; A = <i>Contagem de células totais corados com Hoechst (filtro DAPI)</i> ; B = <i>Controle negativo - Ensaio TUNEL(Filtro FITC)</i> ; C = <i>Células TUNEL positivas (Filtro FITC)</i>	44
Figura 8 - Taxas de células TUNEL – positivas (A), da porcentagem de blastocisto GI (B) e da contagem de células totais 9C)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e erro padrão da média da expressão relativa e valor de P dos genes que apresentaram diferença significativa ($p < 0,10$) entre os grupos de alta e baixa fertilidade no estágio de oito células42

Tabela 2 - Média e erro padrão da média da expressão relativa e valor de P dos genes que apresentaram diferença significativa estatística ($p < 0,10$) entre os grupos de alta e baixa fertilidade no estágio de oito células43

Tabela 3 – Símbolo do gene, código do ensaio TaqMan (Thermofisher®) e nome dos genes usado para a expressão relativa dos transcritos76

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	FERTILIDADE DE TOUROS	18
2.2	FECUNDAÇÃO	19
2.3	INFLUÊNCIA PATERNA NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	22
2.4	CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA	25
2.5	EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA	27
3	HIPÓTESE	30
4	OBJETIVOS	30
5	MATERIAL E MÉTODO	31
5.1	SELEÇÃO DOS TOUROS	31
5.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	32
5.3	OBTENÇÃO DOS OÓCITOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	32
5.4	FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	33
5.5	TAXA DE FECUNDAÇÃO	33
5.6	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	34
5.7	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	34
5.8	AVALIAÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CONTAGEM TOTAL DE BLASTÔMEROS	34
5.9	EXPRESSÃO GÊNICA	35
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6	RESULTADOS	38
6.1	TAXAS DE PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	38
6.2	TAXA DE FECUNDAÇÃO	38
6.3	CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	39
6.4	EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA	41
7	DISCUSSÃO	46
7.1	TAXAS DE PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
7.2	EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA	48
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO 1	76

1 INTRODUÇÃO

Projeções da FAO estimam que o consumo de alimentos crescerá cerca de 70% no mundo até 2050, acompanhando o crescimento populacional estimado em 2 bilhões de pessoas. O consumo também vem crescendo de mudanças dietéticas, sendo que a demanda por proteína será proporcionalmente maior do que a demanda por vegetais (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012).

Nesse contexto destaca-se a pecuária bovina como uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, sendo o rebanho composto de mais de 215 milhões de animais, o maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2015), responsável pela produção de 18% da produção mundial de carne (GUÉNEAU, 2018).

Apesar do inestimável valor nutricional de produtos de origem animal, a pecuária é responsável por impactos ambientais tanto pela emissão de gases de efeito estufa como pela degradação da terra utilizada nas pastagens (HAVLIK et al., 2014). O Brasil já é referência em produção de alimentos devido ao grande território destinado a agricultura, energia de baixo custo e disponibilidade de água. Porém, para produzir alimentos de forma sustentável existe a necessidade de poupar os recursos naturais e investir em melhoria na eficiência dos rebanhos.

A criação de bovinos no Brasil é predominantemente extensiva, demonstrando imenso potencial em incremento produtivo e tecnológico. Para melhorar a eficiência dos sistemas de produção, pode-se investir em nutrição, sanidade animal e reprodução. Esta última reflete tanto o desempenho do rebanho como a lucratividade, mas é influenciada pelos demais fatores do manejo reprodutivo (CROWE; HOSTENS; OPSOMER, 2018). Biotécnicas da reprodução são uma boa ferramenta para aumentar a eficiência reprodutiva em criações tecnificadas.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma dessas técnicas em que o Brasil é pioneiro e responsável pela produção de aproximadamente de 60% dos embriões *in vitro* do mundo (STRINGFELLOW; GIVENS; SOCIETY., 2010). Mediante à PIVE é possível obter blastocistos inteiramente cultivados *in vitro*, desde a maturação de oócitos, seleção espermática, fecundação até o cultivo dos presumíveis zigotos. Os blastocistos viáveis produzidos podem ser transferidos para receptoras ou criopreservados para transporte ou transferências futuras.

Superando o método convencional de produção *in vivo* pela superovulação, a PIVE, no Brasil, já é a biotécnica de eleição para obtenção de embriões bovinos

(SARTORI et al., 2016). Tal fato pode ser atribuído pela possibilidade de produção em larga escala de descendentes geneticamente superiores, aproveitando-se o potencial do macho e da fêmea, permitindo alterar as características genéticas e fenotípicas de um rebanho em apenas uma geração.

Ainda que a técnica comercial seja bem estabelecida, existem limitações que levam a inconstâncias nos resultados. Estima-se que a eficiência global do processo não ultrapasse 10% de embriões viáveis, quando feita a razão entre a taxa de prenhez e o número de oócitos fecundados no início do processo. Dentre as razões para a baixa eficiência, ou a falta de repetibilidade nas produções, destacam-se a baixa qualidade oocitária associada a fatores nutricionais, hormonais e metabólicos da fêmea, maturação oocitária incompleta, condições sub-ótimas de cultivo *in vitro*, qualidade da matéria prima dos meios de produção, qualidade da água e baixa qualidade espermática (PERKEL et al., 2015).

Além da qualidade espermática, efeito individual do touro é reconhecido como um dos fatores que interfere nos resultados de produção (PALMA; SINOWATZ, 2004). Sabe-se que existem touros mais ou menos férteis em relação ao número de blastocistos viáveis produzidos, mas poucos trabalhos objetivam elucidar os mecanismos paternos que provocam as diferenças entre os reprodutores, principalmente quando compara-se com o número expressivo de trabalhos sobre o impacto do gameta feminino na fertilidade (LONERGAN et al., 2001, 2003; LONERGAN, 2011; BARUSELLI et al., 2016).

Os parâmetros tradicionais para a avaliação de qualidade espermática, como morfologia e motilidade, são os mais abundantes na literatura para correlação com a fertilidade (SANCHES et al., 2013; AMANN; WABERSKI, 2014; LUKE et al., 2014; MORALES et al., 2016), mas não permitem a compreensão dos eventos de desenvolvimento do embrião *in vitro* nem em que momento ocorre a divergência quando utilizados touros com alta ou baixa fertilidade.

A comparação do desenvolvimento embrionário, qualidade e expressão gênica de embriões, oriundos da fecundação com espermatozoides de touros com diferente fertilidade *in vitro*, pode auxiliar na compreensão dos eventos que levam à diferenciação entre eles. Além disso, podem ser criados critérios para a seleção dos touros que produzam mais embriões e de maior qualidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERTILIDADE DE TOUROS

A fertilidade do macho foi por muitos anos considerada secundária e até mesmo negligenciada, acreditando-se que seu principal papel era o de contribuir com o genoma haploide, cabendo ao gameta materno, o oócito, todo o controle do desenvolvimento embrionário inicial (BARNES; EYESTONE, 1990). No entanto, hoje se sabe que o sucesso da produção *in vitro* de embriões sofre grande influência da qualidade dos gametas utilizados (LECHNIAK; PERS-KAMCZYC; PAWLAK, 2008; ANIFANDIS et al., 2014).

Atualmente já se tem evidências comprovando que o espermatozoide tem um papel tão importante quanto o oócito, contribuindo, além dos aspectos genéticos, com elementos fundamentais para fecundação e o desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER et al., 2004; BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007; KROPP et al., 2017) e até mesmo influenciando a saúde dos seus descendentes (ISGANAITIS; SUEHIRO; CARDONA, 2017).

A fertilidade é considerada uma das características mais impactantes na eficiência produtiva dos rebanhos e é modulada por diversos fatores como por exemplo nutrição, idade, genética e manejo (THUNDATHIL; DANCE; KASTELIC, 2016; CROWE; HOSTENS; OPSOMER, 2018). Além desses fatores, o processamento do sêmen também pode refletir na fertilidade. A capacidade do espermatozoide de reagir às injúrias provocadas pelos processos de criopreservação e de sexagem, varia entre os indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo (PALMA; SINOWATZ, 2004).

Para avaliação da fertilidade de um touro, o método mais acurado e empregado tem sido a obtenção das taxas de prenhez, ou taxas de não retorno ao cio, após as inseminações artificiais a campo, ainda que seja um método dispendioso e demorado (LARSSON, 2000). Porém, a correlação entre o desempenho de um touro a campo, *in vivo*, e o desempenho na PIVE, *in vitro*, não tem se mostrado constante.

Já foram demonstradas correlações positivas entre a fertilidade a campo (*in vivo*) e a fertilidade *in vitro*, sendo esta, definida por taxa de fecundação, clivagem e blastocisto (ZHANG et al., 1997; DANILENKO et al., 1999; WARD et al., 2001, 2003) e até foi criado um modelo matemático para predição da fertilidade *in vivo* utilizando

esses parâmetros *in vitro* (SUDANO et al., 2011). Porém, correlações negativas com pelo menos um desses parâmetros (PUGLISI; BALDUZZI; GALLI, 2004; VANDAELE et al., 2006; KROPP et al., 2017), bem como nenhuma correlação (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999; ZHANG et al., 1999; ALOMAR et al., 2006; NAIB et al., 2011; HOLDEN et al., 2017; KROPP et al., 2017) também foram reportadas.

Estes estudos estão sujeitos a variações, dependendo de como a fertilidade *in vivo* foi avaliada, o número de animais utilizados, os parâmetros *in vitro* considerados para a correlação e até o próprio tipo de sistema de PIVE utilizado (LARSSON, 2000). Esta não concordância entre resultados *in vivo* e *in vitro* pode ser atribuída aos desafios impostos ao espermatozoide em relação ao ambiente de fecundação, já que o sistema *in vitro* promove um ambiente bem menos seletivo quando comparado ao *in vivo* (VAN SOOM et al., 2007). Provavelmente, as deficiências nas características espermáticas que afetam a performance *in vivo* não são necessariamente condizentes àquelas *in vitro* (BASU et al., 2014).

Em suma, os trabalhos mostram que não é prudente comparar a fertilidade de touros *in vivo* e *in vitro*, e que estas devem ser analisadas separadamente, até que seja comprovado um método passível de repetição.

No que diz respeito a PIVE, um touro de alta fertilidade pode ser considerado aquele que produz taxas de blastocisto viáveis mais altas. No sistema PIVE comercial, quanto maior a quantidade de embriões, que possam ser transferidos ou congelados, menor será o custo de cada embrião no final do processo, uma vez que o custo de produção (material descartável, meios de cultivo, manutenção de incubadoras e mão de obra) é o mesmo independente da fertilidade dos touros.

A variação das taxas de blastocisto como resultado de uso de diferentes touros ou de diferentes ejaculados de um mesmo touro é bastante conhecida (HUNTER; DEMMENT; MILLER, 1987; PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2006; CASTRO et al., 2018b). Os mecanismos envolvidos nessa diferença ainda não estão esclarecidos. Um estudo com enfoque no desenvolvimento embrionário, desde a fecundação até a formação do blastocisto, pode contribuir para pontuar a influência paterna em cada uma das etapas do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2.2 FECUNDAÇÃO

Para que ocorra a fecundação, o espermatozoide precisa realizar uma trajetória pelo trato reprodutivo da fêmea até o oviduto, onde encontra o ócito. Durante este percurso, uma primeira seleção é feita dos espermatozoides móveis ocorrendo mudanças funcionais e estruturais na célula espermática tornando-a apta à fecundação, evento denominado capacitação espermática (GEORGADAKI et al., 2016). A capacitação ocorre quando o espermatozoide entra em contato com fluido uterino contendo moléculas e células que desencadeiam o processo (CHANG; PINCUS, 1951). Já foram identificadas 27 proteínas, tais como a albumina e heparina, importantes para a capacitação espermática, presentes no fluido uterino que tem interações com os espermatozoides (LAMY et al., 2018). Ainda não se sabe a função exata de todas essas proteínas, mas que muitas são secretadas pelas células epiteliais com o objetivo de proporcionar a seleção, manutenção da motilidade, viabilidade e capacitação, modulando as funções espermáticas e habilitando a célula espermática para a fecundação (IKAWA et al., 2010; MAILLO et al., 2016; LAMY et al., 2018; OKABE, 2018).

Quando se trabalha com fecundação *in vitro* os processos naturais de seleção e capacitação estão ausentes, por tanto é necessário mimetizá-los. Para a seleção espermática normalmente se utilizam o gradiente de densidade Percoll® ou o método de *swim-up*, cujos objetivos são remover o diluidor e o crioprotetor, bem como separar as células móveis das imóveis (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995). Já a capacitação pode ser induzida pelos chamados agentes capacitantes. Dentre eles destacam-se substâncias como heparina, glicose, albumina sérica bovina ou bicarbonato de sódio (PARRISH, 2014) que também são encontradas no fluido uterino (OKABE, 2018).

Uma vez capacitada a célula espermática, ocorre a reação acrossomal que culmina com a liberação de enzimas proteolíticas que digerem a zona pelúcida, ocorre a interação e posterior fusão das membranas dos gametas (FLÉCHON, 2016). Posteriormente, ocorre a entrada do espermatozoide no gameta feminino, podendo se destacar o núcleo paterno organelas, moléculas de sinalização e fatores de transcrição (KRAWETZ, 2005).

Umas dessas organelas é o centríolo, de origem exclusivamente paterna, responsável por servir de molde para a reconstituição do centrossoma do zigoto, já que o centrossoma do gameta feminino é degenerado durante a oogênese (SATHANANTHAN, 1998; INOUE; WITTBRODT; GRUSS, 2018). O centrossoma é

fundamental não apenas para a singamia como também para as posteriores divisões celulares (SATHANANTHAN, 2013).

Na sequência, o material genético paterno, até então altamente compactado pelas protaminas, passa por um processo de descondensação, troca das protaminas por histonas e a formação do pronúcleo masculino (XU; GREVE, 1988; SATHANANTHAN, 2013).

Já para formação do pronúcleo feminino é necessário o desbloqueio da meiose do oócito que se encontra na fase de metáfase II. Evidências mostram que a fosfolipase C zeta (PLCZ) liberada pelo espermatozoide desempenha papel central como fator de ativação oocitário (SANDERS; SWANN, 2016). A PLCZ desencadeia uma reação em cascata a partir do influxo de Ca^{+} , permitindo a retomada da meiose, formação do pronúcleo feminino e extrusão do segundo corpúsculo polar (GARDNER; EVANS, 2006; SANDERS; SWANN, 2016).

