

## **Controle de Qualidade de Meios para Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos por “Fingerprint” Utilizando Espectrometria de Massas com Infusão por Nano-Eletrospray com Chip**

Christina Ramires Ferrreira<sup>1</sup>; Gustavo Henrique Martins Ferreira Souza<sup>2</sup>; Maria Francesca Riccio Fonsêca<sup>2</sup>; Gustavo Braga Sanvido<sup>2</sup>; Andrea Cristina Basso<sup>1</sup>; José Henrique Fortes Pontes<sup>1</sup>; José Carlos Ereno Júnior<sup>1</sup>; Marcos Nogueira Eberlin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim-SP, Brasil;* <sup>2</sup>*Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas - Unicamp, Campinas-SP, Brasil.*

### **INTRODUÇÃO**

Na rotina de um laboratório de produção *in vitro* (PIV) de embriões, os meios utilizados são fundamentais para assegurar o sucesso do processo, já que as condições de PIV interferem diretamente nas taxas de desenvolvimento e implantação embrionária. Na PIV comercial, a alteração da qualidade dos meios por degradação de reagentes ou falha humana pode causar extensos prejuízos econômicos. Os meios produzidos pela empresas de PIV geralmente têm validade de uma a duas semanas. Como o teste de PIV dura 8 dias, o tempo hábil permite somente o controle de pH e da osmolaridade antes da utilização dos meios como forma de controle de qualidade (CQ).

Os métodos de CQ dos meios para PIV de embriões na área comercial de reprodução humana geralmente envolvem, além da a avaliação do pH e da osmolaridade, a quantificação de endotoxinas e o “mouse embryo assay” ou MEA.

Entretanto, na literatura da área de reprodução assistida em humanos, discute-se a necessidade do desenvolvimento de sistemas abrangentes e rápidos de CQ dos meios para produção de embriões. Além do tempo dispensado, do custo e da mão-de-obra necessária para o MEA, a sensibilidade desse método é discutida, e indica-se que seja associado a outras formas de avaliação (Fleetham *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1993).

Buscando uma solução para o problemas relacionados acima, a empresa In Vitro Brasil Ltda. associou-se à equipe do Laboratório ThoMSON de

Espectrometria de Massas (IQ-UNICAMP) para propor uma forma de CQ rápido, simples e abrangente, capaz de detectar variações mínimas na composição dos meios de PIV bovina, com o uso da técnica de espectrometria de massas (MS).

A MS é uma técnica analítica utilizada na identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, verificação das propriedades químicas de moléculas e quantificação de compostos conhecidos. O espectrômetro de massas pode também fornecer a “impressão digital” das espécies moleculares presentes em uma mistura complexa para caracterização do mesmo ou para comparação em banco de dados, confirmando a sua identidade.

Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi utilizar a técnica de “fingerprint” por MS, com processamento mínimo de amostra, para diferenciar e avaliar a estabilidade dos meios utilizados na PIV de bovinos, estocados a 4°C por um período de 6 semanas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados quatro meios distintos, empregados no processo de PIV de embriões bovinos: o meio de maturação *in vitro* (MIV), o meio de fertilização *in vitro* (FIV), o meio de cultivo “Synthetic Oviduct Fluid” (SOF), e o meio de transporte de embriões “Synthetic Oviduct Fluid” tamponado com HEPES (HSOF). Foram avaliadas 5 partidas distintas de meios, com períodos variados de armazenamento: uma partida de meio recém-produzido (Meio fresco), uma partida armazenada durante duas semanas (Meio 2-SEM) e partidas armazenadas durante quatro, cinco e seis semanas (Meio 4-SEM, 5-SEM e 6-SEM). Alíquotas dos meios foram diluídas 100 vezes em água ultrapura e distribuídas em placas de 96 poços (volume de 100µL em cada poço). A placa contendo as amostras diluídas foi introduzida na fonte de ionização ESI-chip Triversa Mandrel NanoMate 100 (Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA), um sistema robótico de NanoSpray contendo um chip por onde as amostras são injetadas para que sofram ionização por eletrospray (ESI); foi utilizado o modo positivo (+). Os íons formados pela aplicação de alta voltagem foram levados para dentro do espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK). As condições gerais do experimento foram: pressão do gás de 0,3 psi, voltagem do capilar 1,55kV e voltagem do cone 49V. Os espectros de massas

foram acumulados durante 60 seg, centralizados e alinhados utilizando o programa MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK). Uma matriz contendo os valores de  $m/z$  de todos os íons contidos na faixa de 50 a 2000  $m/z$  nos 20 espectros obtidos foi construída e submetida à Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o programa Pychem 3.0.3v (Jarvis *et al.*, 2006), um software de acesso livre baseado em linguagem de programação python.

