

PERFIL DE LIBERAÇÃO DE INTERFERON-TAU EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* A FRESCO E CRIOPRESERVADO – REVISÃO DE
LITERATURA

INTERFERON-TAU RELEASE PROFILE IN FRESH AND CRYOPRESERVED *IN VITRO*
PRODUCED BOVINE EMBRYOS - LITERATURE REVIEW

Giovana Peres CARDOSO¹; Dayane Colhados CABRINI²; Josiane Caobianco Dias
ZUCOLOTO²; Wanderley Teixeira ZUCOLOTO²; Isabela Bazzo da COSTA³

*1Acadêmica do curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Marília.
Bolsista do Programa de Iniciação Científica: PIIC 2021/UNIMAR. E-mail:
giovanap.cardoso@gmail.com*

*2Colaboradores do Laboratório Central Senepol localizado na Universidade de Marília. E-
mail: dayane.cabrini@hotmail.com; josi@centralsenepol.com; wz@centralsenepol.com*

*3Docente do curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Marília.
Orientadora do Programa de Iniciação Científica: PIIC 2021/UNIMAR. E-mail:
isabelabazzo@hotmail.com*

Resumo

Atualmente o Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking* entre os maiores produtores de carne bovina do mundo, devido ao alto desenvolvimento da pecuária de corte em todo território nacional. Apesar desse avanço, melhorias nos aspectos gerenciais e nos índices zootécnicos e econômicos se fazem necessárias para garantir a manutenção da sua competitividade e consequente permanência como empreendimento economicamente atraente. O desenvolvimento de tecnologias que melhorem a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas é essencial pois podem fomentar uma melhora nos indicadores produtivos e aumentar a oferta de nutrientes. As perdas embrionárias são de grande preocupação nesse contexto se fazendo necessário o conhecimento de todo esse sistema para a melhoria da eficiência reprodutiva dessas matrizes. O interferon tau (IFN- τ) é uma glicoproteína secretada pelo embrião e anexos embrionários no ambiente uterino, responsável pelo reconhecimento materno das fêmeas bovinas nos primeiros 15 a 19 dias da gestação, sendo que até este período as perdas embrionárias são consideradas altas. Acredita-se que novos

estudos envolvendo o IFN- τ serão de grande contribuição para a reprodução e consequentemente à produção animal. Para tanto, foi realizada uma revisão de literatura para compreender a relação entre o perfil de liberação de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* a fresco e criopreservado, buscando assim compreender os motivos e as possíveis soluções diante da comparação sugerida. O método de pesquisa aplicado foi a revisão bibliográfica, estando entre os materiais utilizados artigos científicos, periódicos e livros. Observamos que há inúmeros obstáculos enfrentados na técnica de criopreservação a fim de que ela garanta a liberação de interferon-tau pelo embrião, entre os problemas encontrados pela literatura estão: lesões ou alterações bioquímicas em decorrência da formação de cristais de gelo dentro e fora das células, efeitos osmóticos dos crioprotetores, qualidade inferior dos embriões por conta de modificações na sua ultraestrutura. Por fim, há diversos outros fatores como alterações nas microvilosidades, alta porcentagem de lipídios nas células, menor justaposição das células do mesoderma e do trofoblasto e diferenças na composição da zona pelúcida que resultam nessa deficiência. Outrossim, é importante estar atento ao estresse oxidativo no embrião que pode interferir na liberação do interferon-tau. A temática é relevante para comunidade científica como também para o desenvolvimento pecuário e carece de mais pesquisas a fim de se ajustar tais questões.

Palavras-chave: Bovino. Embrião. Intérferon tau. Criopreservação.

Abstract

Currently, Brazil occupies the first place in the ranking among the largest beef producers in the world, due to the high development of beef cattle throughout the national territory. Despite this advance, improvements in management aspects and in the zootechnical and economic indices are necessary to guarantee the maintenance of its competitiveness and consequent permanence as an economically attractive enterprise. The development of technologies that improve the reproductive efficiency of bovine females is essential as they can promote an improvement in productive indicators and increase the supply of nutrients. Embryo losses are of great concern in this context, making it necessary to know this entire system to improve the reproductive efficiency of these matrices. Interferon tau (IFN- τ) is a glycoprotein secreted by the embryo and embryonic attachments

in the uterine environment, responsible for maternal recognition of bovine females in the first 15 to 19 days of gestation, and until this period embryonic losses are considered high. It is believed that new studies involving IFN- τ will be of great contribution to reproduction and consequently to animal production. For this purpose, a review of the scientific and current literature was carried out in order to understand the relationship between the interferon-tau release profile in fresh and cryopreserved *in vitro* produced bovine embryos, thus seeking to understand the reasons and possible solutions for the comparison performed. The research method applied was the bibliographic review, with scientific articles, journals and books being among the materials used. We observed that there are numerous obstacles faced in the cryopreservation technique in order to guarantee the release of interferon-tau by the embryo, among the problems found in the literature are: lesions or biochemical alterations due to the formation of ice crystals inside and outside the cells, osmotic effects of cryoprotectants, inferior quality of embryos due to changes in their ultrastructure. Finally, there are several other factors such as changes in microvilli, high percentage of lipids in cells, less juxtaposition of mesoderm and trophoblast cells, and difference in zona pellucida composition that result in this deficiency. Furthermore, it is important to be aware of oxidative stress in the embryo that can interfere with the release of interferon-tau. The theme is relevant for the scientific community as well as for livestock development and needs more research in order to adjust these issues.

