

**JOANA CLAUDIA MEZZALIRA**

**ESTRESSE CONTROLADO E MODULADORES DE CROMATINA PARA  
OTIMIZAR A CRIOTOLERÂNCIA E O DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa  
Catarina- UDESC, como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Davi Traverso

**Lages, SC**

**2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Mezzalira, Joana Claudia

Estresse controlado e moduladores de cromatina  
para otimizar a criotolerância e o desenvolvimento  
de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro. /  
Joana Claudia Mezzalira. - Lages , 2018.  
73 p.

Orientadora: Sandra Davi Traverso

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,  
2018.

1. vitrificação. 2. oócitos imaturos. 3. 6-DMAP.  
4. pré-maturação. 5. apoptose. I. Traverso, Sandra  
Davi . II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**Joana Claudia Mezzalira**

**ESTRESSE CONTROLADO E MODULADORES DE CROMATINA PARA  
OTIMIZAR A CRIOTOLERÂNCIA E O DESENVOLVIMENTO DE OÓCITOS E  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**Banca Examinadora**

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Sandra Davi Traverso  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV)

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Valério Valdetar Marques Portela Junior  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Curitibanos)

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Curitibanos)

Membro: \_\_\_\_\_

Dr. Maicon Gaissler Lorena Pinto  
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI)

Membro: \_\_\_\_\_

Dra. Marina Ragagnin de Lima  
Universidade Estadual Paulista (UNESP/JABOTICABAL)

**Lages, 26 de fevereiro de 2018**



## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os mentores que dedicam (ou dedicaram) suas carreiras a promover a pesquisa, seja ela básica ou aplicada, mas primando sempre por melhorar o bem-estar animal, o cotidiano dos produtores, e a geração de informação acessível a todos.



## AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer em primeiro lugar ao grande arquiteto do universo, Deus, que sempre oferece oportunidades de amparo e sobrepõe o caminho dos seres que estão executando suas jornadas. A carreira acadêmica se torna pano de fundo onde os verdadeiros protagonistas são esses encontros que a vida proporciona.

A minha família, base de tudo, por toda a dedicação, apoio, acolhimento aos colegas de caminhada, horas compartilhadas entre caronas, discussões, apoio nas decisões, inesgotável motivação, e por não deixar nunca que eu perdesse a perseverança.

Ao Lain, parceiro mais incrível que a caminhada acadêmica me proporcionou.

Aos que se encontram em outro plano, em especial minha eterna amiga Manoela Padilha de Souza, por mesmo assim ser uma eterna fonte de ânimo e inspiração.

A minha orientadora, Dra. Sandra Davi Traverso, pela prontidão em me acolher, mesmo que isso acarretasse um leve desvio de área do conhecimento.

Aos incríveis proprietários, gerentes e funcionários dos frigoríficos Verdi e El'Golli, por disponibilizar o material para execução desse trabalho, além de disponibilizar seu próprio tempo, para que as coletas fossem possíveis.

A UDESC e a CAPES, pela infra-estrutura e apoio financeiro, e ao Laboratório de Reprodução Animal prof. Assis Roberto de Bem, na pessoa do seu coordenador, Dr. Alceu Mezzalira, que muito justamente está mencionado duplamente nos agradecimentos, como grande pesquisador que é, e como alicerce da minha família.

A todos os colegas do laboratório, por toda a ajuda e companheirismo, em especial às Camilas, Claudio, Giselle, Rafael.





## RESUMO

MEZZALIRA, Joana Claudia. **Estresse controlado e moduladores de cromatina para otimizar a criotolerância e o desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2018, 73 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2018.

O estresse controlado por pressão negativa pode incrementar os índices de produção embrionária. Ao associá-lo a estratégias que favoreçam a maturação *in vitro* de oócitos, se obtém as melhores condições para maximizar a produção de embriões bovinos. Foram avaliadas diferentes combinações das duas estratégias propostas. No tratamento pressão negativa (submissão a 250, 500 ou 750 mBar) nos oócitos destinados à produção de blastocistos partenotos, a produção de embriões foi superior no controle, em relação ao grupo 250 mBar. Já as taxas de eclosão apenas diferiram entre o grupo controle e o grupo 500 mBar, que foi superior. Já quando os embriões foram fecundados *in vitro*, a clivagem mostrou diferença significativa, sendo a pressão de 250 mBar inferior a de 750 mBar. Após vitrificação dos blastocistos oriundos de oócitos tratados por pressão, todas as intensidades de pressão anularam a diferença entre frescos e vitrificados, sendo o grupo 500 mBar semelhante ao controle não vitrificado. Ainda, para embriões frescos, a incidência de apoptose foi significativamente superior para a pressão de 500 mBar, em relação ao controle. Após a submissão de blastocistos ao nitrocooler, a pressão de 750 mBar reduziu a eclosão, sendo a incidência de apoptose, novamente superior para o 500 mBar. Os tratamentos 250 e 500 mBar foram repetidos em blastocistos posteriormente vitrificados. A eclosão foi superior no grupo controle em relação ao 250 mBar. Buscando estabelecer as condições ideais de pré-maturação com 6-DMAP, sua inclusão no meio de maturação desprovido de gonadotrofinas resultou nas melhores taxas de embrião. A pressão negativa de 500 mBar associada ao 6-DMAP (5  $\mu$ M por 3h) resultou em produção embrionária superior ao controle, porém a ordem inversa de associação (6-DMAP + 500 mBar) proporcionou maior densidade celular, apesar da clivagem ser significativamente inferior. Quando a submissão à pressão de 500 mBar foi associada à vitrificação dos oócitos, houve uma drástica redução no desenvolvimento embrionário, sendo que a adição de 6-DMAP a essa combinação, não incrementou os índices. Como conclusões, o estresse controlado induzido por pressão negativa e o 6-DMAP aumentam a capacidade de desenvolvimento embrionário. Entretanto, apenas o estresse controlado melhora a criotolerância de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** Vitrificação. Oócitos imaturos. 6-DMAP. Pré-maturação. Apoptose.



## ABSTRACT

MEZZALIRA, Joana Claudia. **Controlled stress and chromatin modulators to optimize the development and cytotolerance of bovine oocytes and *in vitro* produced embryos.** 2018, 73 p. Thesis (Doctorate in Animal Science). Santa Catarina State University. Post Graduate Program in Animal Science. Lages, 2018.

### Abstract

The submission to a controlled stress by negative pressure may improve the embryo production efficiency. When combined to strategies that increase oocyte *in vitro* maturation, one can obtain the best conditions to maximize bovine embryo production. We assessed different combinations of both the proposed strategies. When oocytes were treated by negative pressure (250, 500 or 750 mBar) and parthenogenetically activated in order to produce embryos at the blastocyst stage, the embryo yield differed only between the control and the treatment 250 mBar. The hatching rates differed significantly between the control (inferior) and the treatment 500 mBar (superior). When the embryos were *in vitro* fertilized, their cleavage rate was significantly different, being the treatment 250 mBar lower than the treatment 750 mBar. After submission of pressure treated blastocysts to vitrification, whatever intensity of negative pressure used neutralized the statistical difference between fresh and cryopreserved embryos, being the group 500 mBar similar to the fresh control. Also, for fresh embryos, the incidence of apoptosis was significantly higher for 500 mBar in comparison to the control. After submission of blastocysts to nitrocooler, the pressure of 750 mBar reduced the hatching rate, being again the incidence of apoptosis higher for 500 than for 250 mBar. When submitting blastocysts to 250 and 500 mBar before vitrification of embryos, the hatching was different between the groups control and 250 mBar, being the latter significantly inferior. In order to establish the ideal conditions for pre-maturation using 5  $\mu\text{M}$  of 6-DMAP for 3 h, the association with the maturation medium without hormones provided the best embryo production rates, being higher than the control. The association of 500 mBar of negative pressure in association with 6-DMAP yielded higher production rates than did the control, however the opposite order (6-DMAP + 500 mBar) provided the highest cell density, despite the significantly low cleavage. When the treatment 500 mBar of negative pressure was combined to vitrification, the embryo development rates were drastically reduced, whilst the addition of 6-DMAP to this combination did not improve the embryo production. As conclusions, the controlled stress induced by negative pressure and the use of 6-DMAP increase the embryo developing capacity. However, only the controlled stress by negative pressure increases the cryotolerance of *in vitro* produced bovine embryos.

**Key words:** Vitrification. Immature oocyte. 6-DMAP. Pre-maturation. Apoptosis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Protótipos do “Nitrocooler”, ambos em versão com controle de pressão através da adaptação de um barômetro acoplado em seu sistema de sucção.....26
- Figura 2** - Protótipo utilizado por Hite em 1899, para executar os experimentos sobre o efeito da pressão na preservação do leite.....27
- Figura 3** - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos expandidos produzidos por protocolo padrão de fecundação *in vitro* (Controle), ou após a submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 250, 500 ou 750 mBar.....55
- Figura 4** - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos eclodidos produzidos por protocolo padrão de fecundação *in vitro* (Controle), ou após a submissão dos blastocistos expandidos a pressão negativa de 250, 500 ou 750 mBar.....57
- Figura 5** - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos eclodidos produzidos por protocolo padrão de ativação partenogenética (Controle), ou após a submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 500mBar seguido da incubação em 6DMAP (500mBar + 6DMAP), ou após a incubação em 6DMAP seguido da submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 500mbar (6DMAP + 500mBar).....61



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Desenvolvimento *in vitro* de embriões oriundos de oócitos bovinos imaturos submetidos a diferentes intensidades de pressão negativa e produzidos por ativação partenogenética.....52
- Tabela 2** - Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos a diferentes intensidades de pressão negativa, produzidos por fecundação *in vitro* e seu desenvolvimento posterior a vitrificação dos embriões em estágio de blastocisto..... 54
- Tabela 3** - Sobrevivência (eclosão) de embriões bovinos (dia 7) produzidos por fecundação *in vitro* e expostos a diferentes intensidades de pressão negativa..... 56
- Tabela 4** - Sobrevivência (eclosão) de embriões bovinos (dia 7) produzidos por fecundação *in vitro*, expostos a diferentes intensidades de pressão negativa e vitrificados 2 horas após.....58
- Tabela 5** - Efeito da pré-maturação na presença (MIV) ou não (TCM) de gonadotrofinas e soro fetal na presença ou ausência do bloqueador de ciclo celular 6-DMAP no desenvolvimento de oócitos imaturos após ativação partenogenética.....59
- Tabela 6** - Associação do estresse controlado por pressão negativa de 500 mBar ao tratamento de pré-maturação utilizando o bloqueador de ciclo celular 6-DMAP, aplicados em oócitos bovinos imaturos, ou vice-versa, e desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética.....60
- Tabela 7** - Desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética de oócitos imaturos submetidos a 500mbar de pressão negativa, em meio de maturação contendo ou não gonadotrofinas e soro fetal, e destinados ou não a vitrificação.....62
- Tabela 8** - Desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética de oócitos imaturos submetidos sucessivamente a pressão negativa de 500 mBar e ao bloqueador 6-DMAP, ou a cada um dos fatores isoladamente.....63





## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: STATUS MUNDIAL E NACIONAL.....	21
2.2	ASPECTOS COMERCIAIS E CIENTÍFICOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES.....	24
2.3	ESTRESSE CONTROLADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR A RESISTÊNCIA CELULAR.....	26
2.4	MATURAÇÃO CITOLPASMÁTICA E MOLECULAR DO OÓCITO.....	29
2.5	PRÉ-MATURAÇÃO DE OÓCITOS E OS EFEITOS CONHECIDOS DO 6-DMAP.....	31
2.6	COMO OS MARCADORES DE APOPTOSE PODEM AUXILIAR A MENSURAR OESTRESSE CELULAR EM UM SISTEMA DE CULTIVO .....	33
2.7	ASPECTOS GERAIS DA IMPORTÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO PARA A EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	34
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	OBTENÇÃO DOS OÓCITOS.....	37
3.2	SUBMISSÃO DOS OÓCITOS A PRESSÃO NEGATIVA .....	37
3.3	VITRIFICAÇÃO DOS OÓCITOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	38
3.4	FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	38
3.5	DESNUDAMENTO DOS OÓCITOS, SELEÇÃO DOS MATURADOS E ATIVÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	39
3.6	CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	39
3.7	SUBMISSÃO DOS BLASTOCISTOS À PRESSÃO NEGATIVA.....	39
3.8	VITRIFICAÇÃO E REAQUECIMENTO DOS EMBRIÕES.....	40
3.9	IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	40
3.10	AVALIAÇÕES E CRITÉRIOS DE VIABILIDADE EMBRIONÁRIA.....	41

3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	43
4.1	FASE I: DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA PARA SER REALIZADA EM OÓCITOS IMATUROS E SEU EFEITO NA POSTERIOR CRIOTOLERÂNCIA DOS EMBRIÕES...	43
4.1.1	<b>Experimento 1</b> .....	43
4.1.2	<b>Experimento 2</b> .....	44
4.2	FASE II: DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA A SER UTILIZADA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO E TRATADOS NO ESTÁGIO DE BLASTOCISTO.....	45
4.2.1	<b>Experimento 3</b> .....	45
4.2.2	<b>Experimento 4</b> .....	46
4.3	FASE III: DETERMINAR AS CONDIÇÕES IDEAIS DE PRÉ- MATURAÇÃO.....	47
4.3.1	<b>Experimento 5</b> .....	47
4.3.2	<b>Experimento 6</b> .....	48
4.4	FASE IV: ASSOCIAÇÃO DA PRÉ-MATURAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS.....	48
4.4.1	<b>Experimento 7</b> .....	49
4.4.2	<b>Experimento 8</b> .....	50
5	<b>RESULTADOS</b> .....	51
5.1	RESULTADOS FASE I.....	51
5.2	RESULTADOS FASE II.....	56
5.3	RESULTADOS FASE III.....	58
5.4	RESULTADOS FASE IV.....	61
6	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Os experimentos desenvolvidos nesse estudo buscaram maximizar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, a partir de estratégias inspiradas na mimetização dos sistemas fisiológicos de desenvolvimento embrionário, e buscando condições onde o ambiente *in vitro* é adaptado conforme o melhor que o ambiente *in vivo* possa proporcionar.

