

congelamento conforme tratamento anterior (SEG). Os embriões foram mantidos em crioprotetor antes do congelamento por 5-7 min em palhetas de 0,25 ml, reduzindo 0,5°C/min, e a partir de -6°C a -32°C submersos em nitrogênio líquido. Os embriões congelados foram descongelados em contato com o ar (20-25°C) durante 5 segundos e imersos em água a 30°C durante 10 s, então foram lavados em meio Vigro Holding (Vetoquinol) (37°C) durante 15 min antes de serem colocadas em meio de cultura por mais 48 h (dia 9 pós-FIV). Embriões que avançaram um estágio foram considerados sobreviventes. No Dia 9 embriões foram fixadas em metanol frio, lavados em PBS / 0,1% de Tween 20, colocados em 10 µg mL<sup>-1</sup> Hoechst 33342 / glicerol e visualizados sob luz UV para contagem de células. Os dados foram analisados usando o teste de qui quadrado comparando os grupos de tratamento globais e por estágio com  $p < 0,05$  como significativo. Não houve diferença significativa na contagem de sobrevivência e células vivas, em 48 h entre S (72,8%; 119), EG (63,3%; 107), e SEG (51,9%; 123) para as fases combinadas, respectivamente. Curiosamente, a capacidade de sobrevivência para a EB e ExBL foram significativamente maiores em S (85,7; 70,0%) quando comparado com EG (66,7; 55,6%) e SEG (58,6; 25,0%), sem diferença para BL (81,3, 62,5, 68,8%), respectivamente. Estranhamente, CM embriões tiveram uma taxa mais baixa para S em comparação com EG e SEG (47,0, 56,3 e 70,6%, respectivamente), mas devido ao baixo número em todos os tratamentos, a estatística não pôde ser verificada. Os resultados indicam que uma exposição de 2 minutos em solução 0,5 M de sacarose antes de congelamento lento em etileno-glicol, pode não ser benéfico para a sobrevivência dos embriões, e, de fato, pode mesmo ser prejudicial para embriões na fase de EB e ExBL.

**Palavras-chave:** Criopreservação; transferência direta; etilenoglicol

SBTE 233 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1484

#### Uso de forskolin no cultivo *in vitro* de embriões bovinos submetidos à vitrificação

Daniela Moraes Pereira<sup>1</sup>; Mariane Gabriela Cesar Ribeiro Ferreira<sup>1</sup>; Mirela Brochado Souza<sup>2</sup>; Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>; Christopher Junior Tavares Cardoso<sup>3</sup>; Henrique Kischel<sup>1</sup>; Eielton Dias da Silva Arruda<sup>1</sup>; Ana Caroline Bini de Lima<sup>1</sup>; Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>

1. Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; 2. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil; 3. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam maior quantidade de gotas lipídicas em seu citoplasma, fato que tem sido relacionado a sua menor criotolerância. O forskolin é um ativador da adenilato ciclase, que ativa a lipase endógena por meio da cAMP e da proteína quinase, causando lise dos triglicerídeos intracelulares e consequentemente a formação do glicerol. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do forskolin (Sigma-Aldrich®, Corporation, St. Louis, MO), adicionado ao meio de cultivo embrionário sobre a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, ovários bovinos foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em solução salina 0,9% à 37 °C, acrescida de antibiótico. Os folículos foram aspirados e os COCs rastreados e classificados. Em seguida, 1007 Complexos Cumulus Oócitos (COCs) foram maturados *in vitro* por 24 horas. A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada com sêmen da raça Nelore de fertilidade comprovada, previamente preparado em gradiente Percoll®. O período de incubação da FIV foi de 18-22 horas. O cultivo *in vitro* foi realizado em meio SOF por 9 dias. No D5, os embriões foram divididos em dois grupos, sendo: Grupo Controle (GC, grupo cultivado na ausência de forskolin) e Grupo Forskolín (GF, grupo cultivado com 20 µM de forskolin por 24 horas a partir do D5). Todas as etapas da PIVE foram feitas em incubadora a 38,5° C, 5% de CO<sub>2</sub> e máxima umidade. No D7, blastocistos de grau I foram vitrificados de acordo com o protocolo de Kuwayama et al. (2005). O aquecimento foi realizado 1 mês depois e os embriões adicionalmente cultivados por 3 e 24 horas. As variáveis avaliadas foram: taxa de blastocisto em D7, taxa de embriões vitrificáveis em D7 (grau 1) e a taxa de reexpansão em 3 e 24 horas após o aquecimento. Os dados foram submetidos a análise de variância Anova (Programa R), considerando o nível de significância de 5%. A taxa de blastocisto em D7 não foi diferente ( $P > 0,05$ ) entre os grupos (GF 22,71% x GC 25,41%), porém, a taxa de embriões vitrificáveis em D7 foi maior no grupo Forskolín (43,24% x 25%;  $P < 0,05$ ). A taxa de reexpansão após 3 horas de cultivo pós aquecimento foi maior no grupo Forskolín (45% x 24%;  $P < 0,05$ ), porém após 24 horas de cultivo esse efeito deixou de ser observado (GF 55% X GC 56%). Diante disso, sugere-se que a adição de 20 µM de forskolin ao meio de cultivo de embriões bovinos melhora a qualidade e a criotolerância dos blastocistos, diminuindo o tempo de reexpansão após o aquecimento.