Keywords: Bovine. Embryo. interferon tau. cryopreservation.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a pecuária de corte se consolidou nos últimos anos como importante produtora de alimentos e conseqüentemente se inseriu no mercado mundial como grande competidor, ocupando o primeiro lugar no ranking entre os maiores produtores. Essa atividade transformou-se também em fator importante na captação de divisas para nosso país, mas de certa forma nos fez passar por constantes pressões resultantes da posição ocupada. Apesar desse avanço, melhorias nos aspectos gerenciais e nos índices zootécnicos e econômicos se fazem necessárias para garantir a manutenção da sua competitividade e conseqüente permanência como empreendimento economicamente atraente (Filho, 2013).

O desenvolvimento de tecnologias que melhorem a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas é essencial, pois podem fomentar uma melhora nos indicadores produtivos e

aumentar a oferta de nutrientes de alta qualidade a menores custos para a população humana. O estudo e progresso das biotecnologias reprodutivas repercutem em vantagens econômicas diante da capacidade de crescimento de descendentes de animais com genética superior ou mesmo para impedir a reprodução genética desfavorável. Assim, as tecnologias reprodutivas foram otimizadas para possibilitar maiores e melhores alternativas de reprodução o que resulta em diversas vantagens na área de produção da pecuária brasileira (Rodrigues, 2019).

Por isso, o aprimoramento das técnicas e estudos sobre a efetividade reprodutiva das fêmeas é essencial para atingir bons índices na reprodução e consequentemente na produção animal.

Durante a gestação, o reconhecimento materno ocorre em média entre os dias 15 a 19 após a fertilização. Esse fato estabelece um dos principais desafios biológicos para a obtenção de índices reprodutivos satisfatórios em bovinos, devido às perdas embrionárias acontecerem com maior frequência até estes dias. Uma glicoproteína secretada pelo embrião e pelos anexos embrionários no ambiente uterino, denominada de interferon-tau (IFN- τ) bloqueia a secreção pulsátil de prostaglandina F₂alfa (PGF₂ α) pelo endométrio, mantendo a secreção de progesterona pelo corpo lúteo e o estabelecimento da prenhez. Contudo, os mecanismos pelos quais o IFN- τ impede a quebra do corpo lúteo ainda não foram suficientemente esclarecidos em fêmeas bovinas (Marques et al., 2007).

Quanto a expressão gênica do IFN- τ , Yao e colaboradores (2009) a detectaram a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário *in vitro* e sua sinalização já a partir do sétimo dia. O início da expressão do IFN- τ ocorre por uma programação genética independente do ambiente uterino, visto que essa glicoproteína já se mostrou expressa em condições *in vivo* e *in vitro*. No entanto, sabe-se que sua expressão é alterada pelo útero, já que nas condições *in vitro*, é aumentada na presença do endométrio e ainda maior até a implantação.

Entre as biotecnologias existentes no mercado, a produção *in vitro* (PIV) é bastante utilizada, sendo que logo após a PIV esses embriões podem ser inseminados a fresco nas fêmeas bovinas em até algumas horas, através do seu envase em uma palheta, outra opção é a realização do congelamento desses embriões através do protocolo de criopreservação (Pazzim, 2021).

Dentre os protocolos de obtenção de embriões bovinos produzidos *in vitro*, a utilização de embriões criopreservados é uma forma de assegurar melhor aproveitamento da fertilização, permitindo maior utilização, principalmente quando não se dispõe de muitas fêmeas para serem usadas como receptoras, a principal vantagem desse método é o

armazenamento de embriões a longo prazo o que possibilita utiliza-los nos momentos ideais, seja pela disposição de receptoras, como também diminui a demanda de mover o gado, além do mais isso possibilita um ambiente eficaz de mercado de genética, inclusive propiciando uma atividade comercial global da genética bovina (Hoper, 2015).

No entanto, o congelamento de embriões produzidos *in vitro* apresentam particularidades quanto à sua morfologia e capacidade de desenvolvimento reduzida em relação aos embriões formados *in vivo*, capazes de comprometer o desenvolvimento do concepto e a secreção de fatores fundamentais para o reconhecimento materno da gestação. Essa pode ser uma das principais causas de morte embrionária nas primeiras semanas de desenvolvimento do embrião (Araújo et al., 2005).

Com todos esses conhecimentos obtidos e diante da busca bibliográfica realizada, levantaram-se alguns questionamentos sobre o assunto e despontam as seguintes hipóteses que fundamentam o presente trabalho: qual a relação entre o perfil de liberação de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* a fresco e aqueles submetidos a criopreservação? E ainda, o que justifica essa diferença encontrada e quais os possíveis recursos para direcionar essas questões?