Simultaneamente ao primeiro contato do espermatozoide com o oócito, o influxo de Ca^{+} desencadeia a despolarização da membrana plasmática, promovendo o mecanismo inicial de bloqueio a entrada de novos espermatozoides (CHEESEMAN et al., 2016; WALE; GARDNER, 2016). Essa despolarização promove dois tipos de mecanismos. Inicialmente, permite a exposição do receptor de ligação oocitário Juno, a qual se ligará IZUMO, molécula presente no espermatozoide (INOUE, 2017) impedindo a ligação de mais de um espermatozoide. Em seguida, induzirá a liberação do conteúdo dos grânulos corticais presentes no oócito (SATHANANTHAN, 2013), contendo enzimas que modificam a zona pelúcida, tornando-a mais rígida ((INOUE, 2017). Na falha da ativação deste mecanismo de bloqueio, ocorre o fenômeno chamado de poliespermia (COY; AVILÉS, 2010; INOUE, 2017).

Um dos problemas comumente relacionados à FIV é a alta incidência de poliespermia variando de 5 - 45% em bovinos (revisado por COY; AVILÉS, 2010). A poliespermia pode ocasionar o desenvolvimento embrionário anormal refletindo-se em baixa taxa de clivagem e blastocisto (ALOMAR et al., 2008; DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015) como também pode levar ao retardo no desenvolvimento embrionário e mortalidade (SUMANTRI et al., 1997).

As possíveis causas apontadas para poliespermia vão desde de baixa qualidade oocitária (WANG; DAY; WU, 2003), alta concentração espermática na dose inseminante (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015) ou dos agentes capacitantes (LU;

SEIDEL, 2004), o tempo de incubação (SUMANTRI et al., 1997; IWATA et al., 2008) e até mesmo efeito individual do touro (ALOMAR et al., 2008).

Essa variação individual do touro se reflete também nas taxas de fecundação. (WARD et al., 2001; PUGLISI; BALDUZZI; GALLI, 2004; ALOMAR et al., 2006, 2008)) consequentemente nas taxas de blastocisto (ALOMAR et al., 2006, 2008)). A falha na fecundação, da mesma forma que a poliespermia, pode estar relacionada à concentração dos agentes capacitantes. Na ausência da concentração mínima adequada, a capacitação pode não ocorrer impedindo a fecundação (LU; SEIDEL, 2004). O mesmo ocorre quando há deficiência ou disfunção das proteínas espermáticas e seminais relacionadas à capacitação (HARAYAMA et al., 2017).

Outro motivo para falha na fecundação é o próprio ambiente, ou meio, em que se realiza a FIV. Esse ambiente já é reconhecido por ser propício à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MARTÍN-ROMERO et al., 2008; LEITE et al., 2017) que em excesso pode gerar dano na membrana espermática levando a incapacidade funcional de adesão ao oócito (AITKEN et al., 1998; AITKEN; KRAUSZ, 2001; CASSINA et al., 2015). A susceptibilidade do sêmen ao estresse oxidativo é variável entre indivíduos e pode influenciar nos resultados da PIVE (SIMÕES et al., 2013; SIQUEIRA, 2016).

Apesar de reconhecidos os problemas no momento da fecundação, touros com as mesmas taxas de fecundação obtiveram diferentes taxas de produção de blastocisto (P. COMIZZOLI, B. MARQUANT-LE GUIENNE, Y. HEYMAN, 2000; PALMA; SINOWATZ, 2004)). Isto comprova que o efeito paterno não está apenas presente no momento da fecundação, mas pode interferir também no desenvolvimento embrionário subsequente.

2.3 INFLUÊNCIA PATERNA NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Por muitos anos ficou restrito ao oócito toda a capacidade de controlar as clivagens e o desenvolvimento embrionário inicial. Um grande fato que impulsionou a investigação para o papel masculino na fecundação foi a identificação de um RNA mensageiro (mRNA) transferido para o oócito pelo espermatozoide (OSTERMEIER et al., 2004).

Essa contribuição paterna abriu portas para pesquisas que identificaram diversos fatores e moléculas com potencial para funções na espermatogênese,

fertilidade, desenvolvimento embrionário, e até capazes de regular a transcrição de genes (GOVINDARAJU et al., 2012). Não apenas as moléculas entregues ao oócito, mas também as informações epigenéticas que o espermatozoide carrega já foram relacionadas com diferença de fertilidade, refletindo-se diretamente no desenvolvimento embrionário (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

O desenvolvimento embrionário pré-implantacional pode ser dividido em duas fases: inicial e tardia. Na fase inicial, os embriões realizam baixa transcrição, suprindo-se basicamente do estoque de proteínas e transcritos maternos, acumulados no oócito durante a foliculogênese e embriogênese (GRAF et al., 2014; A; A, 2015). A fase tardia ocorre após a chamada ativação de genoma embrionário (AGE), que se caracteriza como o momento de substituição da utilização dos transcritos maternos para utilização de transcritos e proteínas produzidos pelo próprio embrião. Em bovinos a AGE ocorre no estágio de 8 a 16 blastômeros, sendo relatada uma menor ativação no período de zigoto a 4 células (MEMILI; DOMINKO; FIRST, 1998; MEMILI; FIRST, 2000; GRAF et al., 2014; JIANG et al., 2014).

Os efeitos paternos já foram relatados tanto na fase inicial quanto na tardia. Em humanos, tais efeitos são bastante atribuídos à fragmentação de DNA espermático, que é apontada como uma das responsáveis por falhas nas técnicas de reprodução assistida como ICSI e PIVE (SIMON et al., 2014; WDOWIAK; BAKALCZUK; BAKALCZUK, 2015; SIMON; EMERY; CARRELL, 2017a, 2017b). Sugere-se que o estresse oxidativo e a apoptose são as causas mais comuns de fragmentação (LEWIS; AITKEN, 2005; SIMON; EMERY; CARRELL, 2017b). O efeito negativo dos danos espermáticos foram observados na fecundação (AITKEN et al., 1998), clivagens iniciais (LEWIS; AITKEN, 2005), taxa de blastocisto, taxa de fecundação, taxa de implantação (AITKEN et al., 2016) e até sugere-se que o estresse oxidativo espermático possa estar correlacionado a certos distúrbios metabólicos dos descendentes gerados (PALMER et al., 2012; LANE et al., 2014).

Em bovinos, a fragmentação espermática também foi observada em amostras submetidas à irradiação ou ao estresse oxidativo. A irradiação do sêmen resultou em taxas de fecundação e de clivagens normais, mas com bloqueio embrionário após o terceiro ciclo celular e apoptose em embriões (FATEHI et al., 2006). Já Castro et al. (2016), induziram o estresse oxidativo espermático com diferentes doses de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo observada queda na taxa de clivagem e de blastocisto inversamente proporcional à dose utilizada. Essa relação também foi observada em

amostras de sêmen classificadas com diferenças na susceptibilidade ao estresse oxidativo, entretanto sem apresentar diferença na taxa de blastocisto (SIMÕES et al., 2013).

Apesar dos efeitos adversos devido ao dano ao DNA espermático, especula-se que a compactação do DNA bovino seja mais eficiente quando comparado à dos humanos, o que o torna menos suscetível às injúrias (CASTRO et al., 2018). Apesar disso, amostras de sêmen de bovinos que não demonstraram diferenças na integridade de DNA, apresentaram resultados extremos de fertilidade *in vitro* (CASTRO et al., 2018). Em vista disso, outros atributos espermáticos ou fatores entregues pelo espermatozoide podem estar envolvidos para gerar diferenças no desenvolvimento embrionário. Tais diferenças poderiam ser identificadas ao se delinear um experimento focado na cinética embrionária.

Os efeitos paternos precoces podem também repercutir no desenvolvimento embrionário tardio. No que concerne o primeiro ciclo celular, já foi comprovado o efeito do touro na fase mitótica de replicação, a fase S. (EID; LORTON; PARRISH, 1994; P. COMIZZOLI, B. MARQUANT-LE GUIENNE, Y. HEYMAN, 2000). A avaliação do início precoce na fase S *in vitro* teve correlação positiva com touros de alta fertilidade *in vivo* (EID; LORTON; PARRISH, 1994) e *in vitro* (COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000).

Neste último trabalho, Comizzoli et al., (2000). demonstraram que os touros que tiveram o melhor desempenho *in vitro* produziram maior porcentagem de zigotos entrando precocemente em replicação celular. Ou seja, a fase G1 começou antes, e a fase S, apesar de mais precoce, foi mais duradoura em touros que tiveram maiores taxas de blastocisto, o que também foi correlacionado com o tempo menor de conclusão do primeiro ciclo celular.

Em concordância com esses resultados, foi observada diferença na velocidade de clivagem em zigotos provenientes de touros com diferença de fertilidade, sendo as maiores taxas de blastocisto pertencentes a touros que produziram zigotos clivando mais precocemente (WARD et al., 2001), o que condiz com dados reportados na reprodução humana (FENWICK, 2002; TESARIK; MENDOZA; GRECO, 2002).

Estudos sugerem que os embriões que completam os primeiros ciclos celulares mais rápido são os que apresentam o maior potencial de desenvolvimento em bovinos (VAN SOOM et al., 1992; WARD et al., 2001; ALOMAR et al., 2008; OROZCO-LUCERO et al., 2014; YOUNG et al., 2017), humanos (FU et al., 2009; LEE et al.,

2012, 2016), felinos (NI, 2017). Sendo assim, a cinética embrionária, especialmente a primeira clivagem, poderia auxiliar a diferenciar touros com alta e baixa fertilidade *in vitro*.

2.4 CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

A seleção dos embriões para transferência é realizada na maioria dos laboratórios pela classificação de morfologia embrionária com base nos critérios estabelecidos pela International Embryo Transfer Society (IETS). Em bovinos, a taxa de prenhez associada a esse tipo de seleção varia entre 30 – 60%, dependendo do grau de qualidade do embrião (FARIN; SLENNING; BRITT, 1999). Logo, é uma metodologia de análise muito subjetiva, sendo que mesmo entre avaliadores experientes, apresenta uma imensa taxa de variação na classificação entre os graus estabelecidos (ROCHA et al., 2017a, 2017b). Esses resultados são esperados vez que a morfologia não necessariamente reflete o status gênico do embrião, (AMARNATH et al., 2007), o nível de desenvolvimento e composição celular, (LEIDENFROST et al., 2011) sendo até relatada maior taxa de aneuploidia em embriões com melhor morfologia (PERKEL et al., 2015).

Outras metodologias, invasivas ou não, como avaliação de apoptose celular, contagem total e diferencial de células, presença e metabólitos no meio de cultivo, cariotipagem têm sido utilizadas para tentar estabelecer um padrão de qualidade embrionária (VAN SOOM et al., 2003; PERKEL et al., 2015; SANCHEZ et al., 2017). Porém, muitas técnicas têm finalidade apenas acadêmica, sem possibilidade de aplicação em laboratórios comerciais porque aumentariam o custo de produção, a logística do processo ou inviabilizam a transferência do embrião.

A cinética de desenvolvimento embrionário pode ser uma ferramenta de fácil aplicação para aumentar a acurácia na seleção. Essa análise já é utilizada como marcador não invasivo para humanos. Sistemas de incubadoras com *time-lapse* têm sido utilizadas em algumas clínicas para registrar o desenvolvimento embrionário, sem tirar o embrião do ambiente controlado, e fazer a melhor seleção com base nos parâmetros morfo-cinéticos (GARDNER; KELLEY, 2018). A maioria desses sistemas funciona com uma câmera programada para fazer um registro fotográfico dos embriões em cultivo em intervalos de horários pré-determinados, permitindo avaliar precisamente cada etapa do desenvolvimento embrionário.

Mesmo sem uma câmera de *time-lapse*, observações em determinados momentos podem auxiliar a classificar os embriões de acordo com a velocidade de clivagem e morfologia, permitindo a criação de parâmetros e modelos capazes de correlacionar a velocidade dos primeiros ciclos celulares com taxa de implantação e prenhez (BOS-MIKICH; MATTOS; FERRARI, 2001; LUNDIN; BERGH; HARDARSON, 2001; FU et al., 2009; BANG et al., 2013; MILEWSKI et al., 2016).

Em bovinos, a avaliação não invasiva pelo *time-lapse* já obteve resultados positivos no aumento da taxa de prenhez (SUGIMURA et al., 2012), mas ainda sem conseguir atingir escala comercial. Foi observado que blastocistos oriundos de clivagens iniciais rápidas tinham taxa de apoptose celular inferior aos de clivagens lentas (VANDAELE et al., 2006). Em contrapartida, maior taxa de bloqueio embrionário (GARCIA et al., 2015), maior número de anormalidades cromossômicas (PERS-KAMCZYC et al., 2012), padrões de expressão gênica irregulares (LONERGAN et al., 2000; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004; RIPAMONTE et al., 2012; OROZCO-LUCERO et al., 2014), foram observados em embriões com clivagens tardias.

Entretanto, estudos mais recentes relatam que embriões que clivam mais rápido não necessariamente são os melhores para transferência (A; C; B, 2015; CARROCERA et al., 2016; MILAZZOTTO et al., 2016). Os aspectos negativos das clivagens rápidas podem estar ligados, por exemplo, à perda de *imprinting* genômico (VELKER; DENOMME; MANN, 2012). Lonergan et al. (1999) não encontraram diferenças nas taxas de gestação entre embriões bovinos com diferentes velocidades de clivagem assim como já foi relatado, em humanos, a incapacidade de predição de taxa de gestação com um modelo de seleção baseada em *time-lapse* (KIRKEGAARD et al., 2013). Uma das causas apontadas para falhas nos modelos é a falta de um algoritmo que leve em consideração o fator espermatozoide (NEYER et al., 2015).

Por esse motivo, estabelecer correlações entre a cinética e outras metodologias de qualidade embrionária podem auxiliar na criação de padrões para bovinos e permitir uma seleção embrionária mais acurada. A expressão gênica é uma ferramenta que permite complementar a avaliação da cinética e morfologia de forma mais objetiva. As informações obtidas poderão remeter não só a qualidade embrionária, como também à compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento e permitir a comparação entre a fertilidade dos touros utilizados.