**Palavras-chave:** Criopreservação; fertilização *in vitro*; lipólise química

SBTE 234 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1520

#### Desenvolvimento, número de células totais e apoptose em embriões bovinos submetidos à biópsia manual no sétimo dia após a fecundação *in vitro*

Carolina Capobianco Romano Quintão; Clara Slade Oliveira; Célio Freitas; Eliza Diniz de Souza; Jessica Fernanda Souza; Bruna Rios Coelho Alves; Luiz Sérgio de Almeida Camargo  
Embrapa Gado de Leite, Juiz De Fora, MG, Brasil.

Na espécie bovina, a técnica de biópsia embrionária (associada à produção *in vitro* de embriões) é útil para a genotipagem, bem como para o estudo de alterações cromossômicas associadas à sobrevivência do conceito. Em um trabalho anterior (Quintão, C.C.R. et al., Anim. Reprod. 2015), observamos que a biópsia manual realizada no sexto dia (D6) pós FIV não afeta a viabilidade embrionária no D8 (quando embriões foram analisados quanto à viabilidade), porém ainda não há estudos sobre o efeito da biópsia em blastocistos no D7. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da biópsia manual, realizada no D7 pós FIV, no desenvolvimento e na viabilidade de embriões bovinos. Oócitos obtidos de ovários de abatedouro foram maturados e fecundados *in vitro*. No final da FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e cultivados em meio CR2aa suplementado com 2,5% SFB a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> e umidade saturada. No D7 os blastocistos foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos: CON (controle, n=79) e BIO (biópsia, n=78), sendo os embriões BIO seccionados manualmente com microlâminas (Bioniche, Canadá) em gotas de 20 microlitros de meio TALP-HEPES com 2% SFB sob microscópio estereoscópio. Os blastocistos dos dois grupos foram então transferidos para gotas individuais de 20 microlitros de meio CR2aa, e cultivados por 24h (D8) sob as mesmas condições de cultivo supracitadas. No D8 foram avaliadas a expansão da blastocela e a qualidade (IETS, 1998) embrionária. Blastocistos dos grupos CON (n=18) e BIO (n=20) foram, aleatoriamente selecionados e fixados para contagem do número total de células (TOT) e número de células apoptóticas (APO) através da técnica de TUNEL (Promega, EUA). O índice apoptótico foi calculado por APO/TOT. O desenvolvimento embrionário foi analisado pelo teste Qui-quadrado. Os valores de TOT, APO e índices apoptóticos (indicados como média ± EPM) foram submetidas à ANOVA e as médias comparadas pelo teste SNK. Quanto ao desenvolvimento, a taxa de blastocistos com blastocela expandida no D8 foi menor (P<0,01) no grupo BIO (67,9%) em relação ao CON (89,8%), porém não foi evidenciada (P>0,05) diferença na qualidade embrionária, de modo que a proporção de embriões de qualidade 1 e 2 foi de 66,2% (CON) e 56,6% (BIO) e de qualidade 3 foi de 33,8% (CON) e 43,4% (BIO). Foram observadas diferenças (P<0,05) no número de células totais (149,9 ± 6,2 vs 112,8 ± 5,9), apoptóticas (9,6 ± 1,9 vs 16,7 ± 1,8) e no índice apoptótico (6% ± 1 vs 14% ± 1), entre CON e BIO, respectivamente. Conclui-se que a biópsia manual em embriões no D7 interfere no desenvolvimento nas 24h seguintes pós-biópsia, pois apesar de não afetar a qualidade morfológica dos embriões, reduz o número total de células e aumenta o índice apoptótico.