Para interpretação dos resultados da espectrometria de massas, levaram-se em consideração os dados de PIV de embriões bovinos (taxa de clivagem, desenvolvimento de blastocistos no dia 7 do cultivo *in vitro* e eclosão de blastocistos no dia 9 do cultivo *in vitro*) realizada em três períodos com a mesma partida de meio: dia 0 (PIV iniciada no dia da produção dos meios), dia 30 (PIV iniciada com meios armazenados durante 30 dias) e dia 45 (PIV iniciada com meios armazenados durante 45 dias). Numa segunda análise, para retirar o efeito da sazonalidade na qualidade dos oócitos utilizados no teste, também foram feitas comparações da PIV de meios com 30 de 45 dias em relação a uma outra partida de meios frescos. Foram realizadas 4 repetições de cada tempo. Para a PIV, oócitos bovinos foram obtidos por aspiração folicular de ovários de vacas mestiças abatidas em frigorífico na cidade de Poços de Caldas-MG e maturados durante 24 h sob óleo mineral em gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  FSH (Folltropin<sup>TM</sup>, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hCG (Profasi<sup>TM</sup>, Serono, São Paulo, Brasil) e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  estradiol (Sigma), 0,20mM de piruvato de sódio e 83,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de amicacina. A FIV foi realizada por um período de 20 h com sêmen descongelado (35°C por 30 seg) e lavado duas vezes por centrifugação (500 g por 5 min) em 2 mL de meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato e 83,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes. A concentração do sêmen foi ajustada para  $25 \times 10^6$  espermatozoides (sptz) móveis/mL. O volume de 4  $\mu\text{L}$  de sêmen ( $10^5$  sptz) foi adicionado em cada gota de 90  $\mu\text{L}$  de TALP-FIV (TALP suplementado com 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina, 18  $\mu\text{M}$  de penicilamina, 10  $\mu\text{M}$  de hipotaurina e 8  $\mu\text{M}$  de epinefrina) sob óleo mineral. Os prováveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em gotas de 100  $\mu\text{L}$  de SOF (Wells *et al.*, 1999) suplementado com 2,5% SFB e 0,5% de albumina sérica bovina sob óleo mineral. No terceiro dia de cultivo foi realizada

a substituição de 50% do volume das gotas de cultivo com os mesmos meios do início do teste.

Os dados de desenvolvimento embrionário foram submetidos à análise de variância em PROC GLM do SAS System v.9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Probabilidade de 5% foi considerada significativa.

## RESULTADOS

O ensaio de “fingerprint” por ESI(+) dos quatro meios (MIV, FIV, SOF e HSOF) utilizados na PIV de embriões bovinos apresentou espectros distinguíveis para cada um deles (Figura 1). Houve um padrão de espectro para o meio MIV, outro para o meio FIV, SOF e HSOF, indicando que a metodologia foi eficiente na diferenciação dos quatro meios nos cinco tempos diferentes.