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo geral revisar as literaturas científicas e atuais para compreender a relação entre o perfil de liberação de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* a fresco e criopreservado. E dentro dos objetivos específicos buscou-se avaliar os motivos e as soluções da comparação realizada.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho utilizou como método de pesquisa a revisão bibliográfica, estando entre os materiais utilizados artigos científicos, periódicos e livros. Segundo Mertens, 2005:

A revisão da literatura implica detectar, consultar e obter a bibliografia (referências) e outros materiais úteis para os propósitos do estudo, dos quais temos de extrair e recompilar a informação relevante e necessária para delimitar nosso problema de pesquisa. Essa revisão deve ser seletiva, porque todo ano em diversas partes do mundo são publicados milhares de artigos em revistas acadêmicas, periódicos, livros e outros tipos de materiais nas diferentes áreas do

conhecimento. Se quando revisamos a literatura descobrimos que na área de interesse existem 5.000 possíveis referências, é evidente que devemos selecionar apenas as mais importantes e recentes e que também estejam diretamente ligadas à nossa formulação do problema de pesquisa. Às vezes, revisamos referências de estudos tanto quantitativos como qualitativos, independentemente do nosso enfoque, porque estão muito relacionadas com nossos objetivos e perguntas.

Entre os objetivos da revisão de literatura está o de compreender e identificar o referencial teórico e se as literaturas revisadas oferecem uma resposta para a pesquisa realizada. Além do mais ela deve também propor um sentido a ser traçado na elaboração do trabalho (Danhke, 1989).

As bibliografias encontradas sobre o assunto principal do trabalho ainda são poucas e dentre elas a maioria possui bastante especificidade o que reforça a necessidade e o propósito dessa pesquisa e de outras mais. Outrossim, o referencial teórico deste trabalho é obtido através das revisões selecionadas e apresentam retorno sobre as indagações feitas.

Foram utilizados artigos científicos, periódicos e livros, sempre que possível nas versões e publicações mais recentes, sendo a bibliografia mais antiga empregada uma de 2005 e a mais recente de 2022, criando um intervalo de dezessete anos de estudos abrangendo o tema.

Como ferramenta de busca foram utilizadas bibliotecas físicas e virtuais, portais de artigos acadêmicos e plataformas de busca confiáveis, como o Google Acadêmico e ScieELO. Outro instrumento de pesquisa operado se dá através da inserção das palavras chaves do trabalho visando criar uma maior seletividade de bibliografias procuradas.

Desta forma, foram examinadas literaturas que se relacionassem com o trabalho não só pelo assunto de modo geral, mas principalmente que se aliassem ao seu objetivo ou hipóteses.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biotecnologia relativa à produção *in vitro* de embriões caracteriza-se pela seleção de doadoras que terão os folículos avaliados e qualificados por meio de exame ultrassonográfico dos ovários com foco no melhoramento genético a fim de garantir o sucesso do procedimento.

Realizada a qualificação dos folículos, será iniciado protocolo hormonal, caso necessário, ou agendada a aspiração folicular, que é realizada com a utilização de uma agulha 18G conectada a uma linha de aspiração e bomba a vácuo com pressão de 76 mmHg em média e vazão de 15ml de meio por minuto. A aspiração é guiada por ultrassom com transdutor micro convexo acoplado à guia de biopsia inserida até o fundo vaginal (Leivas apud Silva *et al*, 2017).



Figura 1. Em A, demonstração dos equipamentos utilizados durante a aspiração folicular, além da contenção adequada. Em B, procedimento de aspiração folicular e seu posicionamento correto. Silva 2017.

Uma vez finalizada a aspiração, o conteúdo obtido é depositado na parede do filtro coletor para FIV WTA em contato com a solução utilizada na aspiração consistente no DPBS aquecido a 38°C a fim de remover a sujidade e excesso de líquido para facilitar o processo de seleção dos oócitos, que são colocados em placas de Petri, onde são observados com estereomicroscópio e feito novo depósito em gota de meio lavagem para, posteriormente, passar por varredura completa e nova gota de lavagem, sendo realizada a contagem e classificação de qualidade dos oócitos (Silva *et al*, 2017).

Somente os oócitos classificados como viáveis, ou seja, que apresentam citoplasma homogêneo coberto por uma camada completa ou por mais camadas de células do cumulus divididas em grau I, II e III (Gonçalves, 2007), são transferidos para tubos falcon de poliestireno contendo meio de maturação (TMC 199 Bicarbonato, suplementado com SFB, hCG, estradiol, piruvato e amicacina) em atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂, sendo identificados pelo número da doadora e quantidade de oócitos, vedados com rolhas e transportados em um transportador TO-WTA sob a temperatura média de 36°C (Renesto e Coelho apud Silva *et al*, 2017).