Muitas vezes, a busca pelo ambiente desprovido de fatores estressantes, não é o suficiente para alcançar o melhor desempenho nas técnicas de reprodução assistida. Portanto, novas estratégias têm surgido para adaptar o desenvolvimento de embriões ao próprio ambiente *in vitro*, e torná-los mais tolerantes ao sistema de produção *in vitro*, ao invés de apenas tornar o sistema *in vitro* de produção desprovido de fatores estressantes, ou limitantes de desempenho.

O aprimoramento dos sistemas de produção de embriões, buscando mimetizar o que se conhece de benéfico a partir do ambiente gonadal e uterino *in vivo*, combinado à aplicação de fatores/eventos, que de forma controlada, ocasionem alguma modalidade de estresse sub letal, pode prover os gametas e embriões de maior tolerância a fatores não elimináveis do sistema de produção. Especificamente aqui, estão sob apreciação a submissão de oócitos imaturos ou embriões (produzidos *in vitro*) à pressão negativa. Ainda, aliado a outras estratégias de otimização da sincronia celular nos primeiros estágios de desenvolvimento, como por exemplo, através da exposição de oócitos a drogas bloqueadoras reversíveis de alguma etapa do ciclo celular, pode ser a chave para um melhor desempenho embrionário.

De forma geral, os objetivos das diversas etapas desse estudo visaram associar os presumíveis efeitos sinérgicos positivos, tanto proporcionados pela exposição de oócitos imaturos a drogas bloqueadoras do ciclo celular, visando proporcionar uma melhor condição para a maturação citoplasmática ocorrer de maneira mais fisiológica, quanto proporcionados pela exposição prévia dos oócitos imaturos ou embriões ao estresse controlado por pressão negativa, visando que fatores de adaptação sejam expressados, conferindo maior tolerância dessas estruturas aos fatores prejudiciais que não são possíveis de serem eliminados das etapas da produção *in vitro* de embriões.

Por exemplo, pode-se empregar estas estratégias para incrementar a obtenção de melhores resultados após a criopreservação, ou seja, pode-se mesclar os fatores aqui mencionados ao longo do sistema de produção de embriões, tornando-os mais criotolerantes, mais competentes, ou simplesmente obtendo-se mais embriões, a partir de um mesmo pool inicial de oócitos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: STATUS MUNDIAL E NACIONAL

Conforme revisado por Blondin (2015), a introdução de biotecnologias reprodutivas inovadoras vem ocorrendo desde o início do século 20, e tem agregado tecnologias de uma maneira crescente e contínua, conforme a versatilidade das técnicas. Desde o impulso inicial gerado em 1780, pela possibilidade de se realizar inseminações artificiais, graças a experimentos conduzidos por Lazzaro Spalanzani (em: Severo, 2013), criopresevar sêmen (Polge et al., 1949) e disponibilizá-lo para realizar a técnica de inseminação artificial, questões temporais deixaram de ser um entrave para a obtenção de acasalamentos que anteriormente não eram possíveis. Por exemplo, ao preservar sêmen de determinado macho, este, mesmo após sua morte passou a ser um reprodutor disponível, desde que o sêmen fosse conservado adequadamente. Também, com esse advento, a impossibilidade de acasalamentos em função da distância deixou de ser um entrave. Com isso, pôde-se agregar a possibilidade de exportar/importar genética de machos de interesse, impulsionando positivamente o melhoramento genético dos rebanhos bovinos.

Mais tarde, com o advento da transferência de embriões (revisado por Blondin, 2015), também foi possível efetuar trocas de genótipos entre machos e fêmeas, ainda que fossem atrelados entre si. Certamente, esse avanço contribuiu enormemente para incrementos na produtividade do rebanho bovino no mundo todo. Contudo, a revolução mais impactante, que fez com que a velocidade entre as gerações fosse encurtada, foi a possibilidade de produzir embriões em laboratório. A partir do domínio da produção *in vitro* de embriões, a proporção de produtos obtidos de um único acasalamento, ou mesmo de uma única fêmea, dentro de um mesmo intervalo, foi muito aumentada. Quase simultaneamente, a obtenção de oócitos de fêmeas de genética superior passou a ser possível mesmo sem a ocasional morte das mesmas. Apenas esse advento já havia proporcionado um salto importante para as técnicas de reprodução assistida graças à possibilidade de se obter embriões sem a necessidade da fêmea carrear a fecundação. Produzir embriões a partir de gametas obtidos de fêmeas abatidas, ou que por alguma razão precisaram ser sacrificadas ou que tiveram morte acidental, se tornaria uma explosão mundial a partir da obtenção dos gametas das fêmeas bovinas vivas, através de uma técnica pouco invasiva, a punção de oócitos guiada através de ultra-som. Ainda, com a própria contribuição dos técnicos e pesquisadores, a técnica pode ser considerada

extremamente segura, desde que utilizada racionalmente, não acarretando perda de fertilidade posterior para as vacas doadoras de oócitos.

Particularmente na espécie bovina, a possibilidade de recuperar oócitos (revisado por Suthar & Shah, 2009) através da aspiração folicular guiada por ultrassonografia, tem colocado o Brasil em posição de destaque no cenário mundial. Aliadas à produção *in vitro* de embriões, tanto a punção folicular quanto a superovulação de doadoras para posterior coleta de embriões representam juntas o maior encurtamento do intervalo entre gerações, trazendo avanços zootécnicos consideráveis, e com isso a possibilidade de um enorme aumento na pressão de seleção, sendo isso ainda potencializado pela melhor eficiência com o uso de semen sexado. Além disso, o legado da informação a respeito dos fenômenos que regem o desenvolvimento embrionário e fetal é indiscutível, e seguramente há uma simbiose satisfatória entre a pesquisa e a aplicação comercial das técnicas de reprodução assistida.

Não obstante, é consenso entre instituições de pesquisa e empresas, o fato de que ainda existem limitações em qualquer sistema, pois quando se comparam embriões produzidos *in vitro* versus os produzidos *in vivo*. Porém, a enorme quantidade de dados gerados e publicados mundialmente corrobora para que, após cada nova informação reportada, confirmada ou refutada, se consiga trazer essas duas categorias de embriões com suas eficiências e desempenho pós-implantação cada vez mais próximas entre si.

Recentemente, com a agregação da genômica (Shojaei Saadi et al., 2014, revisado por Blondin, 2015) no processo de seleção dos animais de produção, obteve-se ainda mais precisão na hora de identificar, em cada propriedade, machos e fêmeas portadores da genética desejada. Com isso, a produção *in vitro* de embriões não deve parar de crescer, e o incremento nos índices de eficiência da técnica trazem cada vez mais urgência na necessidade de se ter alta eficiência também na conservação destes embriões, já que nem sempre se conta com barrigas de aluguel sincronizadas, para que estes sejam transferidos a fresco.

Para se ter ideia da rápida evolução, no final dos anos 90 a produção *in vitro* de embriões raramente era utilizada, ao passo que no ano de 2013, mais de meio milhão de embriões registrados foram produzidos, o que corresponde a 42% do total de embriões produzidos naquele ano (Blondin, 2015). Esse balanço ainda não inclui embriões transferidos com finalidade de pesquisa, ou sem comunicação/registro. Por exemplo, nesse período, a nossa instituição (CAV/UEDESC) contribuiu com apenas 1 registro de nascimento de embrião, apesar de raramente ter deixado de produzir dezenas de embriões mensalmente, com finalidade acadêmica ou científica.

Outro dado extremamente interessante é que nesse mesmo ano de 2013, 20% dos embriões produzidos *in vitro* na América do Norte haviam sido previamente criopreservados, enquanto na América do Sul, apenas 5% deles correspondiam a estruturas previamente criopreservadas. Essa redução na comparação entre Américas, ainda, trata do total de embriões bovinos transferidos, não fazendo distinção entre os produzidos *in vitro* ou *in vivo*. A menor expressividade da transferência de embriões criopreservados seria mais drástica ainda se fossem levadas em consideração os embriões produzidos a partir de oócitos previamente criopreservados.

Contudo, a cada ano novas informações são obtidas e tendências apontam para que novas vertentes da pesquisa, que contribuem para a aplicação comercial de técnicas que maximizem o potencial reprodutivo da espécie bovina, como a possibilidade de dispensar as etapas laboratoriais para utilização de fêmeas doadoras de oócitos, mesmo fecundados com diferentes touros, a chamada IFIOT: produção de embriões por transferência intra-folicular de oócitos (Fleming et al., 1985, Kassens et al., 2015, Sprícigo et al., 2016, Hoelker et al., 2017), e ainda, a possibilidade de incrementar a qualidade de embriões produzidos, desde que as doadoras de oócitos possam ser monitoradas quanto a sua dinâmica folicular.

A técnica em questão, o “coasting”, consiste em uma manipulação hormonal com a retirada precoce das gonadotrofinas do programa normal de super-estimulação, que proporciona um período alongado (e hipoteticamente mais fisiológico) de maturação oocitária, principalmente a citoplasmática. Essa técnica que surgiu em meados da década de 80 para auxiliar na reprodução assistida em seres humanos (Huddleston et al., 2008), foi consagrada em bovinos mais tarde por pesquisadores como Blondin et al. (2002). Nem todos os sistemas de produção contemplam um impacto positivo utilizando a técnica (Oliveira et al., 2016). Ainda assim ela tem trazido subsídios para o melhor entendimento e mimetização dos sistemas de maturação, além do impacto econômico significativo na aplicação comercial das biotécnicas em bovinos.

Juntas, as diferentes estratégias, mescladas, devem proporcionar ganhos consideráveis na eficiência das técnicas aqui investigadas, e sobretudo conferindo mais liberdade nos acasalamentos de programas de melhoramento genético, no caso de bovinos de alta produção, bem como no incremento da relação custo-benefício, onde um número menor de doadoras irá proporcionar o equivalente em bezerros nascidos. Não menos importante que todo o mérito zootécnico e acadêmico que se espera do aprimoramento de protocolos de produção de embriões ou de criopreservação (de oócitos ou de embriões), deve-se ressaltar a importância que a criopreservação apresenta diante de contratempos, tais como acasalamentos

equivocados, a perda de características fenotípicas em função de uma situação econômica momentânea da indústria agropecuária, e mesmo diante de catástrofes ambientais, epidemias, e qualquer situação que coloque alguma raça ou fenótipo em risco de ser eliminado.

## 2.2 ASPECTOS COMERCIAIS E CIENTÍFICOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES

Conforme revisado por Mapletoft (2013), o desenvolvimento de técnicas efetivas para criopreservar embriões bovinos já ocorreu nos anos 70, quando pesquisadores (Wilmot & Rowson, 1973; Whittingham, 1971; Whittingham et al., 1972) ofereceram a possibilidade de não mais ser necessário a disponibilidade imediata de uma receptora sincronizada no momento da obtenção do embrião. Porém, no início as técnicas propostas eram muito complicadas e dispendiosas, necessitando de equipamentos muito caros e de uma manipulação demorada.

Posteriormente, já em meados dos anos 80, a técnica utilizada para criopreservar embriões foi simplificada com o advento da vitrificação (Rall & Fahy, 1985). Esta técnica, apesar de ter sido reportada há mais de 30 anos, protagonizou grandes avanços a partir dos anos 90 e 2000, quando variações da técnica a tornaram menos danosa às estruturas preservadas, em função de alternativas de menor toxicidade e do aumento das taxas de resfriamento.

A vitrificação consiste em promover considerável desidratação citoplasmática das estruturas celulares a serem conservadas, seguindo princípios físicos de simples compreensão. Conforme demonstrado por Rall & Fahy (1985) quando publicaram a sobrevivência dos primeiros embriões de camundongos à técnica de criopreservação. A abordagem consiste na utilização de soluções aquosas adicionadas de substâncias crioprotetoras em altíssimas concentrações e resfriamento até baixíssimas temperaturas. Nesse ponto, já com a temperatura suficientemente baixa, essas soluções se tornam tão viscosas que solidificam sem formar cristais de gelo durante o processo.

Ainda, corroborando com o que foi descrito por Mazur (1963), durante a vitrificação, a matriz extra-celular se vitrifica, daí o termo vitrificação. Apesar de ser um processo parecido com as técnicas previamente propostas, durante a vitrificação, não apenas o ambiente intra-celular é poupado da formação de cristais de gelo, mas também toda a solução extra-celular. Por isso, o diferencial da técnica é a capacidade real de criopreservar estruturas na ausência de



gelo, e não apenas evitando-se a formação de cristais em determinadas regiões das células submetidas a criopreservação.

Apesar desses pré-requisitos para se obter o processo de vitrificação, esta pode também ser obtida em situações distintas, como por exemplo, a partir de uma taxa de resfriamento muito baixa, ou com baixíssimas concentrações de crioprotetores (revisado por Saragusty & Arav, 2011). Entretanto, a modalidade mais consagrada e que já proporcionou os melhores resultados, associa a clássica combinação de altas taxas de resfriamento com altíssimas concentrações de crioprotetor.

Uma maneira de se maximizar ainda mais a velocidade de resfriamento, surgiu com a técnica do “slush”. Este consiste em baixar a temperatura no nitrogênio líquido, provocando uma mudança de estado físico, onde além de baixar a própria temperatura do nitrogênio, quando próximo do seu ponto de solidificação, este adquire a capacidade de entrar em contato com diferentes materiais sem ocorrer o desprendimento usual de gases atmosféricos. Com o slush, se obtém taxa de resfriamento de 2-6 vezes mais alta em comparação ao uso de nitrogênio em atmosfera normal (Arav, 2014).

Desde então, o desafio tem sido tornar a técnica altamente eficiente para estruturas de menor criotolerância, onde se destacam, no caso da espécie bovina, embriões produzidos *in vitro*, e principalmente, os oócitos.