2.5 EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

O desenvolvimento inicial do embrião é extremamente dinâmico e repleto de transformações morfológicas e moleculares. Destacam-se a transição materno-fetal, a ativação do genoma embrionário, a compactação e a diferenciação celular como momentos cruciais em que a expressão de genes específicos é necessária para garantir um desenvolvimento embrionário adequado (BÓ et al., 2005; BADR et al., 2007). Um padrão de expressão irregular pode levar à interrupção do desenvolvimento embrionário, anormalidades placentárias e fetais (NIEMANN; WRENZYCKI, 2000; URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

A análise da expressão gênica dos embriões, seja pontual por PCR de genes específicos ou global pela avaliação do transcriptoma embrionário tem sido amplamente utilizada para compreender os eventos do desenvolvimento e também para encontrar possíveis marcadores de qualidade e competência embrionária (WRENZYCKI; HERRMANN; NIEMANN, 2007; AMIN et al., 2014; OROZCO-LUCERO; SIRARD, 2014; HUE, 2016).

El Sayed et al. (2006) e Salilew-Wondim et al. (2010) compararam a expressão gênica de embriões que concluíram a gestação produzindo bezerros àquelas que não geraram prenhez ou resultaram em perda gestacional. Os autores identificaram diferenças na expressão de genes nos blastocistos com funções em vias de biossíntese proteica, metabolismo, transcrição, expressão gênica, apoptose e comunicação celular (EL-SAYED et al., 2006b; SALILEW-WONDIM et al., 2010b). Ghanem et al. (2011) demonstraram que os mesmos genes diferencialmente representados nos embriões *in vitro* que proporcionaram nascimento de bezerros, descritos por El-Sayed et al. (2006b), foram similares aos embriões *in vivo* que resultaram nascimento de bezerros.

Isso demonstra que, independente da origem do embrião, o padrão de expressão gênica daqueles capazes de manter a gestação é semelhante. Além disto, apesar dos embriões produzidos *in vitro* apresentarem diferenças na expressão gênica (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004) e no metabolismo (MILAZZOTTO et al., 2016) com relação aos produzidos *in vivo*, podem ser utilizados como referência para a otimização dos sistemas de produção.

Tais vias também foram encontradas em um estudo comparativo de embriões oriundos da fecundação com touros de alta ou baixa taxas concepção à campo, em

que não houve nenhuma diferença na produção e na morfologia dos embriões com (sete) dias de cultivo. O transcriptoma dos blastocistos demonstrou que os embriões provenientes de touros de alta fertilidade *in vivo* tinham alta expressão de genes relacionado ao metabolismo, enquanto os de baixa fertilidade, apresentaram alta expressão de genes relacionados à regulação de ciclo celular, ao estresse embrionário e à apoptose (KROPP et al., 2017).

As vias de apoptose são bastante investigadas em vários estágios do desenvolvimento embrionário (BADR et al., 2007; MELKA et al., 2010; RIPAMONTE et al., 2012; GARCIA et al., 2015) por ser considerada uma das principais causas de interrupção do desenvolvimento (ANTUNES et al., 2010). Apesar da função fisiológica da apoptose, que permite eliminar células defeituosas poupando os recursos para que as células normais possam desenvolver-se adequadamente (ZAKERP et al., 2015), acredita-se que o descontrole dos seus mecanismos possa levar a letalidade embrionária (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001; ANTUNES et al., 2010).

Um evento envolvendo a apoptose comumente relatado em embriões bovinos é o bloqueio embrionário que ocorre no estágio de 8 células (MEIRELLES et al., 2004) (MEMILI; FIRST, 2000; RIPAMONTE et al., 2012; GARCIA et al., 2015), coincidindo justamente com o momento de maior ativação do genoma embrionário.

A ativação do genoma embrionário é o período de maior expressão gênica na fase pré-implantacional, precedendo de uma menor ativação, cujo objetivo parece ser de preparar o embrião para a transição materno fetal (GRAF et al., 2014; JIANG et al., 2014). É atribuído à maior ativação do genoma, a degradação dos transcritos e proteínas maternas, e início de uma produção de transcritos própria do embrião, por esse motivo, as funções dos genes expressos são majoritariamente de transcrição, degradação proteica, tradução inicial e processo metabólico de RNA (GRAF et al., 2014)

Essa etapa de transição é extremamente crítica e fundamental para o sucesso do desenvolvimento, pois a maquinaria transcripcional do embrião deve ser preparada para suportar a replicação e a diferenciação celular posteriores. Especula-se que o bloqueio embrionário ocorre pela incapacidade de ativar adequadamente genes envolvidos nessas funções (BETTS; KING, 2001).

A expressão diferencial no momento da AGE entre embriões com clivagens lentas ou rápidas mostrou que para embriões com rápida clivagem, genes relacionados ao desenvolvimento embrionário foram ativados, enquanto nos lentos

foram ativados genes de sobrevivência ou de morte celular resultando em menor taxa de blastocisto (RIPAMONTE et al., 2012).

Condições inadequadas para o desenvolvimento embrionário resultam em alterações em expressão gênica que não necessariamente se refletem na morfologia embrionária. A importância do oócito e do meio de cultivo são fundamentais, entretanto, o efeito paterno tem se mostrado relevante para a produção de embriões de qualidade, com maior potencial de gerar prenhez (KROPP et al., 2017).

Um comparativo entre os embriões produzidos com touros de diferentes fertilidades *in vitro* pode ser feito com a análise de genes envolvidos em importantes funções biológicas, tanto no momento de AGE quanto nos blastocistos. O momento de AGE é importante para verificar se o padrão de expressão está adequado para posterior desenvolvimento, e os blastocistos para determinar a qualidade do embrião produzido.

3 HIPÓTESE

Touros de alta e baixa fertilidade *in vitro* produzem embriões que diferem na cinética das primeiras clivagens, evidenciado por diferenças na expressão gênica de embriões, contagem de células totais e fragmentação de DNA nos blastocistos.

4 OBJETIVOS

Principal

Identificar durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* o momento e as causas de divergência entre os embriões produzidos com sêmen de touros de alta e baixa fertilidade.

Específicos

Este estudo teve como objetivos específicos, produzir embriões de touros de alta e baixa fertilidade *in vitro* e:

- 1- Avaliar a taxa de fecundação *in vitro*;
- 2- Avaliar cinética de desenvolvimento embrionário inicial, identificando o estágio embrionário que ocorre o bloqueio embrionário;
- 3- Avaliar taxa de fragmentação de DNA e número total de blastômeros;
- 4- Identificar as vias gênicas diferencialmente expressas entre embriões de 8 células e os blastocistos.

5 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Protocolo n° 7170010816). Esse projeto foi realizado em colaboração com a empresa In Vitro Brasil (Mogi Mirim, SP, Brasil).

5.1 SELEÇÃO DOS TOUROS

Para seleção dos touros utilizados no experimento, foi realizado um estudo retrospectivo a partir do banco de dados dos anos 2012 a 2015 de produção *in vitro* de embriões gentilmente concedidos pela empresa In Vitro Brasil. (IVB, Mogi Mirim, Brasil). Durante esse período, a empresa realizou mais de 5000 manipulações comerciais de produção *in vitro* de embriões, com 500 touros de diferentes partidas, raças e centrais de reprodução, sendo 85% das palhetas utilizadas de sêmen sexado. Devido ao volume de doses sexadas, e para padronizar o estudo da cinética do desenvolvimento embrionário, bem como as análises de expressão gênica, apenas manipulações utilizando palhetas de sêmen sexado de fêmea foram incluídas no experimento. Em seguida, apenas touros que foram utilizados em mais de 5 manipulações, com mais de 50 oócitos por manipulação foram selecionados resultando em 140 touros.

Destes 140 animais foram considerados os seguintes parâmetros:

- Taxa de clivagem: razão entre total de presumíveis embriões apresentando pelo menos 4 células sobre o total de estruturas cultivadas, avaliada às 72 horas pós-inseminação (hpi) equivalente ao 3° dia de cultivo *in vitro* (D3).

- Taxa de blastocisto: total de blastocistos GI ou GII segundo o manual IETS (2010) sobre o total de estruturas cultivadas avaliada às 148 hpi equivalente ao 7° dia de cultivo *in vitro* (D7).

Os touros foram, então, ranqueados baseados na taxa de desenvolvimento embrionário (total de blastocistos GI e GII sobre o total de clivados em D3) sendo selecionados 5 touros de extremo superior (Alta fertilidade) e 5 inferior (Baixa Fertilidade).

5.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A etapa de produção *in vitro* de embriões foi inteiramente executada no laboratório da empresa In Vitro Brasil. Exceto quando mencionado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

5.3 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS E MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Ovários de vacas *Bos taurus indicus* destinadas ao abatedouro comercial foram coletados, armazenados em solução salina a 25-30°C e transportados até o laboratório 25 minutos após o abate. No laboratório, os ovários tiveram os folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro aspirados utilizando uma agulha 19G (Becton Dickinson, Curitiba, PR, Brasil) conectada a uma seringa de 20 mL. Complexo cumulus oophorus (CCOs) foram selecionados em um estereomicroscópio com magnificação de 80X utilizando os critérios de compactação das camadas de células do cumulus e homogeneidade do citoplasma. Apenas oócitos com pelo menos uma camada de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo foram selecionados. Os CCOs que atendiam ao critério de seleção foram lavados três vezes em meio TCM-199 HEPES suplementado com 10% de SFB, 0,20mM de piruvato de sódio e 83,4mg/mL de amicanina (Instituto Bioquímico, Rio de Janeiro, Brasil).

Após a lavagem, os oócitos foram maturados durante 24 horas em criotubos de poliestireno (BD Falcon) de 5 mL não lacrados contendo 50 CCOs em 400 µL de TCM-199 (Gibco Life Technologies). Esse meio foi suplementado com 10% de SFB (GibcoLife Technologies), 1 mg/mL de hormônio folículo estimulante, FSH, (Folltropin, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 50 mg/mL de gonadotrofina coriônica humana, hCG (Profasi, Serono, São Paulo-SP, Brasil), 1 mg/mL estradiol (estradiol-17β), 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4 mg/mL amicacina (Instituto Bioquímico, Rio de Janeiro, Brasil) recobertos de óleo mineral (D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brazil). A atmosfera foi controlada em 5% de CO₂ a 38,5-39° C. Foram necessárias oito coletas resultando um total de 550 CCOs por touro.

5.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Após a MIV, os oócitos foram lavados em meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato, 83,4g/mL de amicacina e 10mM de Hepes e colocados em gotas (25-30 oócitos por gota) de 50 µL de meio FIV-TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato, 83,4g/mL de amicacina e 10mM de Hepes, 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina.

A FIV foi realizada com sêmen sexado de fêmea dos touros do grupo de alta (n=5) e baixa fertilidade (n=5). Para cada repetição, foi utilizado um número equivalente de touros de alta e baixa fertilidade, sendo que nas 3 últimas repetições todos os touros foram utilizados simultaneamente. O sêmen foi descongelado a 39°C por 30 segundos e foi realizada a pré-seleção espermática com gradiente de Percoll® (22,5%; 78,75%) e centrifugação a 6.600 G por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, deixando aproximadamente 100 µl do sedimento. Esse volume foi ressuspendido com FIV-TALP e submetido a nova centrifugação de 1.100 G por 3 minutos, 100 µl foi recuperado do sedimento contendo as células móveis e as gotas, contendo os oócitos maturados, inseminadas com 10 µL. O período de co-incubação foi de 24 horas em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade de 90%.

5.5 TAXA DE FECUNDAÇÃO

Após 24 horas de co-incubação de espermatozoides e oócitos, 10% dos presumíveis zigotos de cada touro foram fixados em paraformaldeído 4% após a remoção mecânica das células do cumulus com sucessivas pipetagens. Para avaliação da taxa de fecundação, os oócitos foram lavados quatro vezes em DPBS com 1% de PVP e corados com 10µg/ml de Hoechst 33342, sendo os pronúcleos avaliados no microscópio de epifluorescência (Olympus IX80, Olympus Corporation). Foram realizadas três classificações: fecundação normal (2 pronúcleos), fecundação negativa (1 pronúcleo), poliespermia (mais de 2 pronúcleos).

5.6 CULTIVO *IN VITRO*

O restante dos presumíveis zigotos foi lavado em meio TALP para remoção das células do cumulus e colocados em 100 μ L SOF (Wells et al., 1999) suplementado com 2,5% de SFB 0,5% de albumina sérica bovina (BSA). No dia D3 e D5 de cultivo, ou 72 hpi e 120 hpi, respectivamente, 50% do volume do meio foi substituído pelo meio SOF. A taxa de blastocistos foi calculada no D7 como sendo a razão entre os blastocistos GI e GII (IETS, 2010) sobre o número de estruturas cultivadas. Foram descontadas do denominador os embriões retirados para análise de expressão gênica.

5.7 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A contagem de clivagem foi realizada nos momentos 24, 36, 48, 60, 72, 96 hpi. Os zigotos foram classificados de acordo com o número de blastômeros em não clivados (NC), 2 células (2C), 4 células (4C), 6 células (6C), 8 células (8C) maior ou igual a 16 células. Para a contagem, a placa de CIV foi retirada da incubadora e a contagem feita em estereomicroscópio em 80X de magnificação.

5.8 AVALIAÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA E CONTAGEM TOTAL DE BLASTÔMEROS

Após a avaliação dos blastocistos em D7, blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) GI e GII foram fixados em paraformaldeído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente para posterior avaliação pelo ensaio TUNEL (Kit Click-It® Plus TUNEL Assay– Alexa Fluor™ 488, Thermo Fisher Scientific) e contagem total de células.

Para o realizar o ensaio, os embriões foram permeabilizados durante 30 minutos em solução de permeabilização (Triton -X 0,5% em DPBS com 1% de PVP) a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o controle positivo com a incubação de embriões com enzima DNase (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay Protocol) durante meia hora a temperatura ambiente. Todos os embriões foram lavados com água deionizada e prosseguiram para a reação de TUNEL contendo dUTP e a enzima dexosinucleotidiltransferase durante uma hora a 37°C, segundo as

instruções do fabricante (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Assay Protocol, Thermo Fisher). Após esse período, os embriões foram incubados no escuro durante mais meia hora com a fluoresceína Alexa Fluor 488™. Por fim, os embriões foram lavados novamente e corados com Hoechst 33342 (5µg/mL) por mais 15 minutos e colocados em uma lâmina com lamínula. A avaliação foi feita em microscópio de epifluorescência (IX80, Tóquio, Japão) sendo as células embrionárias com fragmentação de DNA coradas em verde (Filtro FITC) e os núcleos celulares totais em azul (Filtro DAPI).