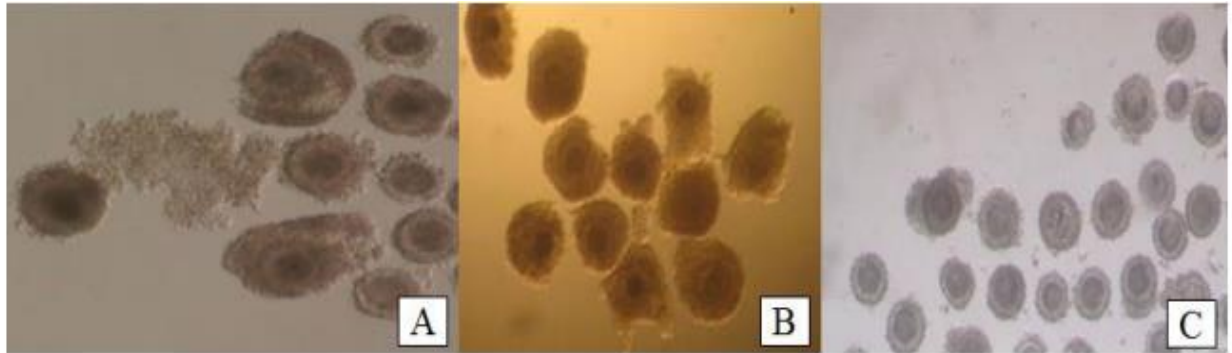


Figura 2. Demonstração de oócitos viáveis. A - Oócito de Grau I. B - Oócitos Grau II. E em C, Oócitos Grau III. Silva, 2017.

A maturação ocorrida no núcleo e citoplasma é necessária para a produção *in vitro* do embrião pois compreende a alteração estrutural e bioquímica do oócito que torna gameta feminino apto a passar pelo processo de fecundação e desenvolvimento embrionário satisfatório (Palma *et al*, 2001).



Figura 3. Etapas da maturação do núcleo celular. Oliveira, 2014.

Cabe destacar, que a exposição ao calor que geram estresse térmico em bovinos fêmeas irão alterar a qualidade de maturação dos oócitos, tornando-os inferiores, isto conseqüentemente irá repercutir no desenvolvimento dos embriões. O efeito do estresse térmico atinge além das funções dos oócitos mas também as células do *cumulus*, visto que, reduz a produção de enzimas como a hialuronidase e a metaloproteinase (Amaral, 2019).

Assim, Gouveia (2011) explica que os oócitos são transferidos a placas de Petri em microgotas de 100 µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral, permanecendo incubados a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada em estufa durante o período de 22 a 26 horas, tão logo chegam em laboratório.

Por sua vez, Gouveia (2011) explicita que a capacitação e seleção espermática é realizada com a utilização do método Percoll ou lavagem convencional com a finalidade de remover espermatozoides mortos, substâncias tóxicas e crioprotetores, bem como recuperar a maioria dos espermatozoides móveis sem alterá-los.

O procedimento segue para a fecundação *in vitro* em que o oócito maturado e o sêmen capacitado são colocados em placa de Petri onde ficam por um período de 18 a 24 horas em incubadora a 38,5°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Perine, 2007).