Desde os primeiros relatos de sucesso na vitrificação de embriões produzidos *in vitro* e oócitos bovinos, o laboratório de reprodução animal do CAV, assim como inúmeros parceiros, vem sistematicamente contribuindo com resultados expressivos, sendo essa constante busca por novos desafios, renovada a cada novo resultado. Alguns dos resultados que podem ser apontados são o nascimento de bezerros, após a vitrificação dos embriões em palhetas abertas estiradas (Vieira et al., 2002), o incremento na eficiência mediante métodos de envase alternativos (Bunn et al., 2008), e finalmente a melhora significativa na eficiência com a aplicação de vácuo no nitrogênio líquido (Santos et al., 2003, Mezzalira et al. 2009), tendo nesse caso específico, os estudos sido viabilizados graças a confecção do equipamento “Nitrocooler” (Figura 1), pelos então pesquisadores do laboratório (Alceu Mezzalira e Arnaldo Diniz Vieira), na época, e que vem sendo aperfeiçoado desde então, para que proporcionasse mais acurácia nas avaliações.



Figura 1 - Protótipos do “Nitrocooler”, ambos em versão com controle de pressão através da adaptação de um barômetro acoplado em seu sistema de sucção.

Fonte: próprio autor.

Em uma linha de pesquisa paralela, ainda com importantes parceiros, uma série de experimentos vem buscando incrementar os índices após a criopreservação de oócitos através de variações na própria solução que contém os crioprotetores (Ohlweiler et al. 2013, Mezzalira et al. 2017). Desse modo, a contribuição científica dessa instituição e a interação com o cenário da pesquisa nacional e mundial vem mostrando resultados expressivos conforme evoluem as técnicas e os índices de eficiência.

### 2.3 ESTRESSE CONTROLADO COMO ESTRATÉGIA PARA INCREMENTAR A RESISTÊNCIA CELULAR

Os variados procedimentos envolvidos nas técnicas de reprodução assistida, acabam exercendo alguma forma de estresse não controlado, em estruturas tais como oócitos e embriões. Uma crescente quantidade de relatos sobre estratégias que consistem em aplicar alguma forma de estresse sub letal, de maneira controlada, em gametas e embriões, principalmente durante as etapas da produção *in vitro*, têm consolidado que, ao menos na grande maioria das vezes, esse tipo de estratégia é benéfico. As principais modalidades já apresentadas envolvem formas de estresse sub letal baseado em aumento de pressão hidrostática, pressão osmótica, aquecimento ou estresse oxidativo.

Nossa opção pela aplicação da pressão negativa como forma de estresse controlado, foi embasada, além de o fato de dados a respeito da pressão negativa ainda serem escassos na literatura, na busca por uma modalidade que traga o mínimo de desvantagens possíveis. A pressão hidrostática positiva pode trazer como principal desvantagem a geração de estresse oxidativo; a pressão osmótica, aplicada em estruturas de origem variável, tal como é um pool

de oócitos oriundos de diferentes doadoras, pode acarretar danos mecânicos irreversíveis às organelas; já o aquecimento poderia acarretar a descaracterização de partículas lipídicas, sabidamente abundantes em oócitos e em embriões produzidos *in vitro*.

Entretanto, deve-se esclarecer que essas modalidades de tratamento com estresse sub letal, e até mesmo a utilização disso como estratégia para influenciar na sobrevivência, não foi algo pioneiro do ramo da embriologia (revisado por Pribenszky et al., 2010). Em meados de 1900, a aplicação de altas intensidades de pressão hidrostática já vinha sendo amplamente investigada, com a finalidade de aumentar o tempo de prateleira de gêneros alimentícios, entre tantos, se destacando os experimentos com leite, do pesquisador Hite (1899), que viveu entre 1866 e 1921. Na ocasião, Hite testava um cilindro hidráulico onde iniciou submetendo leite à alta pressão hidrostática positiva (Figura 2), combinando a variações na temperatura.

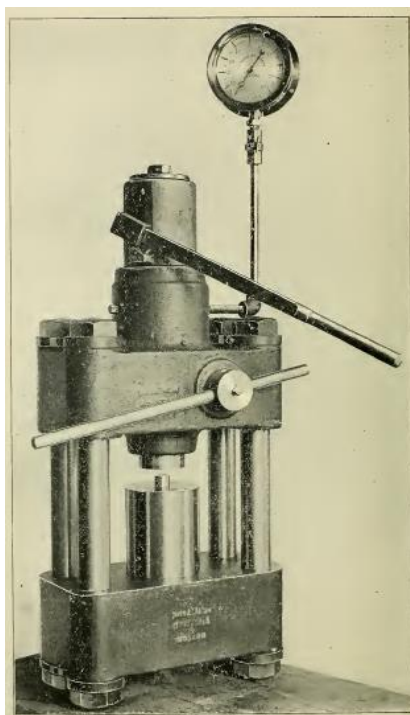


Figura 2 - Protótipo utilizado por Hite em 1899, para executar os experimentos sobre o efeito da pressão na preservação do leite.

Fonte: Hite, 1899.

Porém, o evento que talvez possa ser assinalado como marco do nascimento dessa linha de pesquisa, foi quando Wememkamp-Kamphuis et al. (2002) relataram que ao contrário do esperado, a associação de estresse pelo frio com o estresse por alta pressão hidrostática exacerbou a proliferação de bactérias *L. monocytogenes* ao invés de inibir, sendo esse evento confirmado mais tarde por Hayman et al. (2008). Aparentemente, os efeitos biológicos do primeiro estresse aplicado, o choque térmico, acabou pré-condicionando as

bactérias a passarem mais fortes pela segunda modalidade de estresse aplicado, nesse caso a pressão hidrostática positiva. Isso foi confirmado mais tarde com bactérias *E.coli*, (Aerstsens et al., 2004), quando o inverso ocorreu, com a *E.coli* se tornando mais resistente a choque térmico graças ao tratamento por pressão hidrostática positiva.

De uma maneira geral, embora os mecanismos celulares e sub celulares que supostamente contribuem na sobrevivência ou na mortalidade (Frey et al., 2008) de células e organismos atuem de forma orquestrada, esses processos agindo de forma isolada, requerem investigações posteriores, e com alta probabilidade de que se consigam respostas consolidadas somente a longo prazo.

O que se pode afirmar é que esse novo princípio, de por exemplo incrementar a tolerância a alguma forma de fatores estressantes inevitáveis, através da aplicação de variadas formas de estresse sub letal, está esboçando uma estratégia completamente nova em embriologia, e também um potencial promissor de contribuir com incrementos de eficiência importantes no campo da criopreservação.

Entre os principais resultados já conhecidos, podem ser apontados: uma melhor tolerância ao estresse por oócitos suínos tratados pela pressão hidrostática positiva (Pribenszky et al. 2008). Ainda, uma maior criotolerância de embriões suínos clonados utilizando como citoplasto receptor, oócitos previamente submetidos à pressão hidrostática positiva (Du et al. 2008).

A pressão hidrostática positiva também proporcionou um incremento dos parâmetros seminais em bovinos (Pribenszky et al. 2007), assim como maiores leitegadas após o tratamento de sêmen suíno (Kuo et al., 2008). Inclusive com ouriços do mar, já foi constatado que estes sobrevivem até a pressão positiva de 100-150 atm., dependendo da temperatura do ambiente em que se encontram (Tyler et al., 2000).

Em contra-partida, alguns dados relevantes obtidos pelo grupo de pesquisa do CAV, porém com a pressão negativa, foram: incremento na taxa de eclosão, quando blastocistos bovinos foram submetidos a pressão negativa (Mezzalira et al. 2010), sendo nesse estudo também estabelecido que o intervalo de recuperação ideal para o nosso sistema é de 2 h após submissão de embriões ao “Nitrocooler”. Para embriões bovinos vitrificados, o tratamento por pressão negativa anulou a diferença significativa entre embriões frescos e vitrificados (Albino et al., 2012), além de um incremento na criotolerância de sêmen ovino (Casali et al., 2014). A pressão negativa pode ser medida com o mesmo tipo de equipamento utilizado para medir a pressão hidrostática positiva. E ensaios já mostraram que a pressão negativa tem efetivo potencial de alterar a sobrevivência das estruturas por ela tratadas. Os princípios da resposta

fisiológica ao estresse podem ser extrapolados desde os seres unicelulares, menos desenvolvidos, até organismos complexos, tais como seres humanos. Ao enfrentar uma situação estressante, o organismo produz e libera fatores que irão desencadear a melhor adaptação possível ao fator estressor. Uma vez liberados tais fatores, o organismo em questão se torna um pouco mais tolerante mediante a mesma situação estressante, podendo ainda essa maior resistência ser extrapolada para outras situações, igualmente estressantes, porém de origem diferente da primeira. O que irá ocorrer após a liberação dos fatores de tolerância vai ser influenciado pela intensidade do estresse provocado, assim como pela intensidade da resposta. Existe um plateau hipotético, onde ao ultrapassar esse limite, os organismos podem desencadear problemas futuros, tais como a ocorrência de lesões, morte, ou problemas crônicos de saúde. A partir deste princípio, da resposta fisiológica ao estresse, assim como através de ensaios e de resultados prévios produzidos pelo nosso grupo de pesquisa, foram delineados os experimentos que compõem esse estudo, visando encontrar os fatores e as intensidades de estresse que não ultrapassem o limite da resposta fisiológica ao estresse, e aproveitando o desenvolvimento desses fatores de tolerância para incrementar a eficiência da produção de embriões e também da criopreservação.

Certamente, nas próximas décadas, a aplicação dessas novas estratégias para incrementar a eficiência das técnicas de reprodução assistida trará importantes avanços, com consequências impactando o que se tem de conhecimento teórico, e certamente também com uma ampla aplicação prática. Talvez esse possa ser um dos principais campos a contribuir para encurtar a distância entre a pesquisa acadêmica e a implementação das informações obtidas na esfera comercial, e finalmente, no campo.

## 2.4 MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA E MOLECULAR DO OÓCITO

A meiose, especificamente na fêmea, é sabidamente um processo que prioriza como resultado final uma única célula madura e haplóide, ao contrário do que ocorre com os gametas masculinos. Isso se dá justamente em função de toda a tarefa que o oócito precisa cumprir, até que haja a ativação do genoma do novo indivíduo gerado (Laurincik et al., 2003), após o processo de fecundação. Dentre os vários fatores já descritos por participarem desse processo, o que mais se destaca, independente da espécie em questão, é o MPF (“meiosis promoting factor”), que já está consagrado não apenas por sua participação importante na meiose, mas também na maturação oocitária e nas subsequentes mitoses (Gerace et al., 1980, Rime et al., 1988, Hyttel et al., 1996).

Os fenômenos que regem a expressão (ou seja, o aparecimento e desaparecimento) do fator promotor de maturação/mitose/meiose, ou simplesmente MPF, já foi descrito por diferentes autores para as espécies murina (Hashimoto e Kishimoto, 1988), sapos do gênero *Xenopus* (Gerhart et al., 1984) e estrelas do mar (Doreé et al. 1983). O que demonstra que esses eventos são bem conservados ao longo do processo evolutivo.

A melhor compreensão de todos os eventos envolvidos nas fases que antecedem, assim como no período logo após a ovulação, trouxe uma série de perguntas, que a medida que foram sendo respondidas, estabeleceram alguns conceitos muito simples de ser compreendidos. Até hoje se trabalha para que os sistemas de produção de embriões estejam de acordo com o que já se tem preconizado, conforme os eventos da dinâmica da maturação oocitária e da ovulação propriamente dita.

Por exemplo, a competência meiótica e o próprio desenvolvimento, são estabelecidos durante o crescimento do oócito, justamente nesse período que antecede a maturação nuclear (Anderiessz et al., 2000). Com isso, cada vez mais se procura aperfeiçoar os sistemas de produção de embriões e as técnicas de reprodução assistida, dando destaque para este período, que ocorre: ainda na fêmea, quando os oócitos são obtidos de doadoras; ou inicia a partir do momento que os folículos de ovários provenientes de abatedouro são aspirados, sendo posteriormente os oócitos recuperados.

Independente da forma de obtenção dos oócitos, pode-se empregar o mesmo raciocínio desenvolvido a partir dos resultados de Blondin (1997) e Blondin et al. (2002), que enfatizam as evidências fisiológicas encontradas em alguns estudos muito esclarecedores, no que se entende pela obtenção do oócito que seja o mais capacitado possível. Nesse caso, os oócitos foram obtidos e maturados *in vivo*, para a posterior produção de embriões *in vitro*.

Quando a supressão de FSH (hormônio folículo-estimulante) em vacas super-estimuladas foi feita por 48 h (15 h a mais do que as convencionais 33 h de supressão), houve um incremento no diâmetro folicular médio, que apesar de poder estar correlacionado com melhor qualidade oocitária, não demonstrou diferença nesse estudo. Entretanto, quando avaliada a eficiência na produção de blastocistos, após esse “coasting” por período adicional de 15 h, esses índices foram estatisticamente superiores. Esse mesmo efeito benéfico foi obtido com a administração de LH (hormônio luteinizante), 6 h antes da aspiração folicular para a obtenção dos oócitos.

Os autores especularam que as mudanças fisiológicas proporcionadas pela administração de LH proporcionaram um ambiente mais parecido com o ambiente folicular, no momento próximo da ovulação, e com isso, fatores promotores da maturação

citoplasmática podem ter sido liberados. Deve-se enfatizar ainda que, os oócitos recuperados 6 horas (Blondin et al., 2002) após a administração de LH, ainda se encontravam imaturos, pois já está estabelecido que são necessárias no mínimo 9 h para que a maturação *in vivo* ocorra. Esse período era proporcionado aos oócitos no ambiente folicular, porém antes da sua maturação, ou seja, antes da retomada da meiose; sendo que este manejo parece ter sido primordial para o incremento nas taxas de desenvolvimento embrionário obtidos através dessa estratégia.