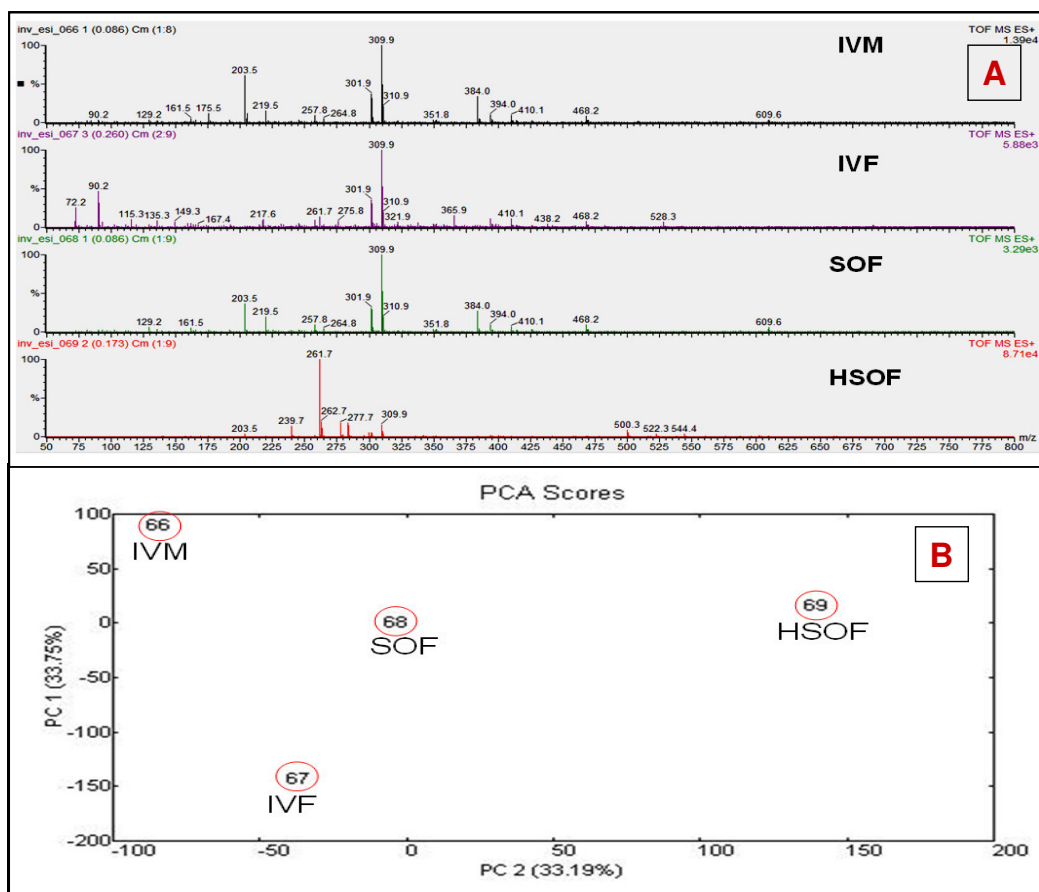


Figura 1. **A** – Espetros de “Fingerprint” por espectrometria de massas por ESI (+) dos quatro meios (MIV, FIV, SOF e HSOF) utilizados na PIV de bovinos, do grupo Dia 0 (meio fresco). **B** – Análise de componentes principais dos íons listados para cada espectro de meio fresco utilizando o programa Pychem 3.0.3v, mostrando que foi possível diferenciar os 4 meios. Resultado similar foi obtido para os outros grupos (2-SEM, 4-SEM, 5-SEM e 6-SEM).

Para avaliar o efeito do armazenamento em diferentes tempos, espectros de cada tipo de meio foram comparados entre si (Figura 2). Para o meio de MIV, o meio fresco ficou agrupado com os meios 2-SEM e 6-SEM, mas ficou distante dos meios 4 e 5-SEM. Para o meio FIV, a amostra de meio fresco e de meio 2-SEM ficaram isoladas, enquanto as amostras de meios de 4, 5 e 6-SEM ficaram agrupadas. Para o meio SOF, a amostra de meio fresco ficou distante de todos os outros tempos de armazenamento, enquanto que as amostras dos meios de 5 e 6-SEM agruparam. Para o meio HSOF, as amostras de meio fresco, de 4-SEM e 5-SEM ficaram agrupadas, enquanto que os meios 2 e 6-SEM ficaram isoladas.