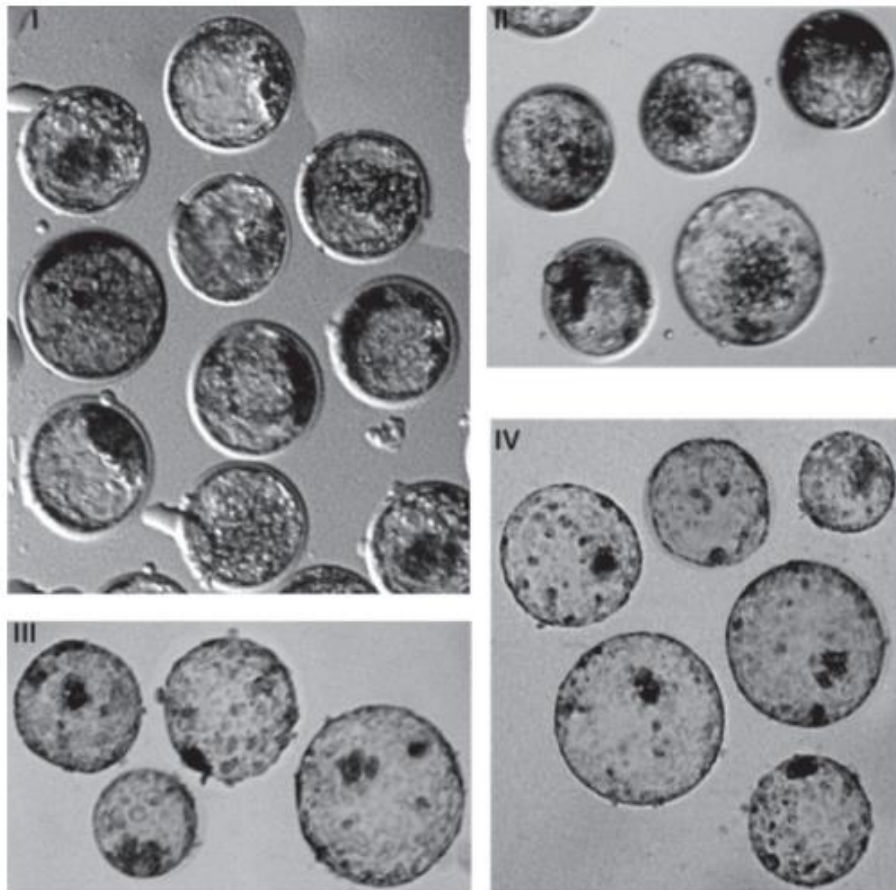


Figura 4. Blastocistos produzidos *in vitro*, dias 7 (I e II) e 9 (III e IV) após a fecundação. Em I e II existem blastocistos e blastocistos expandidos. Já nas figuras III e IV é possível observar blastocistos eclodidos. Oliveira, 2014.

Com o início da fecundação no momento em que espermatozoide penetra as diferentes capas que permeiam o oócito e formam pró-núcleos (Palma *et al*, 2001), sendo submetido ao processo de desnudamento mediante a lavagem a fim de remover as células do cumulus com solução baseada nos fluídos uterinos e do oviduto durante a gestação, conforme Antonioli (2005), e transferidos para nova placa de Petri onde permanecem por 07 (sete) dias até o envase dos embriões que alcançarem ao menos o estágio blastocisto inicial caracterizada pela formação da blastocele e possibilidade de diferenciação do trofoblasto e botão embrionário.

Concluída a fase de cultivo *in vitro*, os embriões fecundados podem ser prontamente transferidos às receptoras selecionadas previamente com base na taxa de concepção e excelência do animal que deve apresentar boa condição corporal, nenhuma patologia reprodutiva e ciclagem regular após o início do protocolo hormonal de sincronização (Silva *et al*, 2017).

Contudo, a demanda alimentícia por carnes bovina e laticínios exige eficiência maior na produção de gados de corte e produtores de leite para suprir as necessidades da sociedade, é facilitada pelo procedimento de criopreservação que possibilita a criação de um banco de embriões de alta qualidade por longos períodos de tempo e, conseqüentemente, simplifica a movimentação de material genético e manejo de transferências.

Na criopreservação, o material biológico é estocado em nitrogênio líquido a -196°C ou vaporizado a -150°C o que induz a célula a um estado de dormência metabólica, mantendo-se estável por período maior de tempo (Lima, 2011).

A criopreservação pode ser realizada com a utilização de duas técnicas diferentes: o congelamento lento ou método tradicional e a vitrificação.

No congelamento lento, a utilização de crioprotetores é reduzida, bem como a taxa de resfriamento que se limita a 0,3 a 2°C por minuto (Saragusty & Arav, 2011), o que acarreta a formação de cristais de gelo, segundo Boité (2008), e isto é considerado determinante na diminuição da liberação de interferon-tau, como será exposto em momento oportuno.

De outro lado, a vitrificação expõe os embriões a altas quantidades de crioprotetores e alta taxa de resfriamento de 2500°C por minuto (Palasz e Mapletoft, 1996), o que resulta na formação de uma estrutura que se assemelha ao vidro em decorrência da utilização de fluído que traz viscosidade ao material durante o resfriamento, o que impede a formação de cristais de gelo (Bautista e Kanagawa, 1998), porém causa preocupação pelo potencial de toxicidade do método para as células.

Após a transferência de embriões com o início da gestação, o reconhecimento materno deve ocorrer entre 15 e 19 dias após a implantação quando o conceito sinaliza a sua presença à unidade materna, que acontece concomitantemente com o alongamento do embrião associado à máxima produção de interferon-tau, uma glicoproteína secretada pelas células do trofoblasto do conceito (embrião e pelos anexos embrionários) no ambiente uterino (Destro *et al*, 2014).

O interferon-tau tem a função primordial de evitar o retorno à ciclicidade, pois age de maneira parácrina com a inibição da expressão dos receptores de estrógeno e de ocitocina no epitélio luminal do endométrio, o que bloqueia a secreção pulsátil de prostaglandina F2alfa (PGF2 α) pelo endométrio, mantendo a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, com a preservação deste e, como consequência, causa o impedimento da luteólise, o que assegura o estabelecimento da prenhez (Destro *et al*, 2014).