Com isso, uma possível estratégia para mimetizar esse período onde se permite mais tempo para a maturação citoplasmática, sem a interferência da maturação nuclear, pode ser investigada através de protocolos de pré-maturação, onde se trabalha com folículos que já foram aspirados. Com essa manipulação, se tem um oócito que está em processo de retomada da meiose. Nesse ponto, se confere uma espécie de período de pausa na maturação nuclear, onde, com a cromatina em “stand by”, apenas fatores citoplasmáticos aproveitam esse período para acomodar-se ao meio e aos demais fatores envolvidos no sistema de maturação *in vitro*, proporcionando assim um tempo importante para que (antes da entrada dos oócitos em metáfase II) muito do ambiente em que se encontram, tenham sido assimilados pelas demais organelas. Em outras palavras, o “*coasting*” não deixa de ser uma estratégia de incremento na adaptação.

A hipótese que se cria nesse contexto é de que assim, as condições terão se tornado mais fisiológicas em comparação a não proporcionar essa espécie de “período de adaptação” caso os mesmos oócitos não fossem manejados de maneira a lhes permitir essa presumível vantagem.

## 2.5 PRÉ-MATURAÇÃO DE OÓCITOS E OS EFEITOS CONHECIDOS DO 6-DMAP

Foi ainda em meados dos anos 80, que um análogo da puromicina, chamado de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP), começou a ser utilizado com o intuito de testar as respectivas funções da síntese e da fosforilação de proteínas no processo de retomada da meiose (Rime et al, 1989). Desde então, já se tem relatos de que ao passo que os inibidores da síntese de proteínas não conseguem bloquear a retomada da meiose, o 6-DMAP se mostrou capaz de inibir a quebra da vesícula germinativa, através do processo de inibição da fosforilação proteica.

Além disso, já foi estabelecido que esse processo é reversível, dependendo da concentração utilizada. Seus efeitos em oócitos que já sofreram a quebra da vesícula

germinativa incluem: redução do nível de fosforilação proteica, indução da descondensação cromossômica e reformulação do envelope nuclear. Esses efeitos são válidos para oócitos que ainda não extrusaram o primeiro corpúsculo polar, pois nesse caso, já em estágio de metáfase II, o efeito seria apenas de manter o núcleo em uma espécie de “pausa” (ou repouso).

A ativação partenogenética utilizando 6-DMAP é sabidamente mais indicada para oócitos bovinos (Hou et al., 2009), em função de algumas particularidades. Se comparado, por exemplo, com a cicloheximida, as vantagens incluem o fato de que o DMAP inibe a atividade do MPF através da rota do MAPK (“mitogen activated protein kinase”) (Motlik et al., 1998; Gordon et al., 2000). Já a cicloheximida, por atuar diretamente na síntese de proteínas, poderia restringir o acúmulo de ciclina B. Com isso, poderia bloquear a re-síntese de MPF. O MPF deve ser mantido baixo, porém, precisam restar subsídios (substrato) para que ele possa posteriormente reaparecer. Caso contrário, haveria uma precoce retomada da meiose II e consequente ativação do oócito, antes do momento adequado. Ainda, o 6-DMAP sabidamente causa a extrusão do corpúsculo polar (Susko-parrish et al., 1994), gerando assim um partenoto diplóide, que hipoteticamente, passaria melhor nos pontos de checagem (Bates & Vousden, 1996) do ciclo celular (“checkpoints”), do que um embrião por exemplo tetraplóide, podendo se dever a isso o fato da sua melhor eficiência. Apesar dessas informações sobre a ploidia dos embriões não terem sido acessadas em nosso sistema de produção de embriões, essas informações formam embasamento suficiente para justificar o uso do 6-DMAP.

Somado a isso, tem-se o fato de que a molécula já vem sendo utilizada no nosso protocolo de ativação, em experimentos com a clonagem de bovinos. Após alguns pilotos (dados não publicados), foi estabelecido que a mesma concentração utilizada no protocolo de ativação seria compatível com os tratamentos de pré-maturação realizados. Já o tempo de exposição ao DMAP, que foi de 3 h, foi estabelecido com base em três fatores (dados não mostrados): o tempo máximo de duração dos tratamentos pré-maturação, que não afetasse a ativação, em função de envelhecimento do oócito (28-30 h no máximo, preconizando sempre que possível 28 h); o tempo máximo em que os oócitos, quando ativados, permanecessem no DMAP sem começar a apresentar evidências morfológicas de progressão do ciclo celular (4-6 h, sendo que com 6 h os oócitos já apresentavam alongamento, alteração morfológica típica de entrada em citocinese); e tempo mínimo necessário para que a exposição do DMAP causasse algum efeito positivo na ativação oocitária (a partir de 2 h já houve alteração nas taxas de clivagem).



## 2.6 COMO OS MARCADORES DE APOPTOSE PODEM AUXILIAR A MENSURAR O ESTRESSE CELULAR EM UM SISTEMA DE CULTIVO

Embriões bovinos produzidos *in vitro* já foram previamente descritos como possuidores de um índice de apoptose inversamente relacionado ao número de blastômeros (Byrne et al., 1999), o que indica que após a ativação inicial, (que por si só já gera uma primeira incidência de apoptose) essa mortalidade celular programada reduz, conforme o blastocisto expande. Ainda, foi observado que a maior incidência de apoptose se concentrou em células da massa celular interna, em detrimento das do trofotoderma.

De acordo com dados publicados por Bates & Vousden (1996), antes da ativação do genoma os transcritos específicos relacionados à morte celular estão abaixo de um limiar, sendo que essa informação vem de encontro ao mecanismo proposto por Matwee et al. (2000), pelo qual embriões bovinos combinam fatores estressantes ambientais com anormalidades cromossômicas. Com isso, esses embriões podem ser capazes de acomodar células danificadas ou anormais, à medida que o embrião vai progredindo, indicando que em estágios tardios, os embriões assumem um maior potencial de desenvolvimento.

É interessante ressaltar que, apesar de em última instância, a apoptose representar a morte celular, esta foi o escopo (Hardy, 1997) de análises que revelaram particularidades que a diferenciam de outros tipos de morte celular, como por exemplo a necrose. Enquanto a necrose é caracterizada principalmente por desintegração nuclear, inchaço do núcleo e ruptura das membranas celulares internas e externas com derramamento de enzimas e iminente dano causado às células adjacentes, a apoptose possui como característica marcante afetar células individuais, e não grupos ou células adjacentes, a não ser que tenham efetivamente sido programadas para tal. É, portanto, mais comumente pensada como uma morte celular direcionada (Schimke et al. 1994, Ko & Prives, 1996), que ocorre para assegurar o desenvolvimento normal, a diferenciação, quando for o caso, e também eliminar células portadoras de defeitos ou danos que poderiam comprometer o desenvolvimento e o funcionamento de sistemas/organismos.

As mitocôndrias são organelas comumente afetadas nas mais variadas modalidades de técnicas de reprodução assistida. Entre tantas atribuições que estas organelas possuem, uma delas é a liberação do citocromo-C, que é o responsável por ativar a caspase (revisado por Reed, 1997). Por isso, pode-se partir do princípio de que em um ambiente celular que contém abundância de citocromo-C e ausência de inibidores de caspases, a célula que passa por

alguma situação estressante vai entrar em apoptose, porém com sua própria morte programada ela irá manter o transporte de elétrons funcionando.

Caso contrário, em um ambiente celular que está sofrendo estresse, mas é desprovido de caspases, ou se tem abundantes inibidores destas, ou ainda há pouca concentração de citocromo-C, e o processo de apoptose não é induzido. Assim, essas células sobrevivem por um período mais longo, que irá culminar com a morte de qualquer forma, mas sem manter a integridade do transporte de elétrons. O resultado disso vai ser a necrose, que como já apresentado, é um processo mais danoso em comparação com a apoptose, por destruir células adjacentes e ainda por liberar produtos de lise e substâncias tóxicas (Green & Reed, 1998).

Apesar de todas essas variáveis, já está consolidado que, dentro de um mesmo sistema, variações de protocolo e manipulações *in vitro* podem afetar o índice de apoptose (Matwee et al., 2000). Inclusive, já foi hipotetizado por Weil et al. (1996) que todas as células nucleadas de mamíferos detêm o potencial de entrar em apoptose, ou seja, o que pode ser alterado é a rota e em que condições ela irá ou não acontecer. As alterações morfológicas causadas pela apoptose na célula envolvem condensação citoplasmática e de cromatina, além da separação do núcleo em discretas massas e da clivagem do DNA (Matwee et al., 2000).

Dessa forma, a informação de proporção de células embrionárias afetadas ou não por essa cascata, pode gerar informações importantes nos aspectos de menor estresse possível, ocasionado pelo sistema de produção. Por outro lado, informações de resposta e/ou tolerância ao estresse, combinadas, podem trazer novas estratégias para o sucesso da técnica de produção de embriões.

## 2.7 ASPECTOS GERAIS DA IMPORTÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO PARA A EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Conforme já está estabelecido e consolidado, a investigação de protocolos que busquem melhor eficiência após a criopreservação de oócitos e produção *in vitro* de embriões a partir destes, promove avanços magníficos do ponto de vista comercial. A busca incessante pelo incremento da eficiência, que nem seria cogitada poucas décadas atrás, parte não só do estímulo de manter ou melhorar a qualidade genética e a lucratividade da pecuária. Mas também, da busca em promover maior liberdade na escolha dos acasalamentos, independente dos índices atuais de determinados doadores de genética, além do incremento das possibilidades de conservação de gametas e embriões de qualidade inferior, ou de animais que

não estivessem adequadamente preparados para fornecer seu genoma para as técnicas de reprodução assistida.

Já na esfera acadêmica, os mecanismos e protocolos investigados, assim como as informações geradas e interpretadas no decorrer desse estudo irão gerar informações importantes para elucidar, através desses novos dados, fenômenos que já sabidamente regem o desenvolvimento embrionário e em última instância, o sucesso após a implantação.

Para isso, esse estudo contemplou quatro fases, com os respectivos enfoques em buscar: a intensidade de pressão negativa ideal a ser utilizada em oócitos; a intensidade de pressão negativa ideal a ser utilizada em embriões; as melhores condições de pré-maturação para oócitos; e finalmente, a associação dos fatores que previamente proporcionaram melhor desempenho, com a concomitante criopreservação de oócitos bovinos imaturos.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários obtidos em abatedouro foram transportados até o laboratório, em recipiente térmico contendo solução fisiológica em temperatura ambiente (25-30°C). Os complexos cumulus-*oophorus* (ou simplesmente oócitos) foram obtidos por aspiração dos folículos com auxílio de uma bomba de vácuo, e selecionados sob lupa estereomicroscópica no próprio fluido folicular. Em todos os experimentos foram utilizados apenas oócitos de qualidade boa ou excelente conforme critério morfológico previamente descrito (Ohlweiler et al., 2013).

#### 3.2 SUBMISSÃO DOS OÓCITOS A PRESSÃO NEGATIVA

Os oócitos eram submetidos às diferentes intensidades de pressão negativa em tubos de 1,5 mL, sendo que estes, desde a aspiração dos folículos, passavam pela recuperação e seleção, sempre mantidos no próprio líquido folicular, onde também eram submetidos aos tratamentos de pressão negativa.

Para tal, os tubos contendo 0,4 mL de líquido folicular centrifugado e os oócitos alocados em cada grupo experimental eram colocados dentro da câmara hermética do equipamento (“Nitrocooler”), que era fechada antes de ligar o equipamento. O Nitrocooler era então ligado com incremento de pressão de 33 mBar/seg de maneira contínua, até atingir a pressão desejada (250, 500 ou 750 mBar), sendo a respectiva pressão mantida por 1 min. Após, o motor do equipamento era desligado, porém a válvula era mantida fechada por mais 3 min. A pressão era então gradualmente diminuída (5 mBar/seg), através de cuidadosa abertura manual da própria válvula, até atingir a pressão atmosférica. Em seguida, os tubos contendo os oócitos (ainda mantidos no próprio líquido folicular) eram retirados do equipamento, seu conteúdo era depositado em uma placa onde os oócitos eram recuperados, submetidos a lavagens em meio de maturação ou conforme o tratamento do respectivo grupo experimental.

Em seguida, os oócitos eram destinados a maturação *in vitro*, ou eram submetidos a algum dos protocolos de pré-maturação. Independente do caso, qualquer tratamento adicional era realizado pelo menos 2 h após os tratamentos com a pressão, e os oócitos durante este intervalo eram sempre mantidos em condições controladas de incubação, a 38,5°C, em umidade saturada e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

### 3.3 VITRIFICAÇÃO DOS OÓCITOS E MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os oócitos previamente selecionados por critério morfológico foram vitrificados de acordo com metodologia descrita anteriormente (Santos et al., 2006, Bunn et al., 2008, Mezzalira et al., 2017). Resumidamente, os oócitos eram primeiramente expostos à solução de equilíbrio, contendo meio de manipulação (TCM-Hepes + 10% de soro fetal bovino) acrescido de 10% etileno glicol (EG) + 10% dimetilsulfóxido (DMSO) durante 30 s, e em seguida transferidos para a solução de vitrificação, contendo 20% EG + 20% DMSO + 0,48 M sacarose (SAC). Gotas de 2-3  $\mu\text{L}$  desta solução, contendo 3 a 5 oócitos eram aspiradas por capilaridade para a extremidade estirada da micropipeta de vidro, sendo esta imersa em nitrogênio líquido ( $\text{N}_2\text{L}$ ) super-resfriado. O tempo total na solução de vitrificação antes da imersão em  $\text{N}_2\text{L}$  era de 25 s.

Para o reaquecimento, a micropipeta era retirada do  $\text{N}_2\text{L}$ , exposta por 2 s ao ar, e cerca de apenas 2 s após, era imersa em poço contendo 0,26 M SAC, durante 5 min. Os oócitos eram então transferidos para solução de 0,16 M SAC, onde permaneciam por mais 5 min. Em seguida os oócitos eram transferidos para poço contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio de manipulação, onde permaneciam por 5 min ou até o momento de serem transferidos para a maturação *in vitro* ou para os tratamentos de pré-maturação.