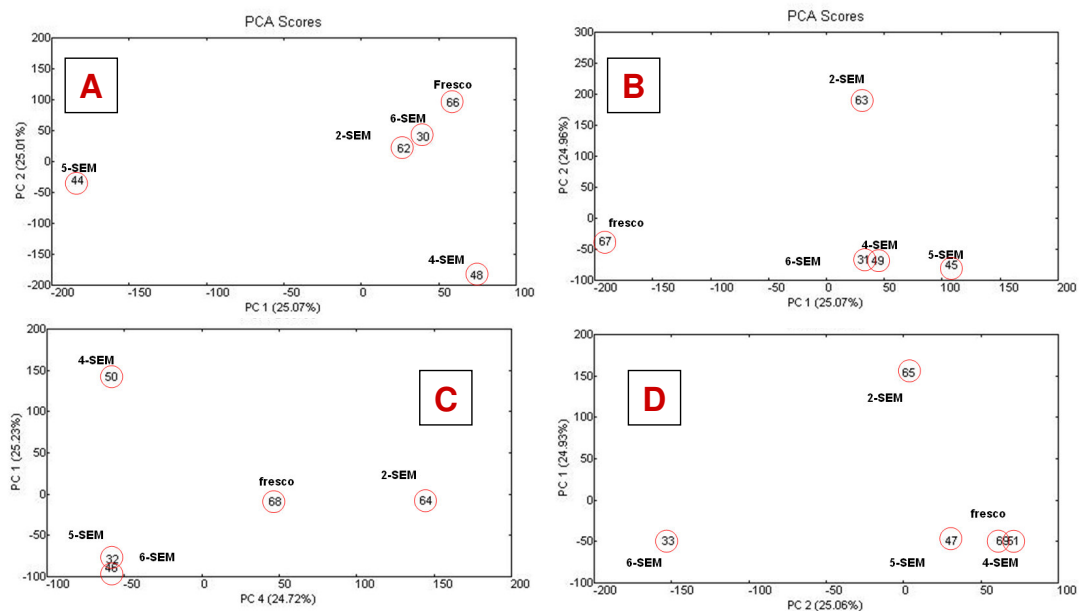


Figura 2. Análise de componentes principais dos íons listados para os meios MIV (A), FIV (B), SOF (C) e HSOF (D) utilizando o programa Pychem 3.0.3v.

Na PIV de embriões bovinos, foram utilizados 1549 oócitos para avaliar a clivagem, produção de blastocistos e eclosão nos meios frescos (dia 0), armazenados durante 30 dias e armazenados durante 45 dias. Com esse delineamento, avaliou-se PIV da mesma partida de meio, em diferentes dias de teste. Não houve diferença estatística para a PIV da mesma partida de meio

nos dias 0, 30 e 45 de armazenamento para os parâmetros avaliados (Tabela 1)

Tabela 1. Dados de PIV de embriões bovinos utilizando meio fresco e meio armazenado durante 30 dias e 45 dias (mesma partida de meio em dias diferentes de teste).

<b>Grupo</b>	<b>n. oócitos</b>	<b>% Clivados (DP)</b>	<b>% B1x (SD)</b>	<b>% B1x eclodidos (SD)</b>
Meio Dia 0	928	71,5 <sup>a</sup> (5,2)	34,9 <sup>a</sup> (4,7)	53,8 <sup>a</sup> (8,0)
Meio Dia 30	357	76,5 <sup>a</sup> (5,2)	39,5 <sup>a</sup> (14,2)	56,3 <sup>a</sup> (6,6)
Meio Dia 45	338	78,0 <sup>a</sup> (3,1)	40,8 <sup>a</sup> (5,63)	63,6 <sup>a</sup> (18,1)

\* blastocistos (Dia 7 do cultivo *in vitro*).

Os ensaios biológicos iniciaram-se no mês de outubro, quando a quantidade de chuvas é baixa e os pastos estão mais secos, e foram até o mês de março, quando a quantidade de chuvas é bastante alta. Dessa forma, para retirar o efeito da sazonalidade na qualidade dos oócitos utilizados nos testes, a taxa de desenvolvimento de embriões dos meios armazenados durante 30 ou 45 dias foram comparadas à taxa de desenvolvimento de um meio fresco produzido na semana do teste, ou seja, um meio de outra partida (Tabelas 2 e 3). Foram utilizados 610 oócitos para o grupo controle. Nesse caso, o meio armazenado durante 30 dias apresentou menor taxa de eclosão de blastocistos, comparado ao meio fresco (Tabela 2). A taxa de clivagem e desenvolvimento a blastocisto foi semelhante.