5.9 EXPRESSÃO GÊNICA

Para extração de RNA total foram coletados 5 embriões de 8 células no D3 e 5 blastocistos expandidos no D7 de cada touro, resultando um total de 5 réplicas por touro para cada tipo de amostra (8 células ou blastocisto). Totalizando 25 réplicas biológicas de cada estágio, 8 ou blastocisto, para cada um dos grupos, alta e baixa fertilidade.

Após a lavagem em DPBS com 1% de PVP os embriões foram colocados em criotubos de 2 mL () contendo 10µL de RNA Extraction Buffer® do kit de extração de RNA total PicoPure® (ThermoFisher, Massachusetts, EUA). Esse tubo foi incubado a temperatura de 42°C por 30 minutos e em seguida estocado em nitrogênio líquido.

No laboratório de Biologia do Espermatozoide, Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, a extração de RNA progrediu conforme o manual do kit de extração de RNA total PicoPure® resultando em 11 µL de RNA eluído. Desse volume, 1 µL foi utilizado para quantificação no espectrofotômetro NanoDrop® (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) sendo a pureza (280/260) considerada adequada na faixa entre 1,9 e 2,1.

Para síntese de DNA complementar (cDNA), foi utilizada reação com transcriptase reversa a partir do RNA isolado utilizando o kit Script® VILO™ cDNA synthesis (Life Technologies, Califórnia, EUA). Por fim, foi feita a quantificação em Qubit® 2.0 fluorometer (Qubit® dsDNA BR) e o cDNA preservado a -20°C até posterior análise.

As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando o Sistema HD Biomark (Fluidigm) no Laboratório de Fitomedicamento Farmacologia e Biotecnologia do departamento de Farmácia, do Instituto de Biociência da Universidade Estadual

Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo. Foram utilizados ensaios Biosystems™ TaqMan® (ThermoFisher, Massachusetts, EUA) específicos para *Bos taurus*. A abundância de mRNA de 96 genes (Anexo 1) foi analisada, sendo os genes escolhidos com bases nas suas funções. As amostras foram submetidas inicialmente a uma sequência de pré-amplificações. Foram adicionados 1,25 µL do mix Taqman® Assay e 2,5 µL TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, #4391128) a 1,25 µL do previamente sintetizado cDNA (5ng/µL). O ciclo de ativação das reações foi realizado a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 14 ciclos de 60°C por 4 minutos para anelamento amplificação.

Para a análise da expressão gênica propriamente dita, foi utilizado o chip 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) para 96 amostras e 96 genes (Anexo 1). Foi preparada uma solução para leitura com 2,25µL de cDNA pré-amplificado de cada amostra, 2,5 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, EUA) e 0.25 µL 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm, California, EUA). A solução do ensaio também foi preparada com 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, California, EUA) e 2,5 µL de 2X Assay Loading Reagent (Fluidigm, California EUA) para cada gene. Foram pipetados no chip 5 µL da solução de leitura de cada gene e da solução de cada amostra. O ciclo de qPCR foi feito pelo equipamento Biomark HD System (Fluidigm, California, USA) no setup TaqMan GE 96x96 Standard. Esse programa consiste em quatro estágios: *Thermal Mix* (50°C/2 min, 70°C /20 min e 25°C/10 min), *Hot Start* (50°C/2 min e 95°C/10 min), desnaturação (40 ciclos de 95°C/15 s) e anelamento de primers e extensão (60°C/60 s). Os valores de Ct bruto dos 96 transcritos foram normalizados pela média geométrica dos endógenos ACTB, HMBS, PPIA para 8 células e ACTB, HMBS, GAPDH para blastocisto.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados com 5 repetições. Um total de 10 touros foram homogeneamente distribuídas em dois grupos (cinco para alto e cinco a baixo desempenho na PIVE). Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS, *Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC*) através do pacote Enterprise Guide (v 7.1).

Todos os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos usando o procedimento *UNIVARIATE* de acordo com o teste de *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade não foi obtida, os dados foram transformados (*Log10; Log natural; Raiz quadrada; Arco seno ou Box-Cox*). Outliers foram removidos quando necessário. O efeito foi determinado por ANOVA bi-direccional utilizando somas de quadrados do *Tipo III*. Para os dados não paramétricos, utilizou-se a análise de variância não paramétrica (*Kruskal Wallis*, pelo do procedimento *NPAR1WAY*), e para comparação das médias utilizou-se comparação entre dois grupos de cada vez (*Wilcoxon*).

Dados categóricos e cálculo de taxas (%) foram analisados pelo procedimento *Glimmix* ajustando para distribuição *Binomial* - função *link = Logit*. No modelo, foram incluídos *grupo* (Alta e Baixa fertilidade na PIVE), *réplicas* (1 a 5) e *interação grupo*réplicas* como efeitos fixos. Para correção dos graus de liberdade das variâncias foi incluída a opção *ddfm = kenwardroger*. Os resíduos foram utilizados como efeito aleatório e *Animal(Grupo)* como *erro termo*. O teste post hoc de diferença significativa incluiu ajuste de *Tukey*. Os valores foram apresentados como porcentagem (%). Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,05$.

As reações de *qRT-PCR* foram realizadas com *Fluidigm Biomark 96.96 Dynamic Arrays*. Os dados foram processados aplicando-se o método de quantificação relativo comparável ao $2^{-\Delta Ct}$. As suposições de distribuição normal e igualdade das variâncias dentro dos conjuntos de dados foram atendidas. Os dados foram transformados em *log* quando necessário e foram analisados por ANOVA usando os General Linear Models (*Proc GLM utilizando teste t*). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Diferenças foram aceitas para valores de $P \leq 0,10$. Para a normalização da expressão do gene alvo, foram tomadas as médias aritméticas geométricas dos genes de referência. Para estágio de oito células foram adotados ACTB, HMBS e PPIA. Para o estágio de blastocisto ACTB, HMBS e GAPDH.

6 RESULTADOS

6.1 TAXAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Os resultados obtidos da etapa de PIVE foram comparados com a triagem prévia (dados da produção comercial desses embriões), confirmando as taxas entre os grupos de alta e baixa fertilidade. A taxa de blastocisto e de desenvolvimento embrionário confirmaram os dados prévios e diferiram significativamente entre os grupos de alta e baixa fertilidade (Figura 1). Não houve diferença quanto à taxa de clivagem, também se adequando aos resultados da seleção dos animais (Figura 1).

Figura 1 - Taxas de clivagem, taxa de blastocistos Grau I e Grau II e de desenvolvimento embrionário entre os grupos de alta e baixa fertilidade

Fonte: Almeida (2018)

Nota: Diferentes letras indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

6.2 TAXA DE FECUNDAÇÃO

A taxa de fecundação foi maior no grupo de alta fertilidade do que no grupo de baixa, já a taxa de poliespermia foi maior no grupo de baixa fertilidade (Figura 2). A fecundação negativa não diferiu entre os dois grupos (Figura 2).

Figura 2 - Taxas de fecundação positiva normal (2PN), fecundação positiva com poliespermia (>2PN), e fecundação negativa (1 PN) entre os grupos de alta e baixa fertilidade

Fonte: Almeida (2018)

Figura 3 – Microscopia de epifluorescência de presumíveis zigotos corados com Hoechst (filtro DAPI); A = Poliespermia; B = Fecundação Negativa; C = Fecundação Normal

FONTE: Almeida (2018).

6.3 CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Não foram observados efeitos de grupo e estágio de desenvolvimento embrionário para velocidade de clivagem (Figura 3) em nenhum dos momentos avaliados (24, 36, 48, 60, 72 hpi). A maior porcentagem de estruturas não clivadas foi observada às 24 hpi (Figura 7A), de presumíveis zigotos com duas células às 36 hpi (Figura 3B), de 4 células às 36 e 48 hpi (Figura 3C), de 6 células às 48 hpi (Figura 3D), e finalmente 8 células às 72 hpi (Figura 3E) independente do grupo avaliado.

Figura 4 -Taxa de presumíveis zigotos clivados às 24, 36, 48, 60 e 72 horas pós inseminação nos grupos de alta e baixa fertilidade

Fonte: Almeida (2018)

Legenda: A- Estruturas não clivadas, B- total de embriões com 2 células, C- total de embriões com 4 células, D – total de embriões com 6 células e E – total de embriões com 8 células

6.4 EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

A expressão relativa avaliada no estágio de oito células apresentou maior número de genes diferencialmente representado (30/96) do que no estágio de blastocisto (12/96) (Tabela 1 e 2, respectivamente), sendo a razão entre a expressão relativa dos genes de baixa e alta fertilidade representada nas figuras 4 e 5, para oito células e blastocisto respectivamente. A maior parte dos genes em ambos estágios de desenvolvimento apresentou maior expressão no grupo de alta fertilidade do que de baixa. No estágio de oito células, apenas os genes CDK6, PGK1 e TFAM (3/30) tiveram maior expressão relativa no grupo de alta. Já no estágio de blastocisto apenas ACSL3, ELOV1, IFNT (3/12) estiveram mais representados do que no grupo de baixa fertilidade. Quanto à avaliação de qualidade embrionária, não houve diferença entre a porcentagem de células TUNEL positivas no grupo de alta (6,83%) e baixa (3,13%) fertilidade, nem na porcentagem de blastocistos GI (Alta: 43,7%; Baixa: 37,7%) (Figura 6).

Tabela 1 - Média e erro padrão da média da expressão relativa e valor de P dos genes que apresentaram diferença significativa ($p < 0,10$) entre os grupos de alta e baixa fertilidade no estágio de oito células

GENE	Grupo		Valor de P
	Alta Fertilidade	Baixa Fertilidade	
ACSL3	0.220±0.019	0.281±0.021	0,0259
BAX	0.158±0.021	0.240±0.019	0,0012
CDK6	0.0775±0.0070	0.0630±0.0068	0,0875
CPT1B	0.0069±0.0018	0.0103±0.0012	0,0103
DDIT3	1.3895±0.1246	1.6609±0.1320	0,0916
Dnmt3B	0.688±0.113	0.754±0.046	0,0515
ELOVL4	1.978±0.306	2.377±0.226	0,0716
ELOVL5	1.766±0.164	2.276±0.116	0,0021
FOXO3	1.268±0.123	1.609±0.127	0,0431
GDF9	3.842±0.446	4.913±0.406	0,0289
GPAM	0.035±0.006	0.042±0.004	0,0479
GREM1	0.00292±0.00070	0.00515±0.00089	0,0532
GSK3A	1.67±0.07	2.08±0.09	0,0015
HAND1	0.0261±0.0043	0.0393±0.0064	0,0759
HMBS	0.06±0.01	0.07±0.00	0,0547
IGFBP2	0.305±0.033	0.371±0.031	0,0437
MAPK1	1.3761±0.1627	1.9686±0.1771	0,0014
MORF4L2	0.6469±0.1003	0.7080±0.0683	0,0799
MTIF3	0.074±0.008	0.101±0.009	0,0159
NFE2L2	0.068±0.009	0.083±0.007	0,0309
NFkB2	0.529±0.084	0.599±0.060	0,00662
NOS2	0.368±0.078	0.436±0.039	0,0178
PGK1	2.387±0.241	1.514±0.107	0,0043
PPARG	0.171±0.027	0.197±0.011	0,0128
PPARGC1A	0.5723±0.1092	0.6039±0.0482	0,0811
PPIA	2.2089±0.1198	1.9038±0.0972	0,0849
PRDX3	0.088±0.014	0.105±0.088	0,0383
RGS2	2.693±0.430	4.135±0.428	0,0024
TFAM	0.473±0.069	0.309±0.035	0,0317
XBP1	0.1869±0.0090	0.2554±0.0266	0,0701

Fonte: Almeida (2018)

Nota: Em vermelho estão destacados os genes mais expressos no grupo de alta fertilidade.

Figura 5 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos genes diferencialmente expressos no estágio de oito células

Fonte: Almeida (2018)

Tabela 2 - Média e erro padrão da média da expressão relativa e valor de P dos genes que apresentaram diferença significativa estatística ($p < 0,10$) entre os grupos de alta e baixa fertilidade no estágio de oito células

GENE	Grupo		Valor de P
	Alta Fertilidade	Baixa Fertilidade	
ACSL1	0.042±0.003	0.055±0.004	0,0073
ACSL3	0.556±0.032	0.459±0.027	0,0188
BCL2	0.000169±0.000019	0.000614±0.000195	0,0133
CDCA8	0.119±0.005	0.140±0.008	0,0343
ELOVL1	0.047±0.003	0.034±0.003	0,008
HSPA1A	0.0108±0.0019	0.0171±0.0028	0,057
IFNT2/IFNT3/IFNT	0.06260±0.00717	0.04635±0.00630	0,0555
LUM	0.003±0.001	0.013±0.003	0,0022
MTIF3	0.010±0.001	0.013±0.001	0,0086
NDUFA1	0.0707±0.0094	0.0963±0.0123	0,0997
PPARGC1A	0.00165±0.001703	0.002655±0.000327	0,0053
STAT3	0.131±0.012	0.157±0.011	0,0597

Fonte: Almeida (2018)

Nota: Em vermelho, estão destacados os genes mais expressos no grupo de alta fertilidade.