O meio de maturação (MIV) consistia de TCM-199 acrescido de 5,95 mg/mL de Hepes, 2,62 mg/mL de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,025 mg/mL de piruvato de sódio, 0,01 IU/mL de FSH, 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de LH, e 10% v/v de soro fetal bovino. Ao passo que a pré-maturação era feita nesse mesmo meio, porém desprovido das gonadotrofinas e do soro fetal bovino. Ainda, a pré-maturação era acrescida ou não de 5  $\mu\text{M}$  de 6-DMAP. As condições de incubação eram sempre as mesmas (10 oócitos /  $\mu\text{L}$ ), em estufa, com umidade saturada (95% de umidade), em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  em ar, durante o período de 18 a 24 h, dependendo da submissão ou não à pré-maturação.

### 3.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Para a fecundação *in vitro*, foi utilizado sêmen criopreservado de um touro *Bos taurus*, proveniente de empresa comercial, previamente testado em nossas condições, antes do início das sessões. Após o descongelamento a  $36^\circ\text{C}$ , os espermatozoides foram selecionados pela técnica de mini-percoll modificada (Ohlweiler et al., 2013) em meio TALP-Sperm. Após ajustar a dose inseminante para  $1 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/mL, os oócitos maturados e

os espermatozoides eram co-incubados em meio TALP-Fert suplementado com BSA (6 mg/mL piruvato (0,022 mg/mL), heparina (30  $\mu$ g/mL) e PHE (penicilamina 30  $\mu$ g/mL, hipotaurina 15  $\mu$ M, epinefrina 1  $\mu$ M), durante 18-24 h.

### 3.5 DESNUDAMENTO DOS OÓCITOS, SELEÇÃO DOS MATURADOS E ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

Os oócitos que não eram destinados a fecundação *in vitro*, eram submetidos ao desnudamento logo após o término do período de maturação. Para tal, estes eram submetidos a pipetagens sucessivas, no próprio poço da placa em que se encontravam, que era acrescido de 200  $\mu$ L de meio de manipulação para manutenção do pH.

Para a seleção, os oócitos eram examinados sob lupa estereomicroscópica, sendo apenas os que apresentassem a extrusão do primeiro corpúsculo polar mantidos e submetidos ao protocolo de ativação partenogenética conforme descrito previamente (Ribeiro et al. 2009), mediante exposição a 5  $\mu$ M de ionomicina em meio de manipulação durante 5 min seguido da exposição em 2 mM de 6-DMAP em meio de cultivo, durante 3-4 h.

### 3.6 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* era também realizado em placas de 4 poços contendo 400  $\mu$ L de meio SOFaaci (10 embriões /  $\mu$ L) suplementado com 5% de soro fetal bovino, sob óleo mineral, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>, a 38,5°C, durante 7 dias, quando eram então avaliados e, dependendo do caso, alocados nos respectivos grupos experimentais ou fixados para avaliações por imunofluorescência.

### 3.7 SUBMISSÃO DOS BLASTOCISTOS À PRESSÃO NEGATIVA

Os embriões eram submetidos às diferentes intensidades de pressão negativa dentro da própria placa de cultivo, pois as manipulações não excediam o tempo usual de manutenção do meio de cultivo fora da estufa, e além disso, já havia sido previamente constatado que o pH do meio não alterava significativamente, inclusive em função do período de submissão ao vácuo.

Para tal, a placa de cultivo contendo os embriões era colocada dentro do container hermético do equipamento (Nitrocooler) que tinha sua tampa fechada antes de ligar o equipamento. O equipamento era então ligado com incremento de pressão de 33 mBar/seg de

maneira contínua, até atingir a pressão desejada (250, 500 ou 750 mBar) que era mantida por 1 min. Após, o equipamento era desligado, porém mantendo a válvula fechada por mais 3 min. A pressão era então gradualmente diminuída (5 mBar/seg), através de cuidadosa abertura manual da própria válvula, até atingir a pressão atmosférica. Em seguida, a placa de cultivo mantendo os embriões era removida do equipamento, e retornava para a estufa para seguir em condições controladas de incubação até o prosseguimento dos tratamentos. A vitrificação dos embriões era iniciada duas horas após o término da aplicação do estresse.

### 3.8 VITRIFICAÇÃO E REAQUECIMENTO DOS EMBRIÕES

Os blastocistos e blastocistos expandidos no dia sete de cultivo foram transferidos para uma solução de equilíbrio, que consistia de meio de manipulação contendo 10% EG + 10% DMSO, durante 60 s, e em seguida eram depositados na solução de vitrificação, contendo 20% EG + 20% DMSO em meio de manipulação. Os embriões eram então envasados em gotas de 1-2  $\mu$ L do mesmo meio, em número de 3-6 dentro de micropipetas de vidro de aproximadamente 0,6 mm de diâmetro, e imersos imediatamente em  $N_2L$ . O tempo total na SV antes da imersão em  $N_2L$  era de 25 s. Para o reaquecimento, a micropipeta era retirada do  $N_2L$ , exposta por 2 s ao ar sendo imediatamente imersa em poço contendo 0,26 M SAC durante 5 min, sendo os oócitos transferidos para solução de 0,16 M SAC, onde permaneciam por mais 5 min. Em seguida os oócitos eram transferidos para o poço de uma placa de cultivo, contendo 500  $\mu$ L de meio de manipulação, onde permaneciam até o momento de serem transferidos para a placa de cultivo para posterior avaliação da progressão do desenvolvimento embrionário.

### 3.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliação da incidência de apoptose nos blastômeros, blastocistos foram submetidos a técnica de imunofluorescência (IF), para detecção de caspase-3 clivada (Coutinho et al. 2001). Para isso, os embriões foram coletados e fixados por 20 min em formaldeído a 4% com 3% de BSA. Os embriões foram então incubados em PBS suplementado com 3% BSA e 0.5% Triton X-100 por 1 h, a 37°C. Após, os embriões eram lavados 2 vezes em solução de bloqueio (PBS com 0.2% de Tween-20 e 3% BSA) sendo então expostos ao anticorpo primário anti-caspase 3 clivada (CC3) de coelho anti-camundongo, por 2 h, sendo que este era diluído em solução de bloqueio na proporção 1:400.



Após, as amostras eram lavadas 3 vezes por 20 min em solução de bloqueio, sendo então incubadas por 2 h a 37°C, na presença do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho, na proporção de 1:1000. Os embriões eram então lavados em solução de bloqueio contendo Hoechst 33342. Para visualização, os embriões eram montados entre lâmina e lamínula em uma gota de Mowiol e observados sob luz ultra-violeta em microscópio de epi-fluorescência invertida. O número de células positivas para CC3 foi contado em cada embrião, sendo a sua proporção avaliada em relação ao número total de células dos embriões, a qual era realizada utilizando-se DAPI, em PBS, na diluição de 1:700.

### 3.10 AVALIAÇÕES E CRITÉRIOS DE VIABILIDADE EMBRIONÁRIA

As avaliações consideradas como critério de viabilidade foram variáveis conforme a fase do estudo e conforme o experimento.

Nos experimentos em que ao menos um dos tratamentos era a submissão de oócitos imaturos à criopreservação e estes posteriormente ativados por partenogênese, o primeiro critério de viabilidade considerado foram as taxas de maturação. Esta levava em consideração a ocorrência da extrusão do primeiro corpúsculo polar, ou seja, quando detectada a presença do corpúsculo polar, o oócito era considerado maturado. Oócitos mortos, com aspecto de degeneração ou lise no citoplasma, assim como oócitos com aspecto saudável, porém desprovidos do corpúsculo polar, eram considerados todos como não maturados.

Nos experimentos em que os tratamentos eram realizados em oócitos imaturos, porém sem submissão à criopreservação, o primeiro critério de viabilidade avaliado era a taxa de clivagem, ao dia 2 de cultivo.

Quando os tratamentos eram realizados nos embriões (em estágio de blastocisto), os critérios de viabilidade considerados eram as taxas de eclosão dos mesmos. Eram considerados eclodidos os embriões que já estavam com pelo menos 80% de seu volume já para fora da zona pelúcida, conforme avaliação subjetiva realizada sob lupa estereomicroscópica.

Para a avaliação de mortalidade celular, o critério foi a expressão de caspase-3 clivada, que foi analisada por técnica de imunofluorescência. Células que expressaram a caspase foram consideradas em apoptose. Os blastômeros não apoptóticos foram contabilizados mediante a coloração por DAPI, e a proporção de células apoptóticas, para cada tratamento, foi considerada.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados qualitativos (porcentagem de clivagem, de desenvolvimento a blastocisto, re-expansão e eclosão) foram analisados pelo teste de qui-quadrado. Os valores de quantidade de células totais e de células positivas para caspase-3 clivada foram submetidos a análise de variância e comparadas pelo teste T de Student (para comparação de até 3 grupos) ou teste de Tukey (para comparação de mais de 3 grupos).

Todos os dados foram analisados utilizando o software JMP versão 5, 2002 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando significativo  $P \leq 0.05$ .

## 4 DESENHO EXPERIMENTAL

Esse estudo foi conduzido em quatro fases, com o objetivo de selecionar o protocolo que proporcione o melhor desempenho em termos de taxa de desenvolvimento e melhor qualidade e competência embrionárias.

Na primeira fase do estudo, dois experimentos foram conduzidos, buscando identificar a melhor intensidade de pressão negativa a ser aplicada em oócitos imaturos, e avaliando o posterior desenvolvimento embrionário, além do efeito das intensidades de pressão negativa na posterior criotolerância dos embriões quando atingem o estágio de blastocisto.

### 4.1 FASE I: DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA PARA SER REALIZADA EM OÓCITOS IMATUROS E SEU EFEITO NA POSTERIOR CRIOTOLERÂNCIA DOS EMBRIÕES

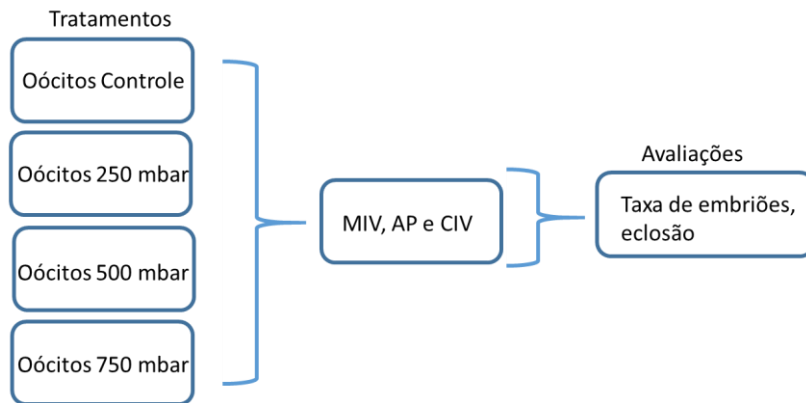
A fase I desse estudo englobou os experimentos 1 e 2. O experimento 1 buscou determinar a melhor intensidade de pressão negativa a ser empregada nos oócitos bovinos imaturos. Já o experimento 2 determinou o efeito de diferentes intensidades de pressão negativa aplicadas nos oócitos, sobre a criotolerância dos embriões derivados.

#### 4.1.1 Experimento 1

Nesse experimento, o objetivo foi avaliar os efeitos das diferentes intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar), sobre as taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos a ativação partenogenética. Para isso, complexos cumulus-oócito imaturos de bovinos foram selecionados ( $n = 999$ ) e submetidos a 0, 250, 500 ou 750 mBar de pressão negativa, e os grupos experimentais, que foram submetidos a 250 mBar, 500 mBar ou 750 mBar de pressão negativa, respectivamente.

Após os tratamentos, todos os oócitos foram submetidos aos procedimentos padrão de maturação *in vitro*, ativação partenogenética e cultivo *in vitro*. Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão.

## Organograma do Experimento 1:



Os embriões foram produzidos por ativação partenogenética

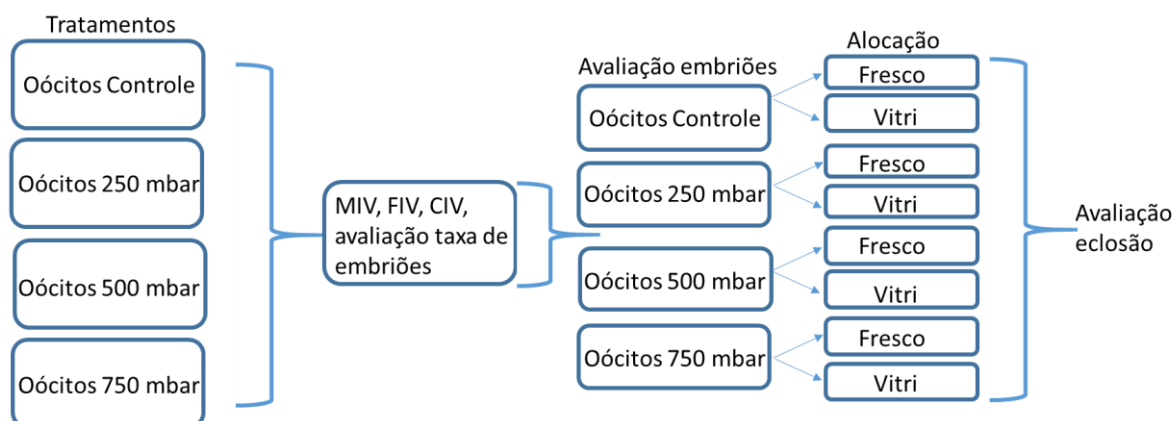
#### 4.1.2 Experimento 2

Nesse experimento, o objetivo foi avaliar os efeitos das diferentes intensidades de pressão negativa aplicadas nos oócitos imaturos, sobre o desenvolvimento embrionário após fecundação *in vitro*, bem como o possível efeito na posterior criotolerância destes embriões.