Tabela 2. Dados de PIV de embriões bovinos utilizando meio produzido no dia de início do teste (meio fresco) e meio armazenado durante 30 dias (partidas diferentes).

Grupo	n. oócitos	% Clivados (DP)	% B1x (SD)	% B1x eclodidos (SD)
Meio Dia 0	327	79,7 <sup>a</sup> (10,9)	40,4 <sup>a</sup> (8,8)	84,7 <sup>a</sup> (11,3)
Meio Dia 30	357	76,5 <sup>a</sup> (5,2)	39,5 <sup>a</sup> (14,2)	56,3 <sup>b</sup> (6,6)

\* blastocistos (Dia 7 do cultivo *in vitro*).

Para o meio armazenado durante 45 dias não foi observada nenhuma diferença nos parâmetros de desenvolvimento embrionário quando comparado com um meio fresco de outra partida, usado no mesmo dia do teste (Tabela 3).

Tabela 3. Dados de PIV de embriões bovinos utilizando meio produzido no dia de início do teste (meio fresco) e meio armazenado durante 45 dias (partidas diferentes).

Grupo	n. oócitos	% Clivados (DP)	% B1x* (SD)	% B1x eclodidos (SD)
Meio Dia 0	283	80,8 <sup>a</sup> (7,7)	36,1 <sup>a</sup> (12,8)	73,4 <sup>a</sup> (14,7)
Meio Dia 45	338	78,5 <sup>a</sup> (3,1)	40,8 <sup>a</sup> (5,6)	66,3 <sup>a</sup> (18,2)

\* blastocistos (Dia 7 do cultivo *in vitro*).

## DISCUSSÃO

A equipe do laboratório ThoMSon possui experiência ímpar na técnica de “fingerprinting”, ou “impressão digital” de amostras utilizando a MS. Como exemplos, o “fingerprint” por MS foi aplicado para tipificar amostras de própolis (Sawaya *et al.*, 2004); para diferenciar os tipos de cerveja (Araújo *et al.*, 2005); para caracterizar e detectar o envelhecimento e adulteração de óleos vegetais (Catharino *et al.*, 2005); para controlar a qualidade do processo de fermentação durante a produção de vinhos (Catharino *et al.*, 2006); para avaliar a autenticidade de perfumes (Marques *et al.*, 2006) e de uísque (Møller *et al.*,

2005), para caracterizar a madeira utilizada para estocagem de cachaça durante seu envelhecimento (De Souza *et al.*, 2007a, b), e para diferenciação de venenos de serpentes (Souza *et al.*, 2007).

Foi possível diferenciar os 4 meios utilizados para a PIV bovina utilizando a técnica de espectrometria de massas, de forma que cada meio possui a sua própria “impressão digital”. Os testes iniciais foram realizados com fonte de ionização tipo MALDI, em modo (+), com matriz ácido  $\alpha$ -Cyano-4-hidroxycinnamic devido ao perfil dos constituintes do meio, entretanto notamos que os íons da matriz suprimiram o sinal da amostra na região de baixa  $m/z$ . Como a maioria dos trabalhos com “fingerprint” foi realizada com fonte de ionização por ESI, optou-se por usar a mesma abordagem.

A análise de componentes principais demonstrou um padrão de agrupamento que poderia ser compatível com degradação no caso dos meios FIV e SOF, entretanto essa pode ter sido uma variação da partida do meio, já que para o ESI foram utilizadas amostras de partidas diferentes e com idades de armazenamento diferentes.

Os testes com PIV, com protocolo estabelecido, foram realizados com a mesma partida de meios em dias diferentes, tirando o efeito de partida; e também se utilizou a comparação dois meios envelhecidos 30 e 45 com uma partida de meio fresco no mesmo dia do teste de abatedouro, controlando dessa forma a variação que ocorre devido à sazonalidade e à qualidade dos ovários que chegam ao laboratório.