Figura 6 - Média e erro padrão da média da expressão relativa dos genes diferencialmente expressos no estágio de blastocisto

Fonte: Almeida (2018)

Figura 7 – Microscopia de epifluorescência de embriões; A = *Contagem de células totais corados com Hoechst (filtro DAPI)* ; B = *Controle negativo - Ensaio TUNEL (Filtro FITC)*; C = *Células TUNEL positivas (Filtro FITC)*

Fonte: Almeida (2018)

Figura 8 - Taxas de células TUNEL – positivas (A), da porcentagem de blastocisto GI (B) e da contagem de células totais 9C)

Fonte: Almeida (2018)

7 DISCUSSÃO

7.1 TAXAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO*

A proposta inicial deste estudo foi avaliar a diferença do desenvolvimento embrionário pré-implantacional entre grupos de touros de alta e baixa fertilidade. As taxas de clivagem foram iguais entre os dois grupos e não houve, em todos os tempos avaliados do desenvolvimento inicial (24, 36, 48, 60, 72 hpi), diferença na cinética de desenvolvimento embrionário que se justifica a alta fertilidade dos touros. Em relação ao desenvolvimento inicial, já foi demonstrado que embriões que clivam mais rápido tem maior potencial de desenvolvimento à blastocistos (VAN SOOM et al., 1992; VAN SOOM; YSEBAERT; DE KRUIF, 1997; DINNYÉS et al., 1999; LONERGAN et al., 1999; COMIZZOLI; MERMILLOD; MAUGET, 2000; SOMFAI et al., 2010; YOUNG et al., 2017). No entanto, WARD et al., (2001) relataram que embriões com clivagens mais rápidas foram relacionados a touros com maior fertilidade *in vitro*.

Apesar de não detectadas nesse estudo, a diferença no desenvolvimento inicial entre os grupos de alta e baixa fertilidade *in vitro* pode ter ocorrido em um intervalo muito restrito de tempo, e pode não ter sido registrado nos momentos 24, 36, 48, 60, 72 hpi. Eid et al., (1994) verificaram a cinética de formação pronuclear entre touros com diferença de fertilidade *in vivo* checando os zigotos a cada duas horas entre 8 e 20 hpi. Nesse curto intervalo verificaram que a fase de replicação do DNA iniciava mais cedo, resultando em primeira clivagem mais precoce, nos touros de alta fertilidade *in vivo*. Entretanto, não houve prosseguimento do cultivo embrionário *in vitro* para estabelecer correlações dessa cinética pronuclear com resultados de clivagem e de blastocisto. COMIZZOLI, et al. (2000) também observaram diferenças na fase de replicação entre as 27 hpi e 33 hpi, o que no presente estudo não pode ser confirmado, pois as observações foram feitas às 24hpi e depois as 36hpi.

Os resultados de cinética de desenvolvimento foram muito condizentes com outros experimentos já relatados (VANDAELE et al., 2006; SOMFAI et al., 2010; SUGIMURA; AKAI; IMAI, 2017). Contudo, a porcentagem de embriões atingindo estágios mais avançados foi maior no presente estudo, o que pode ser decorrente de um sistema mais eficiente de produção. Essa pode também ser uma justificativa para a ausência de diferenças de desenvolvimento aliada à pressão de seleção de touros

nas centrais de reprodução (CASTRO et al., 2018a), que acabam por minimizar as diferenças entre os reprodutores.

Supreendentemente, mesmo sem apresentar diferenças quanto a cinética inicial, a taxa de fecundação foi maior no grupo de alta fertilidade e a taxa de poliespermia menor. Ainda que o grupo de baixa fertilidade tenha apresentado taxa de fecundação 16% menor em relação ao grupo de alta fertilidade (alta = 72%; baixa = 62%), e 44,6% a mais de fecundações com poliespermia (alta = 16,2%; baixa = 29,2%), esses valores corroboram aos já descritos na literatura (P. COMIZZOLI, B. MARQUANT-LE GUIENNE, Y. HEYMAN, 2000; ALOMAR et al., 2004, 2006).

Sabe-se que a poliespermia é altamente correlacionada às altas concentrações de espermatozoides no momento da fecundação (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015) e à baixa qualidade oocitária (HWANG et al., 2016). Entretanto, devido ao uso do sêmen sexado uma alta concentração não é esperada, já que o número total de espermatozoides na palheta do sêmen sexado (aproximadamente 4 milhões de espermatozoides) é inferior ao de uma palheta de sêmen convencional (aproximadamente 10 milhões de espermatozoides). Isto foi inclusive demonstrado por (AN et al., 2017) que reportaram taxas de poliespermia inferiores para o sêmen sexado quando comparado ao sêmen convencional de um mesmo touro. Além disso, os oócitos foram devidamente homogeneizados entre os grupos, não sendo suficiente para explicar as diferenças encontradas.

Touros com baixa fertilidade *in vitro* podem apresentar deficiência em proteínas de ativação oocitária, como por exemplo a PLCZ. Sem sua adequada concentração, é possível que uma ativação parcial ocorra, e que não haja a promoção adequada do influxo de cálcio que inicia a cascata para o bloqueio da poliespermia. Outra hipótese seria de que os espermatozoides dos touros de baixa fertilidade apresentassem falha estrutural na proteína IZUMO, que se liga ao receptor no oócito justamente para bloquear a entrada de mais espermatozoides (INOUE, 2017)consequentemente aumentando a frequência de poliespermia.

Ainda que o objetivo deste trabalho não tenha sido investigar as causas das taxas de poliespermia, e que a cinética inicial nem as taxas de clivagem tenham variado entre os grupos, seria interessante enfocar, em próximos estudos, as vias de sinalização na fecundação para estabelecer uma correlação com a poliespermia e possivelmente sobre o desenvolvimento embrionário subsequente.

7.2 EXPRESSÃO GÊNICA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Apesar da metodologia de avaliação para cinética de desenvolvimento embrionário inicial, ter sido limitada a momentos específicos, foi possível notar que embriões de touros de alta e baixa fertilidade apresentaram velocidade das primeiras clivagens semelhante. Isto indica que, no presente estudo, os efeitos paternos podem ter sido manifestados mais tardiamente (TESARIK; MENDOZA; GRECO, 2002; PALMA; SINOWATZ, 2004; FATEHI et al., 2006) ou seja, após o estágio de 8 células, momento de AGE em bovinos (PALMA; SINOWATZ, 2004).

Dos 96 genes avaliados nos embriões no estágio de oito células, 30 deles (31%) apresentaram diferença de representação entre os grupos de touros com alta e baixa fertilidade *in vitro*, sendo apenas três deles (PGK1, PPIA, TFAM) com maior representação no grupo de alta fertilidade. Os demais genes que estiveram mais expressos no grupo de baixa fertilidade estão relacionados às funções biológicas de metabolismo lipídico (ACSL3, CPT1B, ELOV4, ELOV5, GPAM, PPARG), de desenvolvimento e proliferação celular (CDK6, GDF9, GREM1, GSK3A, HAND1, IGFBP2, MAPK1, MORF4L2, PRDX3), de metabolismo proteico (HMBS, MTIF), de regulação epigenética (Dnmt3B) estresse e apoptose (BAX, DDIT3, FOXO3, NFE2L2, RGS2, XBP1, NFkB2, NOS2, PPARGC1A).

Dos transcritos relacionados ao estresse oxidativo, NFE2L2 (AMIN et al., 2014) e FOXO3 (KLOTZ et al., 2015) coordenam a expressão de genes para reestabelecimento do potencial óxido-redutivo (REDOX). O óxido nítrico, produto do transcrito NOS2 aparece em concentração mais elevadas quando há um estresse oxidativo (TAKAHASHI, 2012). Ainda que a família FOXO esteja envolvida na ativação da expressão de genes que codificam enzimas superóxido dismutase (KLOTZ et al., 2015), não houve diferença na representação dos genes SOD entre os dois, o que pode indicar que a via não foi adequadamente ativada no grupo de baixa. É possível que neste grupo, a defesa antioxidante seja menos eficiente, o que promove a necessidade de aumentar a necessidade de transcritos para obtenção do mesmo resultado.

As moléculas de espécies reativas de oxigênio (EROs) são produto normal de processos metabólicos e desempenham funções biológicas como sinalização e regulação celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). No espermatozoide, as EROs são fundamentais no processo de capacitação espermática (AITKEN et al., 1995) e

produto da reação na mitocôndria responsável pela geração de energia para o movimento dos espermatozoides (GARRETT; REVELL; LEESE, 2008). Quando a produção de EROs supera a defesa antioxidante do organismo, ocorre alteração na forma e conseqüentemente na função de diversas macromoléculas como DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (BIRBEN et al., 2012).

Em relação às proteínas, quando danificadas pelos EROs podem acumular-se no retículo endoplasmático, a organela mais importante para síntese proteica (RAO; ELLERBY; BREDESEN, 2004). Isso pode explicar o aumento de representatividade dos genes XBP1 e DDIT3 no grupo de baixa fertilidade, que funcionam como indicadores de estresse do retículo, em resposta ao acúmulo de proteínas danificadas (KANG et al., 2017) pelo provável estresse oxidativo. O transcrito XBP1 ativa genes necessários para degradação das proteínas anormais ou para a correção das mesmas (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005). Já o DDIT3, além de ser um indicador de estresse, também atua protegendo a células contra os danos oxidativos ativando outras vias e interferindo na metilação por exemplo (LEITE et al., 2017).

Os embriões provenientes dos touros de baixa fertilidade podem ter um sistema antioxidante menos eficiente, como já foi discutido, tornando-os mais sensíveis ao estresse oxidativo do que os embriões do grupo de alta fertilidade. Mas outra possibilidade seria de que o próprio sêmen fosse carreador de EROs, promovendo um ambiente em desbalanço oxidativo. Como o touro foi o único fator de diferença entre os embriões dos dois grupos avaliados, sendo as condições de tensão de oxigênio de cultivo iguais, o sêmen dos touros de baixa fertilidade pode estar induzindo um maior estresse oxidativo no meio FIV como indica os padrões gênicos observados.

Esse estresse oxidativo pode ser ocasionado pelo próprio processo de sexagem e criopreservação do sêmen (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2012; AMIDI et al., 2016). Sabe-se que o sêmen de cada touro ou até mesmo partidas do mesmo touro reagem de maneira diferente aos desafios promovidos pelo ambiente durante a manipulação e do seu processamento (HOLT, 2000). Logo existem touros, ou partidas, que são considerados piores para criopreservação ou sexagem, o que pode promover um aumento na produção de EROs.

Os efeitos negativos do estresse oxidativo espermático na produção embrionária foram relatados na fecundação, clivagem e na produção de blastocisto (CASSINA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2016; SIMÕES et al., 2013; SIQUEIRA,

2016). As taxas de blastocisto foram diferentes entre os grupos, mas não as de clivagem, o que está em concordância com o trabalho de Pang et al. (2016) que, ao suplementar o sêmen com um antioxidante, observou aumento da taxa de blastocisto sem alterar a taxa de clivagem.

Já os resultados apresentados relativos à taxa de fecundação podem ser uma consequência do prévio estresse oxidativo oriundo das palhetas de sêmen afetando as proteínas espermáticas, apesar de não ter sido mensurada a produção de radicais livres após a descongelação. A alteração da forma das proteínas espermáticas poderia levar justamente às falhas na ligação entre oócito e espermatozoide, levando a redução da taxa de fecundação como também propiciar o aumento de poliespermia pela redução da ativação do bloqueio espermático.

Esse quadro pode gerar uma ativação de diversas vias, como as vias lipídicas e proteicas descritas nesse trabalho, que podem ser uma tentativa de reparo de dano do embrião. Quando essa tentativa de reparo é insuficiente, mecanismos pró-apoptóticos são desencadeados para eliminar os embriões inaptos para prosseguir com o desenvolvimento.

O estresse oxidativo é apontado como uma das principais causas para apoptose celular podendo agir em diversas vias simultaneamente (KANNAN; JAIN, 2000). A expressão de FOXO3 ligada a resposta ao estresse oxidativo também regula a ativação de vias pró-apoptóticas intrínsecas envolvendo genes da família BCL-2, como BCL6 e BIM (NAKAMURA; SAKAMOTO, 2008). O gene pró-apoptótico BAX também da família BCL-2, é essencial para a ocorrência de morte celular programada pois permite permeabilização da membrana mitocondrial (RENAULT et al., 2015). Apesar de não ter sido descrito no trabalho de Nakamura e Sakamoto, (2008) e Chung et al., (2013) observaram que o BAX, pode ser ativado pela via de p53, que também pode ser regulada pelo FOXO3.

Assim como a família BCL-2, os fatores da família NF- κ B promovem a expressão de genes que induzem ou bloqueiam a apoptose celular dependendo do estímulo recebido, relacionados a via de apoptose extrínseca (KALTSCHMIDT et al., 2000). O gene NF- κ B2 mais expresso no grupo de baixa fertilidade codifica a proteína p100, ou p52 na forma ativa, envolvida na ativação de mecanismos de sobrevivência celular (MIN et al., 2008) o que pode ser uma resposta compensatória a atividade pró-apoptótica e ao estresse celular estabelecido.

Ambas vias apoptóticas ativam a via das caspases efetoras, as quais pertencem a caspase 3 e 7, cujos genes (CASP3, CASP 7) foram avaliados, mas não foram encontradas diferenças entre os grupos. Por ser a última etapa a induzir a morte celular, é possível que no momento da avaliação essa via ainda não tenha sido ativada no grupo de baixa fertilidade, justificando a ausência de diferença de representação em relação ao grupo de alta fertilidade.

A análise realizada permite a observação simultânea de apenas 96 genes e pouca diferença de representatividade foi encontrada. O fato da maioria estar relacionada a vias apoptóticas ou de estresse oxidativo pode ser uma mera consequência do “recorte” feito na seleção dos genes para este estudo. Ou seja, muitas outras vias podem estar diferencialmente representadas, mas apenas com uma análise global seria possível avaliá-las com maior precisão.

O bloqueio embrionário não é consequência da interação de apenas 2 vias, mas sim de muitas outras interligadas. Sugere-se que genoma paterno dos embriões de baixa fertilidade apresente um conjunto de genes indesejáveis, ou menos adequados ao desenvolvimento nas condições observadas. Seja por mutações na espermatogênese, danos decorrentes a criopreservação, ou a manipulação *in vitro*, esse conjunto de genes característicos fornecidos ao embrião, impossibilitariam a adequação às condições ambientais, impedindo o prosseguimento da vida.

Esse bloqueio poderia ocorrer tanto no momento de ativação do genoma, em que genes determinados devem ser ativados ou silenciados de forma sincrônica para garantir a continuidade do processo, ou mesmo após a ativação.