Apoio financeiro: CNPQ, FAPEMIG e EMBRAPA.

**Palavras-chave:** Biópsia; embriões bovinos; FIV

SBTE 235 Biotecnologias de suporte: criopreservação, criobiologia, biologia molecular e “ômicas”

Número de submissão 1526

### **Análise de dados de RNA-seq em um servidor local “galaxy” de ambiente amigável ao usuário, produtivo e reprodutível\***

**Jochen Bick**; Susanne Ulbrich; Stefan Bauersachs

*Eth Zurich, Zurich, Suíça.*

Desde que o sequenciamento de RNA uma enorme quantidade de dados e cada vez mais ferramentas de análises são desenvolvidas, é importante identificar as ferramentas mais acuradas e confiáveis com ajustes ótimos. Para enfrentar este desafio, nós utilizamos um servidor local Galaxy que nos proporciona uma maneira produtiva e reprodutível de analisar a enorme quantidade de dados gerados por projetos de genômica funcional. A maioria das ferramentas para análises NGS compõe linhas de comando em máquinas Linux. Para pesquisadores com formação em biologia, é um grande desafio utilizar estas ferramentas complexas e se familiarizar com o ambiente bio-informático. As ferramentas do Galaxy (Blankenberg et al., Current Protocols in Molecular Biology. ch 19: Unit 19.10.1-21, 2010) utilizam estas linhas de comando e fornecem uma interface gráfica fácil de usar, desejável para usuários sem formação em computação. Adicionalmente, os arquivos criados no Galaxy’s podem ser rastreados e criados fluxogramas de trabalho das análises realizadas. A plataforma Galaxy está aberta na web e foi desenvolvida e introduzida em 2005 nas Universidades do Estado da Pensilvânia e John Hopkins (Giardine et al., Genome Research. v.15, p.1451-5, 2005). Ela foi desenhada para dar acesso fácil aos arquivos de pesquisa (arquivos FastQ, Fasta, anotações nos genomas, tabelas grandes) e fornece também um leque de ferramentas iniciais para análise básica dos dados. Para expandir estes pacotes de ferramentas básicas, é possível instalar ferramentas publicadas na App store (Galaxy Tool Shed - <https://toolshed.g2.bx.psu.edu> ~ 3700 ferramentas diferentes), que auxilia a agrupar ferramentas de uma área de pesquisa específica. Particularmente, o campo de análises de RNA-Seq congrega a maior comunidade desenvolvedora de ferramentas. Como o Galaxy é aberto, é fácil desenvolver e integrar novas ferramentas ao ambiente Galaxy. Além do servidor público do Galaxy <https://usegalaxy.org>, que é mantido pelo time que desenvolveu o Galaxy, também é possível programar um galaxy instalado localmente. Isto garante mais funcionalidade, flexibilidade, independência e confidencialidade se você trabalhar com dados não publicados. Um fluxograma básico para análise de dados de RNA-Seq inclui a verificação da qualidade, filtragem, separação e identificação de adaptadores, seguida de mapeamento para o genoma ou transcriptoma de referência. Finalmente, uma tabela de contagem de reads é gerada baseada em um arquivo com as anotações do gene. Os próximos passos seriam a análise estatística com o pacote BioConductor R como o EdgeR ou DESeq2. Este modelo pode ser colocado em prática em um fluxograma da plataforma Galaxy (sequência de análises utilizando ferramentas em série) é uma característica útil do Galaxy, que pode ser gerada manualmente ou extraída de arquivos pré-existentes e compartilhados no ambiente Galaxy. Uma vez que o usuário fez seu login na interface da web, é possível trabalhar em um ambiente personalizado, no qual