Afora o efeito negativo na taxa de eclosão do meio envelhecido durante 30 dias, quando comparado à partida de meio produzida na mesma semana do teste, não foi observada diferença nas taxas de desenvolvimento para os meios envelhecidos 30 e 45 dias, o que pode sugerir que a validade dos meios utilizados no presente trabalho possa ser estendida. Entretanto, não se observou a viabilidade desses embriões produzidos com meios envelhecidos. Uma boa maneira de se estimar a viabilidade é realizar a contagem do número de núcleos ou avaliar parâmetros moleculares (ex. taxa de apoptose, expressão de genes pró- e anti-apoptóticos), e até realizar a transferência desses embriões para vacas receptoras.

Futuramente, experimentos MS/MS para averiguar os íons marcadores de amostras de meios armazenados em diferentes tempos poderão esclarecer se a variação observada nos PCAs indicam formação de compostos de degradação ou são decorrentes de variação entre partidas. Concluímos que o “fingerprint” de meios de PIV bovina por MS com ionização por ESI (+) permitiu rápida diferenciação dos meios de PIV bovina e parece ser útil para melhorar o CQ dos meios.

## REFERÊNCIAS

Araújo AS, da Rocha LL, Tomazela DM, Sawaya AC, Almeida RR, Catharino RR, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. **Analyst**. 130(6):884-9, 2005.

Catharino RR, Cunha IB, Fogaça AO, Facco EM, Godoy HT, Daudt CE, Eberlin MN, Sawaya AC. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **J Mass Spectrom**. 41(2):185-90, 2006.

Catharino RR, Haddad R, Cabrini LG, Cunha IB, Sawaya AC, Eberlin MN. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, quality, adulteration, and aging. **Anal Chem**. 15;77(22):7429-33, 2005.

De Souza PP, Augusti DV, Catharino RR, Siebald HG, Eberlin MN, Augusti R. Differentiation of rum and Brazilian artisan cachaça via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **J Mass Spectrom**. 42(10):1294-9, 2007a.

De Souza PP, Siebald HG, Augusti DV, Neto WB, Amorim VM, Catharino RR, Eberlin MN, Augusti R. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Brazilian artisan cachaça aged in different wood casks. **J Agric Food Chem**. 21;55(6):2094-102, 2007b.

Fleetham JA, Pattinson HA, Mortimer D. The mouse embryo culture system: improving the sensitivity for use as a quality control assay for human in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.59, p.192-196, 1993.

Jarvis RM, Broadhurst D, Johnson H, O’Boyle NM, Goodacre R. PYCHEM: a multivariate analysis package for python. **Bioinformatics** Vol. 22 no. 20 , p.2565–2566, 2006.

Marques Lde A, Catharino RR, Bruns RE, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: Rapid classification and counterfeit detection. **Rapid Commun Mass Spectrom**. 20(24):3654-8, 2006.

Møller JK, Catharino RR, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of whisky: immediate proof of origin and authenticity.

**Analyst.** 130(6):890-7, 2005.

Sawaya AC, Tomazela DM, Cunha IB, Bankova VS, Marcucci MC, Custodio AR, Eberlin MN. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst.** 129(8):739-44, 2004.

Scott LF, Sundaram SG, Smith S. The relevance and use of mouse embryo bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program. **Fertil Steril**, v.60, p.559-68, 1993.

Souza GH, Catharino RR, Ifa DR, Eberlin MN, Hyslop S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. **J Mass Spectrom.** 2008 Jan 16; [ahead of print].

Trabalho submetido ao comitê científico da 56<sup>o</sup> Conferência da Associação Americana de Espectrometria de Massas em 01 de fevereiro de 2008. O número de identificação do resumo é 1765. O mesmo foi indicado para apresentação oral pelo coordenador da sessão “*Fingerprinting* de espécies sem preparação de amostras”, o Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

**Texto em inglês do resumo submetido:**

Your abstract for the 56<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry has been submitted on 2/1/2008. The log number for your abstract is: 1765

**Fingerprinting Quality Control of Media for In Vitro Bovine Embryo Production Using Direct Infusion Automated Chip-Based Nano-Electrospray Mass Spectrometry**

CHRISTINA RAMIRES FERRREIRA<sup>1</sup>; Gustavo Henrique M. Ferreira Souza<sup>2</sup>; Maria Francesca Riccio Fonsêca<sup>4</sup>; Gustavo Braga Sanvido<sup>2</sup>; Andrea Cristina Brasso<sup>3</sup>; José Henrique Fortes Pontes<sup>3</sup>; José Carlos Ereno Júnior<sup>3</sup>; Marcos N Eberlin <sup>2</sup>