Tudo se encaixa ao postulado da teoria evolucionista Darwinista em que o organismo com as variações mais favoráveis às condições ambientais tem maiores chances de sobrevivência. A dificuldade de estabelecer um padrão das variações ideais, ou, no caso, genes ideais, é justamente a variabilidade de fatores envolvidos, que podem requerer um conjunto de genes diferente para cada situação. Isso sem mencionar as modificações epigenéticas que alteram completamente o funcionamento de moléculas possibilitando novas perspectivas para um mesmo padrão de representação gênica.

Não se pode afirmar que os embriões do grupo de baixa fertilidade sofreram maior bloqueio de desenvolvimento embrionário no estágio de 8 células, pois não houve avaliação posterior de contagem de blastômeros. Entretanto, os resultados apontam esse período como sendo crucial na formação de blastocistos.

Diferentemente dos embriões de 8 células, os blastocistos apresentaram um menor número de genes diferentemente representados entre os grupos (12/96; 12,5%), indicando uma maior semelhança entre as estruturas independente do grupo. Isto também foi observado nas avaliações de qualidade embrionária não havendo diferença significativa na porcentagem de células totais, porcentagem de células TUNEL positivas e porcentagem de blastocistos GI entre os grupos de alta e baixa fertilidade.

Garcia et al., (2015) sugeriram que os embriões que conseguissem ultrapassar o momento de AGE teriam o mesmo potencial de alcançar o estágio de blastocisto, justificando os resultados encontrados no presente estudo, ainda que só se possa especular um maior bloqueio embrionário no grupo de baixa fertilidade. Os embriões que conseguiram promover o reparo de danos, superando os desafios do meio e as suas possíveis “deficiências genômicas”, no momento de ativação ou logo após a ativação do genoma são os sobreviventes. Por isso acabam apresentando muitas semelhanças.

Tais semelhanças entre os blastocistos de alta e baixa fertilidade são reforçadas já que não houve diferenças no desenvolvimento inicial. Diferenças no padrão global de metilação, expressão gênica e metabolismo se mostraram acentuadas em estudos cujos embriões apresentaram desenvolvimento embrionário diferente (MILAZZOTTO et al., 2016; ISPADA et al., 2018).

Os blastocistos provenientes dos touros de baixa fertilidade, apresentaram maior expressão do gene BCL-2, também da família BCL, porém este relacionado à atividade anti-apoptótica, o contrário do que ocorreu no estágio de 8 células. Ainda que tenham atingido o estágio de blastocisto de forma semelhante ao grupo de alta fertilidade, o estágio de oito células no grupo baixa fertilidade demonstrou maior representação de vias de estresse e apoptose. Consequentemente, os embriões desse grupo estavam menos aptos à sobrevivência, repercutindo na menor taxa de blastocisto e na necessidade compensatória de impedir a apoptose num estágio mais avançado do desenvolvimento.

Genes relacionados ao metabolismo lipídico, com exceção do ACSL3, também foram mais expressos nos embriões do grupo de baixa fertilidade assim como no estágio de 8 células. Apesar dos lipídeos serem biomoléculas essenciais presentes na membrana plasmática e de muitas organelas, acúmulo lipídico em embriões *in vitro* é relacionado à baixa qualidade embrionária e baixa sobrevivência após

criopreservação (SUDANO et al., 2014), o que já é uma característica reconhecida nos embriões *in vitro* quando comparados aos embriões *in vivo*.

De forma geral, os embriões de 8 células e blastocistos do grupo de baixa fertilidade apresentaram níveis mais elevados nas vias relacionadas ao metabolismo energético, lipídico, de síntese proteica e reparo de danos celulares. Este perfil foi descrito por (BAUMANN et al., 2007), sendo relacionado à avaliação de metabolismo de um embrião que direcionava o gasto energético para reparo de danos. Tais vias também são encontradas diferencialmente representadas entre embriões *in vivo* e *in vitro* indicando que são cruciais para um desenvolvimento adequado, considerando que padrão mais perto do ideal seria do modelo *in vivo* (GAD et al., 2012).

Apesar de não terem sido encontradas muitas diferenças entre os blastocistos, o gene IFNT foi maior no grupo de alta fertilidade. Esse gene tem se mostrado um sensível indicador de qualidade embrionária já que é capaz de codificar a proteína necessária para reconhecimento materno fetal. A abundância desse transcrito nos embriões *in vitro* quando comparados aos *in vivo* foi elevada e precoce (KUBISCH; LARSON; ROBERTS, 1998; NEIRA et al., 2007), sendo um possível indicativo da qualidade embrionária inferior em relação aos produzidos *in vivo*. Entretanto, quando comparados embriões *in vitro* entre si, os embriões com maior potencial de desenvolvimento apresentaram maior representação desse gene além de melhor classificação morfológica (NEIRA et al., 2007). É possível que embriões *in vitro* necessitem de maior abundância desse transcrito para garantir o reconhecimento da gestação. Por tanto, é possível que embriões dos touros de alta fertilidade resultem melhores resultados de prenhez do que os embriões dos touros de baixa fertilidade, indicando maior qualidade. Entretanto, como não foi realizada a transferência dos embriões para avaliação de prenhez, ou a comparação da representação dos transcritos em embriões *in vivo*, não há como confirmar os dados relacionados a qualidade embrionária.

8 CONCLUSÕES

Touros de alta e baixa fertilidade *in vitro* não diferem quanto a cinética das primeiras clivagens, quanto a fragmentação de DNA nos blastocistos, nem quanto a contagem de células totais e grau de qualidade embrionária. Entretanto, houve diferença em relação a taxa de fecundação e a expressão gênica embrionária.

Touros de alta fertilidade apresentam maior taxa de fecundação e menor taxa de poliespermia em relação aos grupos de baixa fertilidade.

No estágio de 8 células, foram observadas maiores diferenças na representação gênica entre o grupo de alta e de baixa fertilidade, sendo genes relacionados às vias de estresse oxidativo e apoptose mais abundantes. No estágio de blastocisto houve menor representação gênica entre os grupos indicando maior similaridade nesse estágio.

Não foi possível identificar o momento de divergência no desenvolvimento embrionário pré-implantacional entre os grupos de alta e baixa fertilidade.

REFERÊNCIAS

A, A. G.; C, C. R. W.; B, A. V. S. Why we should not select the faster embryo : lessons from mice and cattle. p. 765–775, 2015.

A, K. Z.; A, G. W. S. Maternal control of early embryogenesis in mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, n. February, p. 880–896, 2015.

AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DREVET, J.; GHARAGOZLOO, P. Causes and consequences of oxidative stress in Spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1–2, p. 1–10, 2016.

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa1. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1037–1046, 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod59.5.1037>>.

AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497–506, 2001.

AITKEN, R. J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D. W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of cell science**, v. 108 (Pt 5, n. 1995, p. 2017–2025, 1995.

ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030 / 2050 The 2012 Revision. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, n. 12, p. 146, 2012.

ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 3, p. 395–402, 2006.

ALOMAR, M. et al. Assessment Of Sperm Motility, Viability, And Fertilization Rate Of Two Groups Of Bulls Showing A Different Ability To Promote Embryo Development In Vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, p. 269–269

- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1–2, p. 48–61, 2008.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5–17, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>>.
- AMARNATH, D.; LI, X.; KATO, Y.; TSUNODA, Y. Gene expression in individual bovine somatic cell cloned embryos at the 8-cell and blastocyst stages of preimplantation development. **The Journal of reproduction and development**, v. 53, n. 6, p. 1247–63, 2007. Disponível em: <<http://japanlinkcenter.org/JST.JSTAGE/jrd/19096?from=Google%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965542>>.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; SHABANI NASHTAEI, M.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p. 745–756, 2016.
- AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 6, p. 497–513, 2014.
- AN, L.-Y.; CHAUBAL, S. A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; NEDAMBALE, T. L.; XU, J.; XUE, F.; MORENO, J. F.; TAO, S.; PRESICCE, G. A.; DU, F. Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed <i>in vitro</i> fertilization. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 2, p. 175–183, 2017. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/63/2/63_2016-142/_article>.
- ANIFANDIS, G.; MESSINI, C.; DAFOPOULOS, K.; SOTIRIOU, S.; MESSINIS, I. Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12972–12997, 2014.
- ANTUNES, G.; CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; MARQUES, A.; JIN, H. S.; DA SILVA, F. M. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 26–32, 2010.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v. 15, n. 4, p. 355–367, 2007.

BANG, J. II; LEE, H. S.; DEB, G. K.; HA, A. N.; KWON, Y. S.; CHO, S. K.; KIM, B. W.; CHO, K. W.; KONG, I. K. Proteomic identification of abnormally expressed proteins in early-stage placenta derived from cloned cat embryos. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 358–366, 2013.

BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 141–152, 1990.

BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; SA FILHO, M. F.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. H.; SALES, J. N.; SARTORI, R. Associations of Insulin Resistance Later in Lactation on Fertility of Dairy Cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 263–269, jul. 2016.

BASU, M.; MUKHOPADHYAY, S.; CHATTERJEE, U.; ROY, S. S. FGF16 promotes invasive behavior of SKOV-3 ovarian cancer cells through activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1415–1428, 2014.

BAUMANN, C. G.; MORRIS, D. G.; SREENAN, J. M.; LEESE, H. J. The Quiet Embryo Hypothesis: Molecular Characteristics Favoring Viability. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 10, p. 1345–1353, out. 2007.

BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic Regulation of Embryo Death and Senescence. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 171–191, jan. 2001.

BIRBEN, E.; MURAT, U.; MD, S.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, n. January, p. 9–19, 2012.

BÓ, G. A. .; CUTAIA, L. .; CHESTA, P. .; BALLA, E. .; PICINATO, D. .; PERES, L. .; MARAÑA, D. .; AVILÉS, M. .; MENCHACA, A. .; VENERANDA, G. .; BARUSELLI, P. S. . **Implementacion de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de argentina. , June 2005, Córdoba, Argentina, pp .Proc VI Simposio Internacional de Reproducción AnimalCórdoba ARIRAC, , 2005. .**

BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. 147–155, 2007.

BOS-MIKICH, A.; MATTOS, A. L. G.; FERRARI, A. N. Early cleavage of human embryos: An effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. **Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 2658–2661, 2001.

CARROCERA, S.; CAAMAÑO, J. N.; TRIGAL, B.; MARTÍN, D.; DíEZ, C. Theriogenology Developmental kinetics of in vitro – produced bovine embryos : An aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 822–827, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.028>>.

CASSINA, A.; SILVEIRA, P.; CANTU, L.; MONTES, J. M.; RADI, R.; SAPIRO, R. Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production1. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 5, p. 1–10, 1–119, 119, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.115.130989>>.

CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A. Theriogenology Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. v. 107, p. 142–148, 2018a.

CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P. P.; HAMILTON, T. R. S. S.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 107, p. 142–148, 2018b.

CHANG, M. C.; PINCUS, G. Physiology of Fertilization in Mammals. **Physiological reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–26, jan. 1951.

CHEESEMAN, L. P.; BOULANGER, J.; BOND, L. M.; SCHUH, M. Two pathways regulate cortical granule translocation to prevent polyspermy in mouse oocytes. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

CHUNG, Y. M.; PARK, S.; TSAI, W.; WANG, S.; IKEDA, M. NIH Public Access. 2013.

COMIZZOLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive Biotechnologies for Endangered Mammalian Species. **Reproduction, nutrition, development**, v. 40, n. 5, p. 493–504, 2000.

COY, P.; AVILÉS, M. What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? **Biological Reviews**, v. 85, n. 3, p. 593–605, 2010.

CROWE, M. A.; HOSTENS, M.; OPSOMER, G. Reproductive management in dairy cows - the future. p. 1–13, 2018.

DANILENKO, D. M.; MONTESTRUQUE, S.; PHILO, J. S.; LI, T.; HILL, D.; SPEAKMAN, J.; BAHRU, M.; ZHANG, M.; KONISHI, M.; ITOH, N.; CHIRICA, M.; DELANEY, J.; HERNDAY, N.; MARTIN, F.; HARA, S.; TALVENHEIMO, J.; NARHI, L. O.; ARAKAWA, T. Recombinant rat fibroblast growth factor-16: Structure and biological activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 361, n. 1, p. 34–46, 1999.

DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D. A.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DEMYDA-PEYRÁS, S.; DORADO, J.; HIDALGO, M.; MORENO-MILLÁN, M. Influence of sperm fertilising concentration, sperm selection method and sperm capacitation procedure on the incidence of numerical chromosomal abnormalities in IVF early bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 2, p. 351–359, 2015.

DINNYÉS, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T.; BOLAND, M. P.; YANG, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 318–324, 1999.

EID, L. N.; LORTON, S. P.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1232–7, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7888500>>.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.-A. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, n. 1, p. 84–96, 2006a. Disponível em: <<http://physiolgenomics.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiolgenomics.00111.2006>>.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.-A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, n. 1, p. 84–96, 2006b. Disponível em: <<http://physiolgenomics.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiolgenomics.00111.2006>>.

ESPINOSA-CERVANTES, R.; CORDOVA-IZQUIERDO, A. Sexing sperm of domestic animals. **Tropical animal health and production**, v. 45, n. 1, p. 1–8, 2012.
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, n. 4, p. 659–670, set. 1999.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 176–188, 2006.

FENWICK, J. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. **Human Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 407–412, 2002. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/17/2/407.abstract>>.

FLÉCHON, J. E. The acrosome of eutherian mammals. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 147–157, 2016.
FU, J.; WANG, X. J.; WANG, Y. W.; SUN, J.; GEMZELL-DANIELSSON, K.; SUN, X. X. The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 8, p. 437–441, 2009.

GAD, A.; HOELKER, M.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; CINAR, U.; RINGS, F.; HELD, E.; DUFORT, I.; SIRARD, M.-A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–13, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.099697>>.

GARCIA, S. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M.; MEIRELLES, F. V. Developmental block and programmed cell death in bos indicus embryos: Effects of protein supplementation source and developmental kinetics. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

GARDNER, A. J.; EVANS, J. P. Mammalian membrane block to polyspermy: New insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1–2, p. 53–61, 2006.

GARDNER, D. K.; KELLEY, R. L. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. v. 8, n. 2017, p. 418–435, 2018.

GARRETT, L. J. A.; REVELL, S. G.; LEESE, H. J. Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 449–458, 2008.

GEORGADAKI, K.; KHOURY, N.; SPANDIDOS, D. A.; ZOUMPOURLIS, V. The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 979–986, 2016.