Para tal, foram selecionados oócitos bovinos imaturos foram selecionados ( $n = 3.059$ ) e alocados em um dos 4 grupos experimentais, sendo um grupo controle, não submetido à pressão, e os grupos experimentais submetidos a 250 mBar, 500 mBar ou 750 mBar de pressão negativa, respectivamente.

Após os tratamentos, todos os oócitos foram submetidos aos procedimentos padrão de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de clivagem e de blastocistos, após a fecundação *in vitro*, bem como as taxas de eclosão dos blastocistos frescos ou vitrificados.

## Organograma do Experimento 2:



Os embriões foram produzidos por fecundação *in vitro*

#### 4.2 FASE II: DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA A SER UTILIZADA EM EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E TRATADOS NO ESTÁGIO DE BLASTOCISTO

A fase II desse estudo englobou os experimentos 3 e 4. O experimento 3 buscou determinar a melhor intensidade de pressão negativa a ser aplicada em embriões no estágio de blastocisto. Já o experimento 4, comparou o efeito da melhor pressão negativa avaliada sobre a sobrevivência à criopreservação dos blastocistos tratados. Como controle foram utilizados blastocistos não tratados.

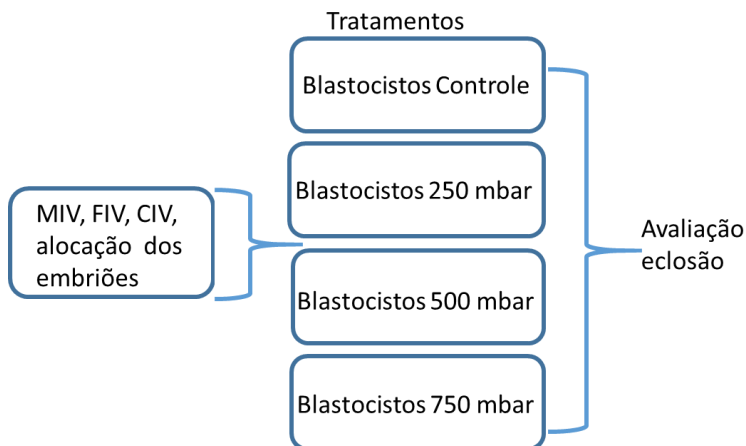
##### 4.2.1 Experimento 3

Nesse experimento, o objetivo foi avaliar os efeitos das diferentes intensidades de pressão negativa, aplicadas sobre os embriões em estágio de blastocisto.

Para tal, oócitos bovinos imaturos foram selecionados e submetidos aos procedimentos padrão de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Após avaliação das taxas de blastocisto, estes ( $n = 374$ ) foram distribuídos uniformemente nos grupos experimentais, sendo um grupo controle, não submetido à pressão, e os grupos experimentais submetidos a 250, 500 ou 750 mBar de pressão negativa, respectivamente.

Como critérios de viabilidade foram utilizados: taxas de eclosão dos blastocistos submetidos aos tratamentos.

## Organograma do Experimento 3:



Os embriões foram produzidos por fecundação *in vitro*

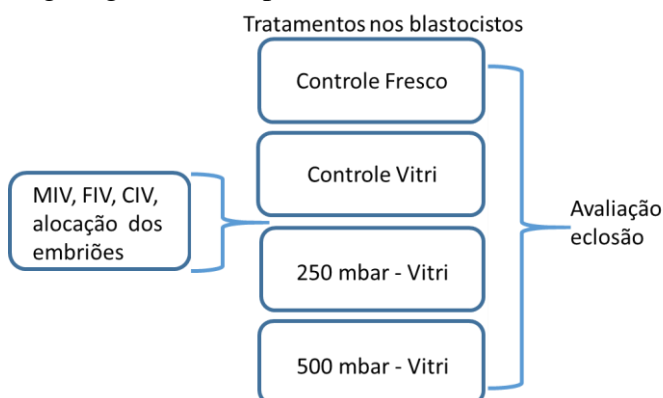
#### 4.2.2 Experimento 4:

Nesse experimento, o objetivo foi avaliar os efeitos da melhor intensidade de pressão negativa eleita no experimento 3, na criotolerância de embriões em estágio de blastocisto. Como não foram encontradas diferenças conclusivas nos efeitos das pressões de 250 e 500 mBar, optou-se por avaliar ambas.

Para tal, oócitos bovinos imaturos foram selecionados e submetidos aos procedimentos padrão de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Após avaliação das taxas de blastocisto, estes (n = 288) foram distribuídos uniformemente conforme os grupos experimentais, sendo dois grupos controle, não submetido à pressão, sendo um mantido fresco e o outro submetido a criopreservação. Já os grupos experimentais foram submetidos a 250 ou 500 mBar de pressão negativa, respectivamente.

Como critérios de viabilidade, foi considerada a taxa de eclosão dos blastocistos dos diferentes tratamentos.

Organograma do experimento 4:



Os embriões foram produzidos por fecundação *in vitro*

#### 4.3 FASE III: DETERMINAR AS CONDIÇÕES IDEAIS DE PRÉ-MATURAÇÃO

A fase III desse estudo englobou os experimentos 5 e 6. O experimento 5 buscou determinar as melhores condições de pré-maturação para oócitos bovinos, com o propósito de empregar este tratamento em oócitos destinados à criopreservação. Já o experimento 6, buscou associar a melhor condição de pré-maturação eleita no experimento 5, ao melhor tratamento de estresse controlado (500 mBar) por pressão negativa.

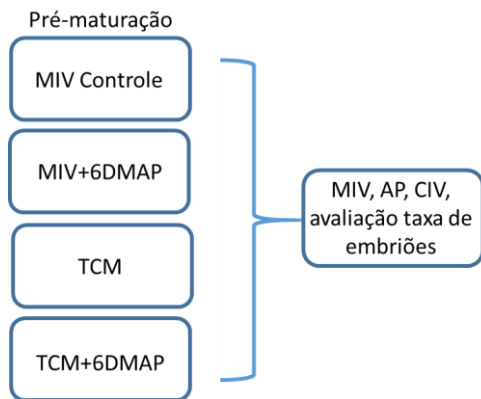
##### 4.3.1 Experimento 5

O objetivo do experimento 5 foi estabelecer a melhor condição para a pré-maturação de oócitos bovinos, buscando maximizar as taxas de desenvolvimento embrionário.

Para tal, oócitos imaturos ( $n = 627$ ) foram selecionados e alocados aleatoriamente nos seguintes tratamentos: meio padrão de maturação (MIV controle), meio padrão adicionado do bloqueador meiótico 6-dimetil-amino-purina (MIV + 6DMAP), meio padrão desprovido de gonadotrofinas e soro fetal (TCM), meio desprovido de gonadotrofinas e soro fetal, porém acrescido do bloqueador de ciclo celular (TCM + 6-DMAP).

Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de desenvolvimento embrionário e taxa de eclosão dos blastocistos.

### Organograma do Experimento 5:



Os embriões foram produzidos por ativação partenogenética

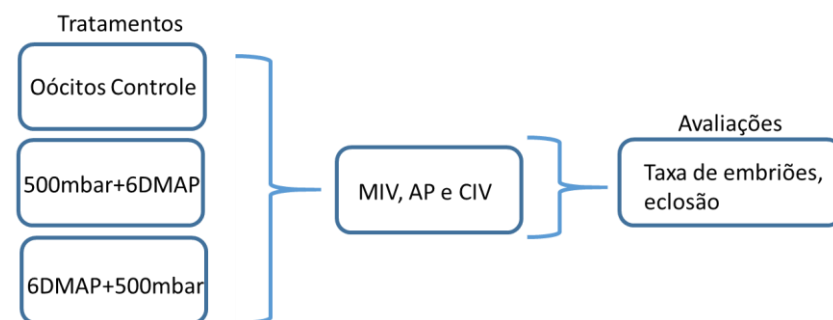
### 4.3.2 Experimento 6

O objetivo do experimento 6 foi avaliar a associação da pré-maturação eleita no experimento 5, ao tratamento de 500 mBar de pressão negativa. Ainda, determinar qual a melhor ordem de execução dos tratamentos propostos.

Para tal, oócitos imaturos (858) foram selecionados e alocados aleatoriamente nos seguintes tratamentos: maturação *in vitro* padrão, submissão à pressão (500 mBar) seguida da pré-maturação no 6-DMAP, e pré-maturação em 6-DMAP seguida da submissão a 500 mBar de pressão negativa.

Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de desenvolvimento embrionário e taxa de eclosão dos blastocistos.

### Organograma do Experimento 6:



Os embriões foram produzidos por ativação partenogenética



#### 4.4 FASE IV: ASSOCIAÇÃO DA PRÉ-MATURAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

A fase IV desse estudo englobou os experimentos 7 e 8. O experimento 7 buscou determinar a melhor condição de manutenção para oócitos imaturos no período compreendido entre a submissão à pressão negativa (500 mBar) e a execução da criopreservação. Já o experimento 8 comparou as condições de pré-maturação avaliadas nas diferentes fases desse estudo com a posterior criopreservação dos oócitos, em última instância buscando a interação dos fatores que isoladamente proporcionaram os melhores resultados.

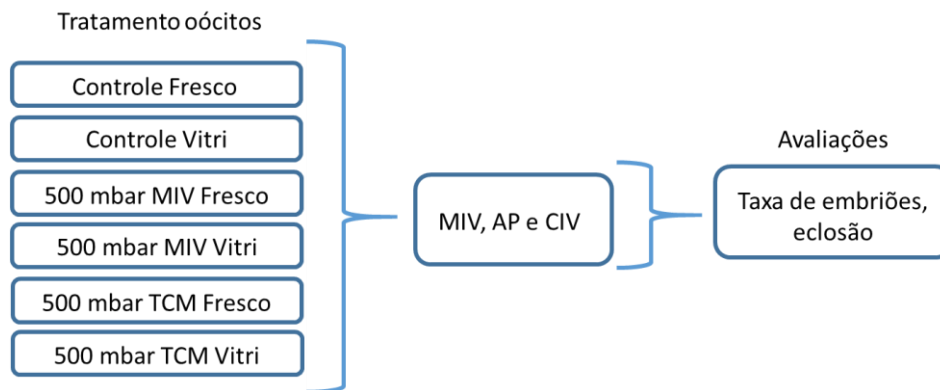
##### 4.4.1 Experimento 7

O objetivo deste experimento foi combinar a submissão de oócitos imaturos a pressão negativa de 500 mBar com a posterior criopreservação dos mesmos, porém buscando ainda a melhor condição para a recuperação destes entre a submissão à pressão e a execução da vitrificação.

Para tal, oócitos imaturos foram selecionados e alocados ( $n = 1.625$ ) aleatoriamente nos seguintes tratamentos: maturação *in vitro* padrão, vitrificação padrão, submissão à pressão (500 mBar) seguida da vitrificação com recuperação em meio padrão, submissão à pressão (500 mBar) seguida da vitrificação com recuperação em meio desprovido de gonadotrofinas e soro fetal. Cada um dos tratamentos com criopreservação possuía um grupo semelhante que não foi submetido a vitrificação, para que se pudesse isolar o dano ocasionado pela criopreservação, dos danos ocasionados pelas condições de manutenção entre os tratamentos.

Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de desenvolvimento embrionário e as taxas de eclosão dos blastocistos.

## Organograma do Experimento 7:



Os Embriões foram produzidos por ativação partenogenética

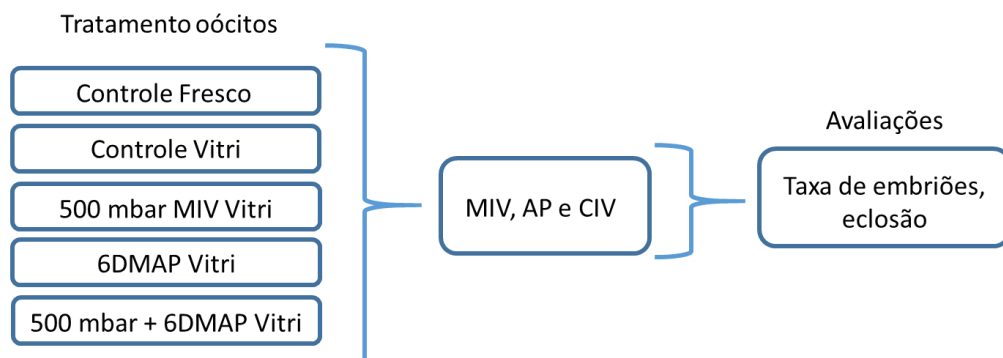
#### 4.4.2 Experimento 8

O objetivo do experimento 8 foi combinar a condição de recuperação pós- submissão à pressão eleita previamente (no experimento 7), ao tratamento com o bloqueador meiótico 6-DMAP. Também, determinar qual o efeito do 6-DMAP isoladamente em oócitos imaturos destinados à posterior criopreservação.

Para tal, oócitos imaturos ( $n = 1.448$ ) eram selecionados e alocados aleatoriamente nos seguintes tratamentos): maturação *in vitro* padrão, vitrificação padrão, submissão à pressão (500 mBar) seguida da vitrificação com recuperação em meio padrão, submissão ao 6-DMAP seguido da vitrificação ou submissão à pressão (500 mBar) seguida da vitrificação, com recuperação em 6-DMAP.

Os critérios de viabilidade considerados foram as taxas de desenvolvimento embrionário e as taxas de eclosão dos blastocistos.

## Organograma do Experimento 8:



Os embriões foram produzidos por ativação partenogenética

## 5 RESULTADOS

### 5.1 FASE I – ELEIÇÃO DA MELHOR INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA PARA OÓCITOS BOVINOS IMATUROS

Conforme demonstrado na tabela 1, que sumariza os dados do experimento 1, as taxas de clivagem não foram afetadas por nenhuma das pressões negativas (250, 500 e 750 mBar) empregadas. Já a eficiência de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, para a intensidade de pressão 250 mBar, foi estatisticamente inferior ao grupo controle, ao passo que para as demais pressões não houve diferença estatística entre os grupos.

