

CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* CULTIVADOS EM MEIO CR2 SUPLEMENTADO COM KNOCKOUT™ SR

Carvalho, B.C.¹; Serapião, R.V.²; Campos Jr., P.H.A.³; Polisseni, J.²; Pereira, M.M.⁴; Alves, B.R.C.²; Oliveira, A.P.¹; Viana, J.H.M.²; Camargo, L.S.A.²; Sá, W.F.²

¹Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig – Juiz de Fora - MG; ²Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora – MG; ³Centro de Ensino Superior – CES – Juiz de Fora – MG; ⁴Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora - MG. bccarvalho.vet@hotmail.com

A suplementação de meios de cultivo com soro fetal bovino (SFB) pode alterar o metabolismo, ultra-estrutura e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*, o que justifica a procura por sistemas de cultivo quimicamente definidos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos fecundados *in vitro* cultivados em presença de SFB ou Knockout® SR (KSR; Gibco Labs., Grand Island, NY). Complexos *cumulus*-oócito obtidos de ovários coletados em matadouro foram maturados e fecundados *in vitro*. Os possíveis zigotos foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos, sendo T1 (n=1355): CR2aa suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e T2 (n=1120): CR2aa suplementado com 10% KSR. Os embriões foram co-cultivados com suas próprias células do *cumulus*, em gotas de 50ml sob óleo mineral. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora a 38,5 °C, com umidade relativa do ar saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A taxa de clivagem foi determinada 72 horas pós-fecundação e a de blastocistos no sétimo dia pós-fecundação. Blastocistos e blastocistos expandidos de graus I e II e com massa celular interna compacta foram selecionados para vitrificação, que foi realizada pela passagem em solução de PBS com 5% de SFB (HM), acrescida de 10% de etilenoglicol (EG) e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO), por um minuto e, posteriormente, em solução de HM acrescida de 20% de EG e 20% DMSO, por vinte segundos. Os embriões foram envasados em OPS (open pulled straws) e imersos em nitrogênio líquido. O reaquecimento foi realizado a 39°C, pela passagem em soluções de HM com concentrações decrescentes de sacarose (0,25M e 0,15M), por cinco minutos em cada uma. Os embriões foram co-cultivados em monocada de células do *cumulus*. A taxa de “re-expansão” foi avaliada com 24 hs de cultivo e a de eclosão com 72 horas. Embriões frescos dos dois tratamentos foram cultivados como grupos controle. Os dados das taxas de clivagem, blastocisto, “re-expansão” e eclosão foram analisadas pelo teste de qui-quadrado. Não houve diferença (P>0,05) nas taxas de clivagem e de blastocistos entre os tratamentos, sendo de 73,6% e 66,9% e de 31,1% e 32,6%, respectivamente, para os tratamentos SFB e KSR. Os embriões reaquecidos cultivados no SFB tiveram maior (P>0,05) taxa de “re-expansão” após 24 horas de cultivo que aqueles cultivados no KSR (53,6%; 37/69 e 12,1%; 7/48, respectivamente). Os embriões frescos do grupo SFB apresentaram maior (P>0,05) taxa de eclosão (87,7%; 64/73), que a dos embriões reaquecidos do grupo SFB (55,1%; 38/69) e a dos embriões frescos do grupo KSR (55,6%; 35/63), que foram semelhantes (P<0,05) entre si. Os embriões reaquecidos do grupo KSR apresentaram a menor (P<0,05) taxa de eclosão (6,9%; 4/58). A suplementação do meio de cultivo com KSR proporcionou taxas semelhantes de clivagem e desenvolvimento embrionário que o meio suplementado com SFB. Por outro lado, a criotolerância dos embriões cultivados na presença de SFB foi maior que os cultivados em meio suplementado com KSR.

CRYOTOLERANCE OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS CULTURED IN CR2 MEDIUM SUPPLEMENTED WITH KNOCKOUT™

The supplementation of culture medium with fetal calf serum (FCS) affects the metabolism, ultra-structure and cryotolerance of *in vitro* produced embryos. This justify the FCS replacement in chemically defined meidiums. The aim of this study was to evaluate the development and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos cultured in the presence of fetal calf serum (FCS) or Knockout® SR (KSR; Gibco Labs., Grand Island, NY). *Cummulus*-oocyte complexes recovered from slaughterhouse ovaries were *in vitro* matured and fertilized. The possible zygotes were randomly allocated in two treatments, T1: CR2aa medium supplemented with 10% FCS (n=1355) and T2: CR2aa medium supplemented with 10% KSR (n=1120). The embryos were co-cultured with *cumulus* cells in 50ml droplets covered by mineral oil. All the steps were conducted in incubator with 38.5 °C, saturated relative humidity and 5% CO₂ atmosphere in air. The cleavage rate was evaluated 72 hours post fertilization and the blastocyst rate on the seventh day post fertilization. Blastocysts and expanded blastocysts of grades I or II with compact inner cell mass were selected for vitrification. The embryos were maintained in holding medium (HM, PBS medium with 5% FCS) added with 10% ethylene glycol (EG) and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) for one minute. Then, the embryos were placed in holding medium added with 20% EG and 20% DMSO, for 20 seconds, immediately loaded in OPS (Open Pulled Straw) and immersed into liquid nitrogen. The warming occurred by the consecutive passage of the embryos in two sucrose solutions in HM (0.25 M e 0.15M), during five minutes each. The warmed and fresh embryos of the two treatments were co-cultured in *cumulus* cells monolayer. The “re-expansion” and the hatching rates were evaluated at 24 and 72 hours of culture. The data was analyzed by chi-square. There were no difference (P>0.05) in the cleavage and blastocyst rates, that were 73.6% and 66.9%; and 31.1% and 32.6%, respectively for the FCS and KSR treatments. The “re-expansion” rate was greater for the FCS vitrified and warmed embryos than for the KSR embryos (53.6%; 37/69 and 12.1%; 7/48, respectively). The FCS fresh embryos had greater (P<0.05) hatching rate (87.7%; 64/73) than the warmed FCS embryos (55.1%; 38/69) or the fresh KSR embryos. The warmed KSR embryos hatching rate was lesser (P<0.05) than that one of the other groups (6.9%; 4/58). The KSR supplement presented cleavage rate and blastocyst rates similar to the FCS group. However, the SFB cultured embryos presented higher cryotolerance than the KSR cultured embryos.