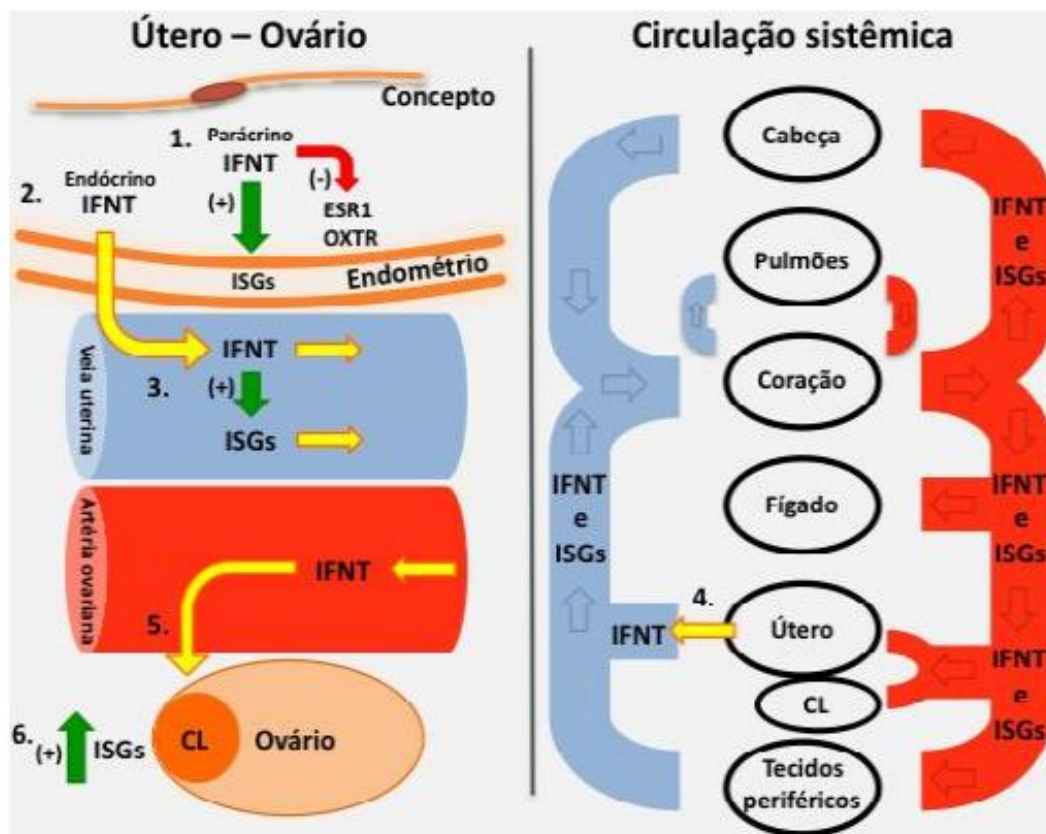


Figura 5. Esquematização da ação parácrina e endócrina do interferon-tau a partir do útero e circulação sistêmica. Em 1, a ação parácrina do interferon-tau produzido pelo embrião impede a transcrição de receptores de estrógeno e de ocitocina (ESR1 e OXTR) no endométrio e influencia a transcrição de genes estimulados por interferons (ISGs). Na sequência (2), o interferon-tau produzido pelo conceito é liberado na veia uterina e isto faz com que em 3, haja o estímulo

da síntese de ISGs no sangue (leucócitos). Assim, o interferon-tau atinge a circulação sistêmica a partir da sua saída pela veia uterina (4). E, em 5, retorna à periferia, ao útero e aos ovários (corpo lúteo) pela circulação sistêmica. Por fim (6), a influência de interferon-tau no corpo lúteo estimula síntese de ISGs. Antoniazzi, 2011.

Isso porque há formação de glândula endócrina temporária denominada corpo lúteo durante a ovulação, cuja função é secretar o hormônio responsável pela regulação da ciclicidade ovariana, estabelecimento e manutenção da gestação, a progesterona, sendo que, uma vez não detectado embrião, o corpo lúteo regride espontaneamente para o início de um novo ciclo estral como resultado da secreção pulsátil de prostaglandina pelo endométrio, em fenômeno nomeado luteólise (Destro *et al*, 2014).

Contudo, como resultado da criopreservação dos embriões, foi constatada a morte embrionário precoce pela redução da liberação de IFN- τ que acarreta na luteólise.

Em estudo realizado, Araújo *et al* (2005) verificou a redução da liberação de IFN- τ pelos embriões produzidos *in vitro* que se submeteram ao processo de criopreservação quando comparados aos embriões frescos.

O método utilizado para a obtenção do resultado foi a titulação de IFN- τ em embriões produzidos *in vitro*, após o processo de maturação de oócitos que apresentavam citoplasma homogêneo, além de três ou mais camada de células do *cumulus oophorus* coletados dos ovários de vacas em matadouros, fertilizados com sêmen de touro da raça holandesa (Araújo, 2005).

Os blastócitos que apresentavam graus I e II no sétimo dia de fertilização foram divididos e submetidos aos dois tipos de tratamento, quais sejam: embriões frescos cultivados em meio Glasgow BHK21 (controle) e tratamento, e embriões criopreservados, descongelados e cultivados em meio Glasgow BHK21 (Araújo, 2005).