Ainda, os dados do experimento 1 evidenciam uma variação na cinética de desenvolvimento desses embriões, conforme o tratamento. Ao agrupar os blastocistos do dia 7 de desenvolvimento, conforme o estágio, nota-se que com a pressão de 250 mBar houve um retardo no seu desenvolvimento até blastocisto expandido, sendo que as pressões de maior intensidade (500 e 750 mBar) resultaram numa maior proporção de blastocistos mais adiantados, quando comparadas à pressão de 250 mBar. Já o grupo controle teve uma proporção intermediária entre esses extremos, não diferindo estatisticamente dos mesmos.

Apesar da cinética de desenvolvimento apresentar variações individuais entre pools de oócitos processados dentro de um mesmo sistema, pode-se acrescentar essa observação ao fato de que, a taxa de eclosão para a pressão de 500 mBar foi superior a observada no grupo controle, subsidiando assim uma evidência mais robusta de que a pressão 500 mBar possa estar exercendo uma influência positiva no desenvolvimento embrionário, ao menos no que diz respeito aos embriões produzidos por ativação partenogênica.

Tabela 1 – Desenvolvimento *in vitro* de embriões oriundos de oócitos bovinos imaturos, submetidos a diferentes intensidades de pressão negativa e produzidos por ativação partenogenética

Tratamento	CCOs	Clivagem*	Estágio de desenvolvimento dos blastocistos no dia 7				Eclosão (day 10)**
			Total*	Bi**	Bl**	Bx e Bn**	
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Controle	212	177 (83,5)	72 (34,0) <sup>a</sup>	33 (45,8) <sup>ab</sup>	22 (30,6) <sup>b</sup>	17 (23,6) <sup>ab</sup>	17 (23,6) <sup>b</sup>
250 mbar	225	179 (79,6)	57 (25,3) <sup>b</sup>	35 (61,4) <sup>a</sup>	12 (21,1) <sup>b</sup>	10 (17,5) <sup>b</sup>	16 (28,1) <sup>ab</sup>
500 mbar	335	275 (82,1)	104 (31,0) <sup>ab</sup>	35 (33,7) <sup>b</sup>	33 (31,7) <sup>b</sup>	36 (34,6) <sup>a</sup>	42 (40,4) <sup>a</sup>
750 mbar	227	188 (82,8)	73 (32,2) <sup>ab</sup>	7 (9,6) <sup>b</sup>	39 (53,4) <sup>a</sup>	27 (37,0) <sup>a</sup>	22 (30,1) <sup>ab</sup>

\*Baseado no total de CCOs.

\*\*Baseado no total de blastocistos no dia 7.

7 repetições

Fonte: Próprio Autor.

A aplicação de pressão negativa nos oócitos imaturos não afetou a maturação oocitária (% de oócitos em metafase II), bem como a taxa de clivagem. A produção de blastocistos do grupo NC 250 (25,3%) foi inferior ao grupo Controle (34,0%), sendo ambos semelhantes ao grupo NC 500 (31,0%) e NC 750 (32,2%). Os grupos Controle e NC 250 apresentaram maior proporção de blastocistos iniciais (Bi), enquanto o grupo NC 500 produziu semelhante proporção de Bi, Bl e Bx, e o grupo NC 750 maiores proporções de Bl, seguido de Bx. O grupo NC 500 teve taxa de eclosão superior ao grupo Controle. O grupo NC 500 mostrou boa proporção de Bl e Bx, com eclosão superior ao grupo Controle, e o grupo NC 750 teve a menor proporção de Bi com boa taxa de eclosão, sendo ambos tratamentos bons candidatos a aumentar a viabilidade dos oócitos. Mesmo que não tenham apresentado uma vantagem significativa nas taxas de desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto (Tabela 1), houve uma melhor eficiência da pressão 500 mBar quando comparada individualmente com o grupo controle, mesmo não tendo diferido das outras pressões.

Em função disto, nessa mesma fase do estudo, foram aplicadas novamente as três intensidades de pressão negativa, previamente testadas, com o objetivo de avaliar o efeito destas em embriões produzidos por fecundação *in vitro*. Porém, no experimento 2, as avaliações foram estendidas até uma etapa posterior de análise *in vitro* de desempenho embrionário. Ao passo que previamente, no experimento 1, as taxas de blastocisto foram observadas e estes foram monitorados até sua posterior eclosão, no experimento 2, os blastocistos oriundos da fecundação *in vitro* foram alocados uniformemente em dois subgrupos, sendo um submetido à vitrificação e o outro mantido fresco. Assim, os embriões derivados das respectivas intensidades de pressão foram avaliados quanto à sua criotolerância.

O intuito de substituir a técnica de produção dos embriões foi, após validar com oócitos ativados para ser possível retirar o efeito macho, confirmar se, em um sistema de produção de embriões com participação da ativação espermática, o efeito dos tratamentos iria ser mantido constante.

Após os tratamentos por submissão à diferentes intensidades de pressão negativa testadas, os blastocistos foram criopreservados por vitrificação, tendo como critério de viabilidade as taxas de eclosão. Ao contrário do que foi validado para embriões produzidos por ativação partenogênica, no experimento 2, onde foram produzidos embriões por fecundação, a pressão de 750 mBar ocasionou um incremento nas taxas de clivagem. Apesar de a clivagem ser considerada um dos critérios de viabilidade para embriões em estágios de pré-implantação, não foi dada muita ênfase para este incremento já que esta melhora na eficiência não foi mantida posteriormente, no desenvolvimento até blastocisto.

Conforme também demonstrado na tabela 2, quando não submetidos a qualquer das intensidades de pressão negativa testadas, os embriões perdem viabilidade ao serem criopreservados, conforme demonstra a comparação entre os grupos controle fresco e controle vitrificado. Nota-se que o grupo criopreservado foi estatisticamente inferior ao fresco. Entretanto, a submissão a qualquer uma das pressões testadas anula essa diferença estatística entre embriões frescos e vitrificados.

É importante ainda ressaltar que a pressão de 500 mBar seguida da vitrificação proporcionou taxa de eclosão, não só superior ao grupo controle vitrificado, mas também semelhante ao grupo controle fresco, direcionando assim para 500 mBar a intensidade de pressão negativa eleita para as demais fases do estudo.

Porém, um detalhe ainda pareceu dar crédito à necessidade de avaliações adicionais para a pressão de 250 mBar, pois no seu respectivo tratamento mantido a fresco, este também se manteve semelhante aos seus correspondentes frescos de 500 mBar e controle (sem submissão à pressão), talvez evidenciando uma tendência a esta ser a condição menos ofensiva do sistema avaliado para embriões frescos.

Interessantemente, e até em função do grande número de repetições que consolidam esses dados, deve-se enfatizar que o incremento na criotolerância dos blastocistos oriundos de oócitos tratados pela pressão de 500 mBar irá potencialmente gerar informações relevantes, mesmo além das obtidas até o final do presente estudo. Outra particularidade desse experimento que deve ser enfatizada, é que em função do número elevado de repetições, várias fases climáticas foram abrangidas durante a sua execução.

Mesmo diante desses resultados animadores, foi feita a opção de manter certa cautela na seleção dos tratamentos a serem aplicados nas estruturas de estágios de desenvolvimento diferentes dos utilizados no experimento 2. Para isso, novas avaliações precisaram ser conduzidas ainda se utilizando, além da pressão eleita de 500 mBar, a pressão de 250 mBar, até que se encontrassem evidências adicionais que permitissem a opção por apenas uma delas.

Tabela 2 - Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos submetidos a diferentes intensidades de pressão negativa, produzidos por fecundação *in vitro* e seu desenvolvimento posterior a vitrificação dos embriões em estágio de blastocisto

Pressão negativa aplicada	Clivados/Cultivados n/n (%)	Blastocistos n (%)	Submissão a vitrificação	Eclosão/Tratados n/n (%)
Controle	598/772 (77,5) <sup>ab</sup>	239 (31,0)	Fresco	21/26 (82,1) <sup>a</sup>
			Vitrificado	15/30 (50,0) <sup>b</sup>
250 mbar	575/763 (75,4) <sup>b</sup>	223 (29,2)	Fresco	23/28 (82,1) <sup>a</sup>
			Vitrificado	20/30 (66,7) <sup>ab</sup>
500 mbar	593/754 (78,6) <sup>ab</sup>	229 (30,4)	Fresco	24/25 (96,0) <sup>a</sup>
			Vitrificado	24/25 (80,0) <sup>a</sup>
750 mbar	671/770 (80,1) <sup>a</sup>	243 (31,6)	Fresco	23/29 (79,3) <sup>ab</sup>
			Vitrificado	20/30 (66,7) <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ ).  
(18 repetições)

Fonte: Próprio Autor.

O grupo de 500 mBar apresentou maior proporção de células apoptóticas (Figura 3) do que o grupo Controle, sendo ambos semelhantes aos demais. Isto demonstra que os blastocistos expandidos do grupo 500 mBar antes de serem vitrificados apresentavam um controle de renovação celular maior do que o grupo Controle, o que pode ter influenciado na maior viabilidade deste grupo à vitrificação, apresentando maior taxa de eclosão.

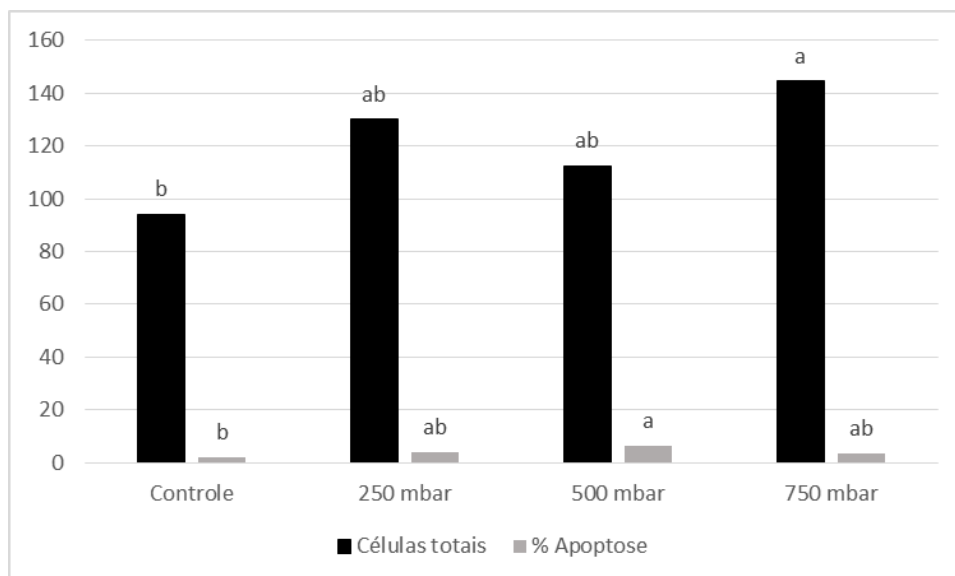


Figura 3 - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos Expandidos, produzidos por protocolo padrão de fecundação *in vitro* (Controle), ou após a submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 250, 500 ou 750 mBar.

<sup>a, b</sup> Letras diferentes demonstram diferença significativa para a mesma categoria de células.

Fonte: Próprio Autor.

De um modo geral, a fase I desse estudo apontou para duas pressões (250 e 500 mBar) como candidatas a continuar nas demais fases do estudo, tendo evidências suficientes para descartar a pressão de 750 mBar, pois além da anulação da diferença entre as taxas de eclosão de blastocistos frescos x criopreservados, essa pressão ainda reduziu, numericamente, as taxas de eclosão. O fato de ter equiparado à taxa de eclosão do controle vitrificado, proporcionou suporte para a descontinuidade desta pressão das demais fases do estudo.

Uma vez estabelecidas as escolhas de pressão a serem utilizadas em oócitos, as mesmas análises foram realizadas para que se pudesse optar por uma das pressões a ser eleita como a melhor, para ser aplicada já nos embriões, especificamente nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido.

A fase II do estudo passou a buscar essa informação, conforme demonstrado a seguir nas tabelas 3 e 4.

## 5.2 FASE II – ELEIÇÃO DA MELHOR INTENSIDADE DE PRESSÃO NEGATIVA A SER APLICADA EM EMBRIÕES (DIA 7), PRODUZIDOS *IN VITRO* EM ESTÁGIO DE BLASTOCISTO/BLASTOCISTO EXPANDIDO

No experimento 3, durante a eleição da pressão ideal para ser aplicada nos blastocistos, em um primeiro momento, já foi possível descartar uma delas, a pressão de 750 mBar, por ter reduzido significativamente a taxa de eclosão, mesmo nos embriões mantidos frescos (Tabela 3). Os embriões do grupo controle (não submetidos a nenhuma das intensidades de pressão negativa), assim como os que foram submetidos as intensidades de 250 e 500 mBar, não apresentaram diferença significativa na taxa de eclosão.

Tabela 3 - Sobrevivência (eclosão) de blastocistos bovinos (dia 7) produzidos por fecundação *in vitro* e expostos a diferentes intensidades de pressão negativa

Tratamento	N blastocistos	Taxa de eclosão após 72h	
		N	%
Controle	98	84	85,7 <sup>a</sup>
250 mbar	89	79	88,8 <sup>a</sup>
500 mbar	90	77	85,6 <sup>a</sup>
750 mbar	97	65	67,0 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ )

8 repetições

Fonte: Próprio Autor.

Os embriões eclodidos do grupo 250 mBar tiveram mais células totais em comparação ao grupo controle, sendo ambos semelhantes aos grupos 500 mbar e 750 mBar. A porcentagem de células apoptóticas (Figura 4) foi superior no grupo 500 mBar em comparação ao grupo controle e ao grupo 250 mBar, e semelhante ao grupo 750 mBar.