GHANEM, N.; SALILEW-WONDIM, D.; GAD, A.; TESFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. **Reproduction**, v. 142, n. 4, p. 551–564, 2011.

GOVINDARAJU, A.; UZUN, A.; ROBERTSON, L. S.; ATLI, M. O.; KAYA, A.; TOPPER, E.; CRATE, E. A.; PADBURY, J.; PERKINS, A.; MEMILI, E. Dynamics of microRNAs in bull spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1–10, 2012.

GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; BLUM, H.; WOLF, E. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1–2, p. 46–58, 2014.

GUÉNEAU, S. Neoliberalism and the Emergence of Private Sustainability Initiatives: The Case of the Brazilian Cattle Value Chain. **Business Strategy and the Environment**, v. 27, n. 2, p. 240–251, 2018.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 441–448, 2004.

HARAYAMA, H.; MINAMI, K.; KISHIDA, K.; NODA, T. Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa. n. December 2016, p. 89–98, 2017.

HAVLIK, P.; VALIN, H.; HERRERO, M.; OBERSTEINER, M.; SCHMID, E.; RUFINO, M. C.; MOSNIER, A.; THORNTON, P. K.; BOTTCHER, H.; CONANT, R. T.; FRANK, S.; FRITZ, S.; FUSS, S.; KRAXNER, F.; NOTENBAERT, A. Climate change mitigation through livestock system transitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 10, p. 3709–3714, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1308044111>>.

HOLDEN, S. A.; FERNANDEZ-FUERTES, B.; MURPHY, C.; WHELAN, H.; O'GORMAN, A.; BRENNAN, L.; BUTLER, S. T.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. **Theriogenology**, v. 87, p. 221–228, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.024>>.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47–58, 2000.

HUE, I. Determinant molecular markers for peri-gastrulating bovine embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1–2, p. 51–65, 2016.

HUNTER, G.; DEMMENT, R.; MILLER, D. Development of Strength and Maximum Oxygen Uptake during Simultaneous Training for Strength and Endurance. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 27, n. 3, p. 269–275, set. 1987.

HWANG, I.-S.; KWON, D.-J.; IM, G.-S.; TASHIMA, K.; HOCHI, S.; HWANG, S. HIGH INCIDENCE OF POLYSPERMIC FERTILIZATION IN BOVINE OOCYTES MATURED IN VITRO AFTER CRYOTOP VITRIFICATION. **Cryo letters**, v. 37, n. 1, p. 27–33, 2016.

IKAWA, M.; INOUE, N.; BENHAM, A. M.; OKABE, M.; CHANG, M. C.; AUSTIN, C. R. Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte. **The journal of clinical investigation**, v. 120, n. 4, p. 984–994, 2010.

INOUE, D.; WITTBRODT, J.; GRUSS, O. J. Loss and Rebirth of the Animal Microtubule Organizing Center: How Maternal Expression of Centrosomal Proteins Cooperates with the Sperm Centriole in Zygotic Centrosome Reformation. **BioEssays**, v. 40, n. 4, p. 1–9, 2018.

INOUE, N. Novel insights into the molecular mechanism of sperm–egg fusion via IZUMO1. **Journal of Plant Research**, v. 130, n. 3, p. 475–478, 2017.

ISGANAITIS, E.; SUEHIRO, H.; CARDONA, C. Who's your daddy?: Paternal inheritance of metabolic disease risk. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 24, n. 1, p. 47–55, 2017.

ISPADA, J.; DE LIMA, C. B.; SIRARD, M.-A.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; ANNES, K.; MILAZZOTTO, M. P. Genome-wide screening of DNA methylation in bovine blastocysts with different kinetics of development. **Epigenetics & Chromatin**, v. 11, n. 1, p. 1, 2018. Disponível em: <<https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-017-0171-z>>.

IWATA, H.; SHIONO, H.; KON, Y.; MATSUBARA, K.; KIMURA, K.; KUWAYAMA, T.; MONJI, Y. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3–4, p. 234–244, 2008.

JIANG, Z.; SUN, J.; DONG, H.; LUO, O.; ZHENG, X.; OBERGFELL, C.; TANG, Y.; BI, J.; O'NEILL, R.; RUAN, Y.; CHEN, J.; TIAN, X. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2014.

KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C.; HOFMANN, T. G.; HEHNER, S. P.; DRÖGE, W.; SCHMITZ, M. L. The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 12, p. 3828–3835, 2000.

KANG, M.-H.; DAS, J.; GURUNATHAN, S.; PARK, H.-W.; SONG, H.; PARK, C.; KIM, J.-H. The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. **Theranostics**, v. 7, n. 19, p. 4735–4752, 2017. Disponível em: <<http://www.thno.org/v07p4735.htm>>.

KANNAN; JAIN. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology**, v. 7, n. 3, p. 153–163, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996508>>.

KIRKEGAARD, K.; KESMODEL, U. S.; HINDKJÆR, J. J.; INGERSLEV, H. J. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients : a prospective cohort study. v. 28, n. 10, p. 2643–2651, 2013.

KLOTZ, L. O.; SÁNCHEZ-RAMOS, C.; PRIETO-ARROYO, I.; URBÁNEK, P.; STEINBRENNER, H.; MONSALVE, M. Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox Biology**, v. 6, p. 51–72, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>>.

KRAWETZ, S. A. Paternal contribution: New insights and future challenges. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 633–642, 2005.

KROPP, J.; CARRILLO, J. A.; NAMOUS, H.; DANIELS, A.; SALIH, S. M.; SONG, J.; KHATIB, H. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.

KUBISCH, H. M.; LARSON, M. A.; ROBERTS, R. M. Relationship between Age of Blastocyst Formation and Interferon-Tau Secretion by in Vitro-Derived Bovine Embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 49, n. 3, p. 254–260, mar. 1998.

LAMY, J.; NOGUES, P.; COMBES-SOIA, L.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; MERMILLOD, P.; DRUART, X.; SAINT-DIZIER, M. Identification by Proteomics of Oviductal Sperm-Interacting Proteins. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 155, n. 5, p. 457–466, maio 2018.

LANE, M.; MCPHERSON, N. O.; FULLSTON, T.; SPILLANE, M.; SANDEMAN, L.; KANG, W. X.; ZANDER-FOX, D. L. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.

LARSSON, B. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility ? p. 327–336, 2000.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23–42, 2008.

LEE, C.; LEE, T.; HUANG, C.; CHEN, H. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology Detection of early cleavage embryos improves pregnancy and delivery rates of Day 3 embryo transfer during in vitro fertilization. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 55, n. 4, p. 558–562, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2016.06.005>>.

LEE, M.; LEE, R. K.; LIN, M.; HWU, Y. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. p. 745–750, 2012.

LEIDENFROST, S.; BOELHAUVE, M.; REICHENBACH, M.; GÜNGÖR, T.; REICHENBACH, H. D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; HABERMANN, F. A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: Lessons from the bovine model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

LEITE, R. F.; ANNES, K.; ISPADA, J.; DE LIMA, C. B.; DOS SANTOS, É. C.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; MILAZZOTTO, M. P.; LEITE KELLY; ISPADA, JESSICA; DE LIMA, CAMILA BRUNA; DOS SANTOS, ÉRIKA CRISTINA; FONTES, PATRICIA KUBO; NOGUEIRA, MARCELO FÁBIO GOUVEIA; MILAZZOTTO, MARCELLA PECORA, R. F.; A. Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on In Vitro Produced Embryos. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1vc, p. 1502489, 25 out. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2017/1502489>>.

LEWIS, S. E. M.; AITKEN, R. J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 33–41, 2005.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594–1601, 2011.

LONERGAN, P.; GUTIRREZ-ADN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 146–152, 2000.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1999. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/jrf.0.1170159>>.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression – experience from animal studies. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 6, p. 657–663, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472648310620883>>.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction, nutrition, development**, v. 41, n. 5, p. 427–437, 2001.

LU, K. H.; SEIDEL, G. E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 819–830, 2004.

LUKE, L.; CAMPBELL, P.; VAREA SANCHEZ, M.; NACHMAN, M. W.; ROLDAN, E. R. S. Sexual selection on protamine and transition nuclear protein expression in mouse species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1783, p. 20133359–20133359, 2014. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2013.3359>>.

LUNDIN, K.; BERGH, C.; HARDARSON, T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. **Human Reproduction**, v. 16, n. 12, p. 2652–2657, 2001.

MAILLO, V.; SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; LOPERA-VASQUEZ, R.; HAMDÍ, M.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Oviductal response to gametes and early embryos in mammals. **Reproduction**, v. 152, n. 4, p. R127–R141, 2016.

MARTÍN-ROMERO, F. J.; MIGUEL-LASOBRAS, E. M.; DOMÍNGUEZ-ARROYO, J. A.; GONZÁLEZ-CARRERA, E.; ÁLVAREZ, I. S. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, n. 5, p. 652–661, 2008. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60312-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60312-4)>.

MEIRELLES, F. V.; CAETANO, A. R.; WATANABE, Y. F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S. F.; MERIGHE, G. K.; GARCIA, S. M. Genome Activation and Developmental Block in Bovine Embryos. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 13–20, jul. 2004.

MELKA, M. G.; RINGS, F.; H?LKER, M.; THOLEN, E.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different Morphological Quality Groups of In Vitro-produced Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 915–921, 2010.

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N. L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 36–41, 1998.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: A review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87–96, 2000.

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES, C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Á.; ROSS, P. J. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 324–336, 2016.

MILEWSKI, R.; MILEWSKA, A. J.; KUCZY, A.; KUCZY, W. Do morphokinetic data sets inform pregnancy potential ? p. 357–365, 2016.

MIN, C.; EDDY, S. F.; SHERR, D. H.; SONENSHEIN, G. E. NF-KappaB and Epithelial to Mesenchymal Transition of Cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 104, n. 3, p. 733–744, jun. 2008.

MORALES, A. M.; ÁLVAREZ, O. G.; RAMÓN, M.; PASTOR, F. M.; SANTOS, M. R. F.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J. Current status and potential of morphometric sperm analysis. p. 863–870, 2016.

NAIB, A. Al; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **THE**, v. 76, n. 1, p. 161–167, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.038>>.

NAKAMURA, T.; SAKAMOTO, K. Forkhead transcription factor FOXO subfamily is essential for reactive oxygen species-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 281, n. 1–2, p. 47–55, 2008.

NEIRA, J. A.; TAINTURIER, D.; L'HARIDON, R. M.; MARTAL, J. Comparative IFN- τ secretion after hatching by bovine blastocysts derived ex vivo and completely produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 1, p. 68–75, 2007.

NEYER, A.; ZINTZ, M.; STECHER, A.; BACH, M.; WIRLEITNER, B.; ZECH, N. H.; VANDERZWALMEN, P. The impact of paternal factors on cleavage stage and blastocyst development analyzed by time-lapse imaging — a retrospective observational study. p. 1607–1614, 2015.

NI, W. Theriogenology Time of early cleavage affects the developmental potential of feline preimplantation embryos in vitro ski. v. 89, p. 26–31, 2017.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of Expression of Developmentally Important Genes in Preimplantation Bovine Embryos by in Vitro Culture Conditions: Implications for Subsequent Development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21–34, jan. 2000.

OKABE, M. Sperm-Egg Interaction and Fertilization: Past, Present, and Future. **Biology of reproduction**, fev. 2018.

OROZCO-LUCERO, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; SIRARD, M. A. Rapidly cleaving bovine two-cell embryos have better developmental potential and a distinctive mRNA pattern. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 1, p. 31–41, 2014.

OROZCO-LUCERO, E.; SIRARD, M.-A. Molecular markers of fertility in cattle oocytes and embryos: progress and challenges. **Anim. Reprod**, v. 11, n. 3, p. 183–194, 2014.

OSTERMEIER, G. C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J. D.; DIAMOND, M. P.; KRAWETZ, S. A. Reproductive Biology: Delivering Spermatozoan RNA to the Oocyte. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 154, maio 2004.

P. COMIZZOLI, B. MARQUANT-LE GUIENNE, Y. HEYMAN, J. P. R. Onset of the First S-Phase Is Determined by a Paternal Effect During the G1-Phase in Bovine Zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1677–1684, 2000. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/62/6/1677.long>>.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and Female Effects on the in Vitro Production of Bovine Embryos. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257–262, out. 2004.

PALMER, M. A.; OLMOS, G.; BOYLE, L. A.; MEE, J. F. A comparison of the estrous behavior of Holstein-Friesian cows when cubicle-housed and at pasture. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 382–388, 2012.

PANG, Y.-W.; SUN, Y.-Q.; JIANG, X.-L.; HUANG, Z.-Q.; ZHAO, S.-J.; DU, W.-H.; HAO, H.-S.; ZHAO, X.-M.; ZHU, H.-B. Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 11, p. 993–1002, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22742>>.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67–73, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>>.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859–869, 1995.

PERKEL, K. J.; TSCHERNER, A.; MERRILL, C.; LAMARRE, J. The ART of Selecting the Best Embryo : A Review of Early Embryonic Mortality and Bovine Embryo Viability Assessment Methods. v. 17, p. 1–17, 2015.

PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P.; RUBES, J.; LECHNIAK, D. Early Cleaved Bovine Embryos Show Reduced Incidence of Chromosomal Aberrations and Higher Developmental Potential on Day 4.5 Post-Insemination. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47, n. 6, p. 899–906, dez. 2012.

PUGLISI, R.; BALDUZZI, D.; GALLI, A. In vitro sperm penetration speed and its relationship with in vivo bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 424–428, 2004.

RAO, R. V.; ELLERBY, H. M.; BREDESEN, D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. **Cell Death and Differentiation**, v. 11, n. 4, p. 372–380, 2004.

RENAULT, T. T.; FLOROS, K. V.; ELKHOLI, R.; CORRIGAN, K.-A.; KUSHNAREVA, Y.; WIEDER, S. Y.; LINDTNER, C.; SERASINGHE, M. N.; ASCIOLLA, J. J.; BUETTNER, C.; NEWMAYER, D. D.; CHIPUK, J. E. Mitochondrial Shape Governs BAX-Induced Membrane Permeabilization and Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 57, n. 1, p. 69–82, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276514008636>>.