O congelamento foi realizado mediante a desidratação com etilenoglicol (1,8M), envasados em palhetas de 0,25ml e congelados em aparelho freezer control CL-863 configurado para o programa zero para, posteriormente, as palhetes serem submersas em nitrogênio líquido a -196°C onde permaneceram armazenadas até o descongelamento efetivado com a colocação em placa escavada e lavados em PBS+0,4% BSA e em meio Glasgow BHK21²+10% SFB (Araújo *et al*, 2004)

A titulação de IFN- τ foi realizada por meio de ensaio antiviral como indicativo da secreção, com a utilização de células *Madin Darby bovine kidney* e vírus da estomatite

vesicular com o título de 10^{-7} (Araújo, 2005), uma vez que a glicoproteína apresenta atividade antiviral, o que simplifica o procedimento consistente em mensurar a habilidade de preparações do interferon-tau protegerem células dos efeitos citotóxicos dos vírus (Binelli, 2007).

Assim, a avaliação de IFN- τ presente em cada amostra foi verificada por meio de titulação indireta em que o título representa a recíproca da diluição responsável pela redução do efeito citopático do vírus em 50% em comparação ao controle do vírus (Araújo, 2005).

Com a titulação, observou-se que a média dos quadrados mínimos dos títulos de IFN- τ foi menor nos embriões criopreservados antes do cultivo em relação aos embriões não-criopreservados.

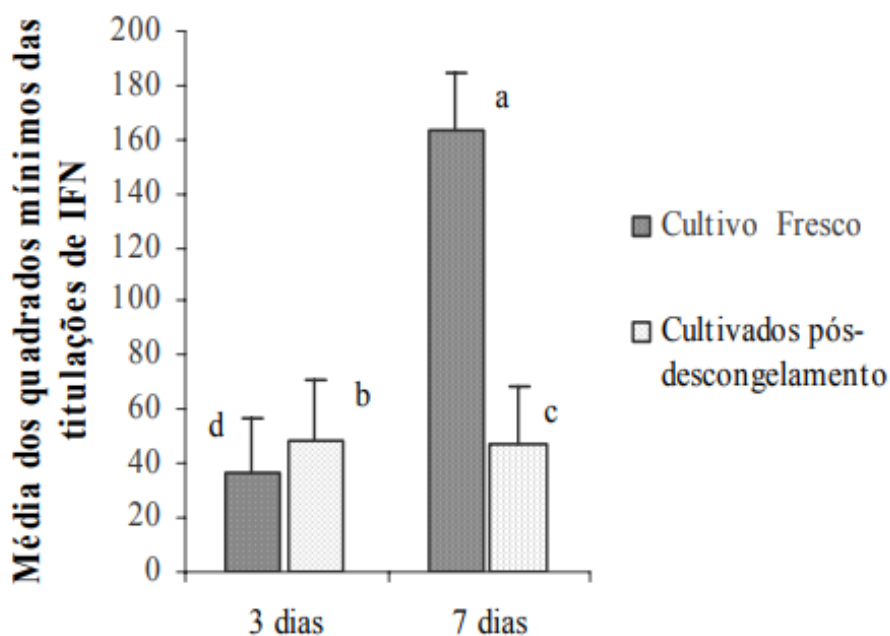


Figura 6. A média dos quadrados mínimos das titulações de IFN no cultivo fresco e no cultivado pós-descongelamento, aos 3 e 7 dias. Araújo, 2005.

Na concepção de Stojkovic *et al* (1995) e Lonergan *et al* (2003), a diminuição na secreção de IFN- τ decorre de lesões ou alterações bioquímicas no embrião ocorridas durante o processo de criopreservação em razão da formação de cristais de gelo dentro e fora das células, além dos efeitos osmóticos dos crioprotetores, que tornam as células trofoblásticas inviáveis e incapazes de emitir sinais de reconhecimento materno da gestação por afetarem a integridade das membranas das organelas, da membrana celular e do núcleo, o que compromete a capacidade de liberação da glicoproteína (Kristina *et al*, 2001).

Outras pesquisas atribuem a redução da secreção de IFN- τ e a menor qualidade dos embriões à alteração na ultraestrutura pelo processo de criopreservação responsável pela fragmentação da membrana nuclear e interferência no DNA que, por sua vez, torna deficitária a expressão do gene que codifica a expressão do IFN- τ (Wiemer et al, 1995)

A maior sensibilidade dos embriões maturados e produzidos *in vitro* (PIVE) à criopreservação foi discutida por Vajta *et al* (1996) e Kaid *et al* (1999), sendo atribuída a diversos fatores como alterações nas microvilosidades, alta porcentagem de lipídios nas células, menor justaposição das células do mesoderma e do trofoblasto e diferença na composição da zona pelúcida (Pollard e Leibo, 1994; Massip *et al*, 1995; Thompson, 1997).

Outrossim, o estresse térmico leva ao estresse oxidativo, isto pode se dar pelo frio, como observado na análise sobre criopreservação, mas também ocorre pelo estresse por calor que irá formar excesso de espécies reativas de oxigênio, fazendo com que haja desequilíbrio na capacidade do sistema antioxidante (Amaral, 2019).