<sup>1</sup>*In Vitro Brasil Ltda, ThoMSon Laboratory Unicamp, Campinas - SP, BRAZIL;*

<sup>2</sup>*ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory - Unicamp, Campinas-SP, Brazil;* <sup>3</sup>*In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim-SP, Brazil;* <sup>4</sup>*ThoMSon Mass Spectrometry Laboratory Unicamp, Campinas, SP, BRAZIL*

**Keywords:** Biodegradation; High Throughput; Ionization, Micro Electrospray (Nanospray); Mass Spectrometry; Real-Time Monitoring;

**Novel Aspect:** ESI-MS fingerprintings allow rapid differentiation of bovine embryo culture media and seems to be useful for media quality control.

**Introduction**

Various strategies of analyte MS fingerprinting with no sample preparation have been developed for biological and industrial applications. As illustrative examples, fingerprints of vegetal oils, sugarcane distillates, whisky, propolis, perfumes, beer and biofuels have been reported. MS Fingerprinting allows not only the classification, but also adulteration and aging evaluation. Mammalian

embryo culture media quality is usually verified by its osmolarity, pH, endotoxin level, and by in vivo assays using embryos. New strategies for media quality control would be useful. The aim of this work is to develop a fast method of MS fingerprinting analysis, with minimal sample handling, in order to differentiate embryo culture media and evaluate media stability during storage at 4°C during a 6-week period.

## **Methods**

four distinct media samples (IVM, IVF, SOF and HSOF) diluted 1:100 in ultrapure water were loaded into 96-well plates. Five replicates from different batches of media fresh or stored up to 6 weeks were performed. A Q-TOF mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK), equipped with NanoMate 100 (Advion BioSciences, Ithaca, NY, USA) was used. General conditions were: gas pressure 0.3 psi, capillary voltage, 1.55kV and cone voltage of 49V. Mass spectra were accumulated over 60s, centered and aligned using the MassLynx 4.0 software (Waters, Manchester, UK). A matrix of 20 samples with mass signals ranging from m/z 50 to 2000 was used for PCA through a python computer program language based called Pychem 3.0.2v. Software.

## **Preliminary**

## **results**

ESI(+)-MS Fingerprinting of the four media used for bovine in vitro embryo production showed distinct spectra in the positive ion mode for all storage times analyzed. PCA scores confirmed the visual differentiation, indicating that the methodology was effective to differentiate the four media with five different ages. When IVM medium repetitions were compared, fresh medium (F-group) grouped with 2- and 6-weeks-old (2W-group and 6W) media and was distant from 4- and 5-weeks-old media (4W-group and 5W). For the IVF medium, F-group and 2W-group were different, while 4W, 5W and 6W were close. For the SOF media, F group was different from all media, and 5W and 6W grouped. For the HSOF medium F, 4W and 5W grouped, while 2W and 6W-groups were distant. In the in vitro assay with bovine embryos, there was no difference in embryo development rate using culture media stored up to 6 weeks, but chemical alterations during storage may occur and affect embryo post-implantation viability. PCA from IVF and SOF medium showed that media stored longer were different from younger media, indicating chemical alteration.

Nonetheless, no correlation could be seen for IVM and HSO media, suggesting that differences could be also the result of batch difference. More experiments will show the extent of differences among media batches, since bovine embryo media are complex mixtures. Also, PCA loading ion mass analysis could provide more information about embryo culture media stability during cold storage.

**Requested**

**presentation:** ORAL

**Requested**

**session:** Analyte "fingerprinting" with no sample prep

**Second**

**choice:** High Throughput Analysis/Robotics

**Submitting Author:**

CHRISTINA RAMIRES FERRREIRA

In Vitro Brasil Ltda, ThoMSom Laboratory Unicamp,

Cidade Universitária Zeferino Vaz s/n CP6154 Blo

CEP13083-970

Campinas - SP, São Paulo CEP13083-970

BRAZIL

0055 19 38063944

0055 19 38041802

christina@invitrobrasil.com.br