RIPAMONTE, P.; MESQUITA, L. G.; CORTEZZI, S. S.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FONSECA MERIGHE, G. K.; WATANABE, Y. F.; CAETANO, A. R.; MEIRELLES, F. V. Differential gene expression and developmental competence in vitro produced bovine embryos. **Zygote**, v. 20, n. 3, p. 281–290, 2012.

ROCHA, J. C.; PASSALIA, F. J.; MATOS, F. D.; TAKAHASHI, M. B.; CINICIATO, D. D. S.; MASERATI, M. P.; ALVES, M. F.; DE, T. G. A Method Based on Artificial Intelligence To Fully Automatize The Evaluation of Bovine Blastocyst Images. n. July, p. 1–10, 2017a.

ROCHA, J. C.; PASSALIA, F. J.; MATOS, F. D.; TAKAHASHI, M. B.; PETER, M.; JR, M.; ALVES, M. F.; ALMEIDA, T. G. De. Data Descriptor : Automatized image processing of bovine blastocysts produced in vitro for quantitative variable determination. **Nature Publishing Group**, v. 4, p. 1–9, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sdata.2017.192>>.

SALILEW-WONDIM, D.; HOLKER, M.; RINGS, F.; GHANEM, N.; ULAS-CINAR, M.; PEIPPO, J.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. **Physiological Genomics**, v. 42, n. 2, p. 201–218, 2010a. Disponível em: <<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiolgenomics.00047.2010>>.

SALILEW-WONDIM, D.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; GHANEM, N.; ULAS-CINAR, M.; PEIPPO, J.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. **Physiological Genomics**, v. 42, n. 2, p. 201–218, 2010b. Disponível em: <<http://physiolgenomics.physiology.org/content/42/2/201.abstract>>.

SANCHES, B. V.; MARINHO, L. S. R.; FILHO, B. D. O.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372–377, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X13001817>>.

SANCHEZ, T.; PH, D.; SEIDLER, E. A.; GARDNER, D. K.; PHIL, D.; NEEDLEMAN, D.; PH, D. Will noninvasive methods surpass invasive for assessing gametes and embryos ? **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 5, p. 730–737, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.10.004>>.

SANDERS, J. R.; SWANN, K. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 152, n. 2, p. R41–R50, 2016.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016. Disponível em:

<[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p300-312\(AR873\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v13/v13n3/p300-312(AR873).pdf)>.

SATHANANTHAN, A. H. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 15, n. 3, p. 129–139, 1998.

SATHANANTHAN, A. H. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: A personal survey. **Micron**, v. 44, n. 1, p. 1–20, 2013.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current biology : CB**, v. 24, n. 10, p. R453-62, maio 2014.

SCHNEIDER, C. S.; ELLINGTON, J. E.; WRIGHT, R. W. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1085–1098, 1999.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F. F.; MARQUES, M. G.; PERES, M. A.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 433–441, 2013.

SIMON, L.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology Review : Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 44, p. 38–56, 2017a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.07.003>>.

SIMON, L.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. Review: Diagnosis and impact of sperm DNA alterations in assisted reproduction. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 44, p. 38–56, 2017b.

SIMON, L.; LIU, L.; MURPHY, K.; GE, S.; HOTALING, J.; ASTON, K. I.; EMERY, B.; CARRELL, D. T. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. **Human Reproduction**, v. 29, n. 5, p. 904–917, 2014.

SOMFAI, T.; INABA, Y.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, S.; KONISHI, K.; IMAI, K. Relationship between the Length of Cell Cycles, Cleavage Pattern and Developmental Competence in Bovine Embryos Generated by in Vitro Fertilization or Parthenogenesis. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 2, p. 200–207, abr. 2010.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D.; SOCIETY., I. E. T. **Manual of the International Embryo Transfer Society : a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures**. Savory, Ill.: International Embryo Transfer Society, 2010.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. 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, n. 8, p. 1129–1141, 2014.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>>.

SUGIMURA, S.; AKAI, T.; HASHIYADA, Y.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; HIRAYAMA, M.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; KOBAYASHI, S.; AIKAWA, Y.; OHTAKE, M.; KOBAYASHI, E.; KONISHI, K.; IMAI, K. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

SUGIMURA, S.; AKAI, T.; IMAI, K. Selection of Viable in Vitro-Fertilized Bovine Embryos Using Time-Lapse Monitoring in Microwell Culture Dishes. **The Journal of reproduction and development**, v. 63, n. 4, p. 353–357, ago. 2017.

SUMANTRI, C.; BOEDIONO, A.; OOE, M.; MURAKAMI, M.; SAHA, S.; SUZUKI, T. The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2, p. 187–195, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432097000523>>.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450278>>.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 1, p. 184–189, 2002.

THUNDATHIL, J. C.; DANCE, A. L.; KASTELIC, J. P. Theriogenology Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. v. 86, p. 397–405, 2016.

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

VAN SOOM, A.; MATEUSEN, B.; LEROY, J.; DE KRUIF, A. Assessment of mammalian embryo quality: What can we learn from embryo morphology? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 6, p. 664–670, 2003.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A. R.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Compaction Rate of in Vitro Fertilized Bovine Embryos Related to the Interval from Insemination to First Cleavage. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 905–919, nov. 1992.

VAN SOOM, A.; VANDAELE, L.; GOOSSENS, K.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L. Gamete origin in relation to early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, n. SUPPL. 1, p. 131–137, 2007.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; DE KRUIF, A. Relationship between Timing of Development, Morula Morphology, and Cell Allocation to Inner Cell Mass and Trophectoderm in in Vitro-Produced Bovine Embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 47, n. 1, p. 47–56, maio 1997.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1691–1703, 2006.

VELKER, B. A. M.; DENOMME, M. M.; MANN, M. R. W. Loss of Genomic Imprinting in Mouse Embryos with Fast Rates of Preimplantation Development in Culture 1. v. 86, n. September 2011, p. 1–16, 2012.

WALE, P. L.; GARDNER, D. K. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 1, p. 2–22, 2016.

WANG, W. H.; DAY, B. N.; WU, G. M. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 4, p. 335–341, 2003.

WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: Work in progress. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1575–1584, 2003.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47–55, 2001.

WDOWIAK, A.; BAKALCZUK, S.; BAKALCZUK, G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. **Reproductive Biology**, v. 15, n. 2, p. 94–100, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.repbio.2015.03.003>>.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. S77–S83, 2007.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2656–2664, 2005. Disponível em: <<http://www.jci.org/cgi/content/abstract/115/10/2656>>.

XU, K. P.; GREVE, T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 127–134, 1988. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/82/1/127.short>>.

YOUNG, S. R. D.; AWARD, I.; SUGIMURA, S.; AKAI, T.; IMAI, K. Selection of viable. v. 63, n. 4, 2017.

ZAKERP, Z.; PENALOZA, C. G.; SMITH, K.; YE, Y.; LOCKSHIN, R. A. What cell death does in development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 59, n. 1–3, p. 11–22, 2015.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M. G. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 253–260, 1999.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between Embryo Development in Vitro and 56-Day Nonreturn Rates of Cows Inseminated with Frozen-Thawed Semen from Dairy Bulls. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 221–231, jul. 1997.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 57–70, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725801001590>>.

.

ANEXO 1

Tabela 3 – Símbolo do gene, código do ensaio TaqMan (Thermofisher®) e nome dos genes usado para a expressão relativa dos transcritos

GENE	CÓDIGO	NOME
ACACA	Bt03213389_m1	Acetyl Coa Carboxylase
ACSL1	Bt03248469_m1	Acyl-Coa Synthetase Long-Chain Family Member 1
ACSL3	Bt04282138_m1	Acyl-Coa Synthetase 3
ACSL6	Bt03231692_m1	Acyl-Coa Synthetase 6
ACTB	Bt03279174_g1	Actin, Beta
ATF4	Bt03221057_m1	Activating Transcription Factor 4
BAX	Bt03211777_g1	Bcl2-Associated X Protein
BCL2	Bt04298952_m1	B-Cell Cll/Lymphoma 2
BID	Bt03241255_m1	Bh3 Interacting Domain Death Agonist
CASP3	Bt03250954_g1	Caspase 3, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CASP9	Bt04282453_m1	Caspase 9, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
CAT	Bt03228713_m1	Catalase
CCND2	Bt03249250_m1	Cyclin D2
CDCA8	Bt03257041_g1	Cell Division Cycle Associated 8
CDK6	Bt04311264_m1	Cyclin-Dependent Kinase 6
CPT1B	Bt03244645_m1	Carnitine Palmitoyltransferase 1B
DDIT3	Bt03251320_g1	Dna-Damage-Inducible Transcript 3
DGAT1	Bt03251719_g1	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1
Dnmt1	Bt03224737_m1	Dna (Cytosine-5)-Methyltransferase 1
Dnmt3A	Bt01027164_m1	Dna (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A
Dnmt3B	Bt03259810_m1	Dna (Cytosine-5)-Methyltransferase 3B
EGFR	AJT96D7	Epidermal Growth Factor - Receptor
ELOVL1	Bt03286627_s1	Elovl Fatty Acid Elongase 1
ELOVL2	Bt03256849_m1	Elovl Fatty Acid Elongase 2
ELOVL3	Bt04311306_g1	Elovl Fatty Acid Elongase 3
ELOVL4	Bt03270721_m1	Elovl Fatty Acid Elongase 4
ELOVL5	Bt03235956_m1	Elovl Fatty Acid Elongase 5
CDH1	Bt03210093_g1	Cadherin 1
FADS2	Bt03256255_g1	Fatty Acid Desaturase 2
FASN	Bt03210485_m1	Fatty Acid Synthase
FOXO3	Bt03649334_s1	Forkhead Box O3
G6PD	Bt03649181_m1	Glucose 6 Phosphate Desidrogenase
GAPDH	Bt03210912_g1	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDF9	Bt03223996_m1	Growth Differentiation Factor 9
GPAM	Bt03210381_m1	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial
GPX1	Bt03259217_g1	Glutathione Peroxidase 1
GPX4	Bt03259611_m1	Glutathione Peroxidase 4
GREM1	Bt03255355_m1	Gremlin 1
GSK3A	Bt03273695_m1	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha
GUCY1B3	Bt03215602_m1	Guanylate Cyclase 1, Soluble, Beta 3
H2AFZ	Bt03216346_g1	H2A Histone Family, Member Z
H3F3A	Bt03278804_g1	H3 Histone, Family 3A
H3F3B	Bt04319377_g1	H3 Histone, Family 3B (H3.3B)
HAND1	Bt04318733_g1	Heart And Neural Crest Cell Derivative 1
HDAC2	Bt03244871_m1	Histone Deacetylase 2
HMBS	Bt03234763_m1	Hydroxymethylbilane Synthase
HP1	Bt03246076_m1	Heterochromatin Protein 1

GENE	CÓDIGO	NOME
HSF1	Bt03249686_m1	Heat Shock Transcription Factor 1
HSP90AA1	Bt03218068_g1	Heat Shock Protein 90Kda Alpha
HSPA1A	Bt03292670_g1	Heat Shock 70Kda Protein 1A
HSPA5	Bt03244880_m1	Glucose-Regulated Protein, 78Kda
HSPD1	Bt04301470_g1	Heat Shock 60Kda Protein 1A
IFNT2/ IFNT3/ IFNT	Bt03210589_g1	Interferon Tau
IGF1R	Bt03649217_m1	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IGFBP2	Bt01040719_m1	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2
IGFBP4	Bt03259500_m1	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 4
KEAP1	Bt03817661_m1	Kelch-Like Ech-Associated Protein 1
ATP5L	Bt03210836_g1	Atp Synthase, H+ Transporting, Mitochondrial Fo Complex Subunit E
LIF	Bt03211910_m1	Leukemia Inhibitory Factor
LPL	Bt03240493_m1	Lipoprotein Lipase
LUM	Bt03211920_m1	Lumican
MAPK1	Bt03216718_g1	Mitogen-Activated Protein Kinase
MORF4L2	Bt03270996_m1	Mortality Factor 4 Like 2
MTIF3	Bt03231844_m1	Mitochondrial Translational Initiation Factor 3
NANOG	Bt03220541_m1	Nanog Homeobox
NDUFA1	Bt03216720_g1	Nadh:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1
NFE2L2	Bt03251880_m1	Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2
NFkB2	Bt03272789_g1	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 2
NOS2	Bt03249597_m1	Nitric Oxide Synthase 2, Inducible
SF3A1	Bt03254301_m1	Splicing Factor 3A Subunit 1
PA2G4	Bt03211241_g1	Proliferation-Associated 2G4
PAF1	Bt03239371_g1	Rna Polymerase Ii Associated Factor
PFKP	Bt04316551_m1	Phosphofructokinase
PGK1	Bt03225854_mH	Phosphoglycerate Kinase 1
PLAC8	Bt03211579_m1	Placenta-Specific 8
POU5F1	Bt03223846_g1	Pou Class 5 Homeobox 1 (Oct4)
PPARA	Bt03220821_m1	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha
PPARG	Bt03217547_m1	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PPARGC1A	Bt01016720_m1	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha
PPIA	Bt03224617_g1	Peptidylprolyl Isomerase A
PRDX1	Bt03223684_m1	Peroxiredoxin-1
PRDX3	Bt03214402_m1	Peroxiredoxin 3
REST	Bt03278318_s1	Re1-Silencing Transcription Factor
RGS2	Bt03246656_g1	Regulator Of G-Protein Signaling 2
SALL4	Bt04298191_g1	Spalt-Like Transcription Factor 4
SCD	Bt04307476_m1	Stearoyl-CoA Desaturase
SLC2A1	Bt03215314_m1	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1
SLC2A3	Bt03259514_g1	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 3
SLC2A4	Bt03215316_m1	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4
SLC2A5	Bt03258296_m1	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose/Fructose Transporter), Member 5
SOD1	Bt03215423_g1	Superoxide Dismutase 1, Soluble
SOD2	Bt03244551_m1	Superoxide Dismutase 2, Mitochondrial

GENE	CÓDIGO	NOME
SOX2	Bt03278318_s1	Sry (Sex Determining Region Y)-Box 2
STAT3	Bt03259871_g1	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
TFAM	Bt03260078_m1	Transcription Factor A, Mitochondrial
XBP1	Bt03227621_g1	X-Box Binding Protein 1

Fonte: Almeida (2018)