Em relação ao estresse oxidativo sofrido pelos embriões ele se dá quando não há equilíbrio entre os meios oxidativos e as proteções antioxidantes presentes nas células, quando ocorre o exagero de espécies reativas de oxigênio. Isto pode fazer com que o embrião nem chegue a se desenvolver ou caso evolua pode apresentar distúrbio deletérios mutagênicos ou ainda teratogênicos. Por isso, marcadores e quantificadores de estresse oxidativo nas etapas na produção *in vitro* são importantes a fim de que através do uso de antioxidantes não enzimáticos em meios de maturação, fertilização e cultivo de embriões esses efeitos degenerantes sejam neutralizados (Weigert, 2022).

CONCLUSÃO

Conclui-se no presente trabalho, a importância das biotecnologias reprodutivas, especialmente para o setor pecuário brasileiro. Dentro disso é essencial que as técnicas sejam cada vez mais aprimoradas para que haja maior efetividade na reprodução. Isto implica em garantir que as gestações bovinas se desenvolvam e um fator determinante para isso é o perfil de liberação de interferon-tau em embriões.

Dentro das técnicas de reprodução, a criopreservação de embriões traz diversas vantagens, principalmente de logística. No entanto existe ainda obstáculo da redução de liberação de interferon-tau quando utilizada está técnica.

A literatura aponta como possíveis motivos dessa ocorrência: as lesões ou alterações bioquímicas ocorridas durante o procedimento por conta da formação de cristais de gelo dentro e fora das células, ou ainda os efeitos osmóticos dos crioprotetores que interferem nas

membranas das organelas, da membrana celular e do núcleo que comprometem a capacidade de liberação da glicoproteína pelas células trofoblásticas, ou mesmo pela qualidade inferior dos embriões por conta de modificações na sua ultraestrutura.

Por fim, há vários fatores como alterações nas microvilosidades, alta porcentagem de lipídios nas células, menor justaposição das células do mesoderma e do trofoblasto e diferença na composição da zona pelúcida que podem resultar nessa deficiência. Além do mais, é importante atentar-se ao estresse oxidativo que o embrião está suscetível e que irá interferir do mesmo modo.

A despeito da relevância do tema, ainda há poucas pesquisas enfrentando esses questionamentos e buscando alternativas para que esses índices sejam superados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, Carolina dos Santos et al. **Influência do estresse térmico na produção de interferon tau e no estresse oxidativo de embriões bovinos produzidos in vitro**. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Manancial – Repositório digital da UFSM. Santa Maria, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/16309>>.

ANTONIAZZI, Alfredo Quites et al. **Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes**. Ciência Rural [online]. 2011, v. 41, n. 1, pp. 176-185. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100029>>. Epub 06 Jan 2011. ISSN 1678-4596.

ARAÚJO, M.C.C; VALE FILHO, V.R.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; BARRETO FILHO, J.B.; CAMARGO, L.S.A; SERAPIÃO, R.V.; SILVA, M.V.G.B. **Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos in vitro frescos e congelados**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, n.6, p.751-756, 2005.

FILHO, K.E. **Cenários para a cadeia produtiva da carne bovina no Brasil**. Embrapa Gado de Corte, 2013.

HOPPER, R. M. **Bovine Reproduction**. Wiley Blackwell, Capítulo 78, p. 723-733, 2015.

MARQUES, V.B.; BERTAN, C.M.; ALMEIDA, A.B.; MEIRELLES, F.V.; PAPA, P.C.; BINELLI, M. **Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.4, p.479-488, out./dez, 2007.

OLIVEIRA, G. A.; SARAPIÃO, Raquel Varella; QUINTÃO, Carolina Capobianco Romano. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**. 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014.

PAZZIM, Letícia Vieira Lipert et al. **Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura**. Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2021.

RODRIGUES, José Luiz; BERTOLINI, Marcelo. **Biotechnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica**. Rev. Bras. Reprod. Anim, v. 43, n. 2, p. 204-208, 2019.

SAMPIERI, Roberto H.; COLLADO, Carlos F.; LUCIO, María del Pilar B. **Metodologia de Pesquisa**. Porto Alegre: Grupo A, 2013. 9788565848367. Disponível em: <<https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788565848367/>>. Acesso em: 27 abr. 2022.

SILVA, Roberta Reis; VULVANIL, Valcinir Aloísio Scalla; CAMARGOS, Aline Sousa; COSTA, Uadila Rabelo da; DUTRA, Mateus Monteiro; CHIARI, José Renato. **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte**. Colloquium Agrariae, vol. 13, n. Especial, Jan–Jun, 2017, p. 402-415 ISSN: 1809-8215. DOI: 10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244. Universidade Federal de Goiânia, 2017.

YAO, N.; WAN, P.C.; HAO, Z.D.; GAO, F.F.; YANG, L.; CUI, M.S.; WU, Y.; LIU, J.H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S.M. **Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures**. Reproduction in domestic animals. Zuchthygiene 44, 132-139, 2009.

WEIGERT, Jean Mussoi et al. **Alcalóides pirrolizidínicos do Senecio SPP. modulam a expressão gênica de interferon tau e de genes do estresse oxidativo em embriões bovinos produzidos in vitro.** Manancial – Repositório digital da UFSM. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Santa Maria, 2022. Disponível em: <<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/24437>>.