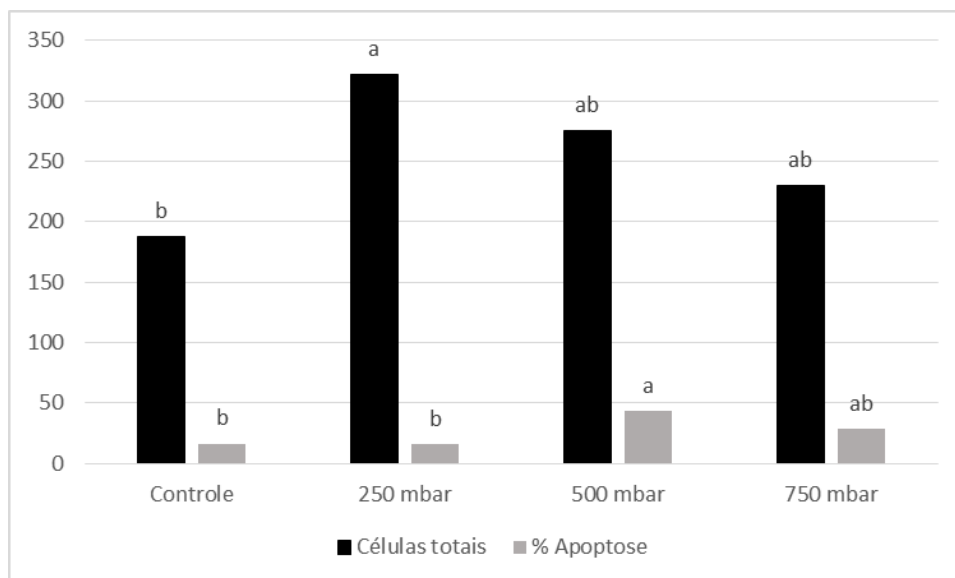


Figura 4 - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos eclodidos, produzidos por protocolo padrão de fecundação *in vitro* (Controle), ou após a submissão dos blastocistos expandidos a pressão negativa de 250, 500 ou 750 mbar.

<sup>a, b</sup> Letras diferentes demonstram diferença significativa para a mesma categoria de células.

Fonte: Próprio Autor.

Conforme mostra a tabela 4, uma vez descartada a pressão 750 mBar dos demais experimentos, foram repetidas as pressões 250 e 500 mBar, porém agora submetendo os embriões tratados ao posterior processo de vitrificação. Levando-se em conta como critério de viabilidade a taxa de eclosão, mais um dado interessante ficou em evidência, dessa vez fornecendo subsídios suficientes para se eliminar a pressão negativa de 250 mBar do tratamento de embriões em estágio de blastocisto.

O grupo submetido a 250 mBar de pressão negativa e posteriormente vitrificado, apresentou taxa de eclosão inferior ao grupo controle fresco, ao passo que os outros grupos vitrificados, tanto o não submetido à pressão, quanto o submetido à pressão de 500 mBar, apresentaram eclosão estatisticamente semelhantes ao controle fresco e ao tratamento 250 mBar.

Provavelmente em função da época do ano em que essa fase do estudo foi realizada, a taxa de eclosão do grupo controle vitrificado está efetivamente acima da média esperada para um tratamento de criopreservação em nosso sistema. Todavia, a pressão de 250 mBar não correspondeu ao mesmo desempenho obtido sem o uso de pressão, ou com o emprego da pressão de 500 mBar. Em função desse conjunto de informações, a pressão eleita para as próximas fases de estudo foi de 500 mBar.

Os embriões eclodidos obtidos nos diferentes grupos tiveram quantidade média de células totais (161,2 – 199,2) e porcentagem de células positivas para caspase 3 clivada (9,8 – 18,1%) semelhantes.

Tabela 4 - Sobrevivência (eclosão) de blastocistos bovinos (dia 7) produzidos por fecundação *in vitro*, expostos a diferentes intensidades de pressão negativa e vitrificados 2 horas após

Tratamento	N embriões	Taxa de eclosão após 72h	
		N	%
Controle Fresco	72	59	81,9 <sup>a</sup>
Controle Vitri	71	53	74,6 <sup>ab</sup>
250 mbar – Vitri	72	43	59,7 <sup>b</sup>
500 mbar – Vitri	73	52	71,2 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ( $p \leq 0,05$ )

8 repetições

Fonte: Próprio Autor.

Uma vez estabelecida a intensidade de pressão em 500 mBar para oócitos e embriões, a nova etapa do estudo buscava adequar o sistema para um tratamento de pré-maturação, com a utilização de algum bloqueador ou modulador de cromatina. A molécula 6-dimetil-amino-purina (6-DMAP) foi eleita como sendo o bloqueador a ser usado, sendo o estabelecimento das condições dessa pré-maturação, o próximo passo.

### 5.3 FASE III – ESTABELEECER AS CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO DE OÓCITOS, DURANTE UMA PRÉ-MATURAÇÃO, COM UM BLOQUEADOR DE CICLO CELULAR

Uma vez consolidadas as condições de submissão de oócitos e embriões ao estresse controlado por pressão negativa, o objetivo das demais etapas consistiu em aplicar estratégias que proporcionassem embriões mais criotolerantes. Após estudos pilotos avaliando o efeito de diferentes moduladores de cromatina e bloqueadores de ciclo celular, nas nossas condições, a 6-dimetil-amino-purina (6-DMAP), um análogo da puromicina, proporcionou os melhores resultados.

Ainda, com o objetivo de confirmar o efeito benéfico do 6-DMAP, as condições de pré-maturação testadas buscaram isolar o efeito deste sozinho, em comparação a variações do meio padrão de maturação. Conforme demonstrado na tabela 5, a adição do 6-DMAP proporcionou um incremento na taxa de blastocistos, quando as condições de incubação foram realizadas na ausência de gonadotrofinas e soro fetal, conforme a expectativa inicial.

A variação da droga na presença das gonadotrofinas e soro foi avaliada, pois o objetivo não era validar o efeito bloqueador de ciclo celular da droga, mas sim buscar um efeito sinérgico da droga com as condições do nosso sistema de produção de embriões, buscando as melhores taxas de desenvolvimento embrionário, além de embriões mais competentes e criotolerantes. Especula-se que o melhor desempenho do grupo TCM+6DMAP se deva a combinação da retirada do soro fetal e das gonadotrofinas, no mesmo período em que a exposição ao 6-DMAP foi realizada. Neste caso, a privação dos fatores intrínsecos que estão presente no soro, assim como a privação da ação das gonadotrofinas pode ter proporcionado um período de não progressão da retomada da meiose. Ao mesmo tempo o tratamento dotou esse oócito de organelas melhor capacitadas para quando da retomada da meiose, esse processo ocorresse da maneira mais sinérgica possível, mimetizando assim os efeitos obtidos com o coasting dos oócitos, que são maturados *in vivo*, porém recuperados e utilizados para produção de embriões *in vitro*.

A quantidade média de células totais nos blastocistos dos diferentes grupos variou de 83 a 125, e a porcentagem de células positivas para caspase 3 clivada variou de 8,4 a 11,3, sendo que ambos os parâmetros tiveram valores semelhantes entre os grupos (Figura 5). O efeito sinérgico da associação 6-DMAP com subsequente submissão ao estresse controlado por pressão negativa de 500 mBar ainda foi confirmado em função da maior densidade celular dos blastocistos que passaram por esse tratamento sequencial, quando comparado aos grupos controle, e ordem inversa de fatores estressante e bloqueadores (no caso, quando a pressão negativa foi aplicada antes da exposição ao bloqueador, não houve incremento da densidade celular embrionária.

Tabela 5 - Efeito da pré-maturação na presença (MIV) ou não (TCM) de gonadotrofinas e soro fetal na presença ou ausência do bloqueador de ciclo celular 6-DMAP no desenvolvimento de oócitos imaturos após ativação partenogenética

Grupos	n oócitos	Maturados		Clivados		Blastocistos	
		N	%	n	%	N	%
Controle	163	130	79,8 <sup>a</sup>	97	59,5 <sup>ab</sup>	30	18,4 <sup>b</sup>
MIV+6DMAP	163	117	71,8 <sup>ab</sup>	109	66,9 <sup>ab</sup>	37	22,7 <sup>ab</sup>
TCM	149	101	67,8 <sup>b</sup>	84	56,4 <sup>b</sup>	25	16,8 <sup>b</sup>
TCM+6DMAP	152	121	79,6 <sup>a</sup>	106	69,7 <sup>a</sup>	46	30,3 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) (8 repetições)

Fonte: Próprio Autor.

Após eleição do melhor protocolo de pré-maturação, que foi a adição do 6-DMAP ao meio de maturação desprovido de gonadotrofinas e soro fetal, este tratamento foi combinado ao estresse controlado por pressão negativa, na intensidade previamente eleita durante a fase 1 desse estudo (conforme dados mostrados nas Tabelas 1 e 2).

O propósito dessa associação foi acumular o efeito benéfico do estresse controlado pela pressão negativa de 500 mBar ao efeito do 6-DMAP na ausência de gonadotrofinas, durante 3 h de pré-maturação. Porém agora, o experimento 6 tem como objetivo escolher a ordem de aplicação mais indicada destes tratamentos.

Conforme observado na tabela 6, as taxas de blastocisto não diferiram entre si, ou seja, foram semelhantes independente da ordem de aplicação dos dois tratamentos combinados. Porém, quando comparadas com o grupo controle, a submissão inicial a 500 mBar de pressão, seguida imediatamente por 3h de pré-maturação em 6-DMAP foi superior, sendo, portanto, eleita esta ordem para a continuidade dos experimentos.

Tabela 6 - Associação do estresse controlado por pressão negativa de 500 mBar ao tratamento e pré-maturação utilizando o bloqueador de ciclo celular 6-DMAP, aplicados em oócitos bovinos imaturos, ou vice-versa, e desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética.

Grupos	n oócitos	Maturados		Clivados		Blastocistos		Eclodidos	
		n	%	N	%	n	%	N	%
Controle	295	247	83,7	190	64,4 <sup>b</sup>	84	28,5 <sup>b</sup>	35	41,7
500mbar + 6DMAP	280	229	81,8	209	74,6 <sup>a</sup>	106	37,9 <sup>a</sup>	36	34,0
6DMAP + 500mbar	283	223	78,8	137	48,4 <sup>c</sup>	100	35,3 <sup>ab</sup>	32	32,0

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $P \leq 0,05$ )

6 repetições

Fonte: Próprio Autor.

Os blastocistos eclodidos do grupo 6DMAP + 500 mBar obtiveram maior quantidade de células que os demais grupos, sendo que a porcentagem de células apoptóticas não diferiu entre os três grupos (Figura 5).

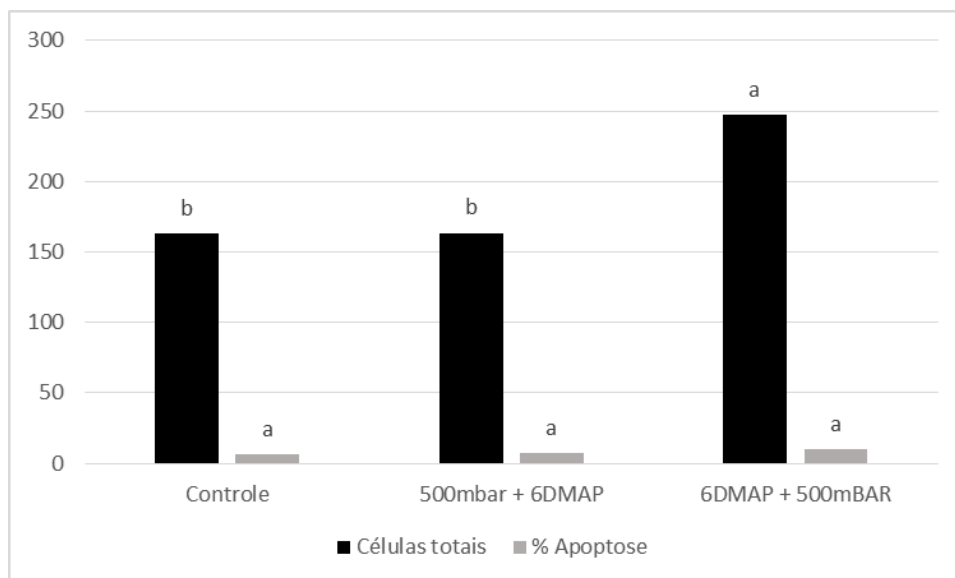


Figura 5 - Quantidade de células totais e porcentagem de células apoptóticas em blastocistos eclodidos produzidos por protocolo padrão de ativação partenogenética (Controle), ou após a submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 500mBar seguido da incubação em 6DMAP (500mBar + 6DMAP), ou após a incubação em 6DMAP seguido da submissão dos oócitos imaturos a pressão negativa de 500mbar (6DMAP + 500mBar).

<sup>a, b</sup> Letras diferentes demonstram diferença significativa para a mesma categoria de células.

Fonte: Próprio Autor.

Uma vez estabelecidos os tratamentos que maximizassem as taxas de produção dentro das nossas condições, e estabelecido qual a ordem de execução mais indicada, quando realizada uma associação entre mais de uma modalidade, o próximo passo foi verificar o efeito da aplicação dessa associação de tratamentos também para oócitos que seriam posteriormente submetidos à criopreservação. Então, essas associações fizeram parte da próxima e última etapa desse estudo.

**5.4 FASE IV – VERIFICAR O EFEITO DAS MODALIDADES DE ESTRESSE CONTROLADO E DE ESTRATÉGIAS DE PRÉ-MATURAÇÃO PREVIAMENTE ELEITAS NAS ETAPAS ANTERIORES, QUANDO APLICADAS EM OÓCITOS IMATUROS POSTERIORMENTE SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO PELA TÉCNICA DE VITRIFICAÇÃO.**

Nesta última fase, o protocolo apresentou um entrave que necessitou ser solucionado em um novo estudo, pois a consistência das células do cumulus, após submissão à pressão negativa, tornava-se excessivamente viscosa (aglomerando em grumos, formando clusters) no período final de recuperação, dificultando assim, principalmente as etapas de vitrificação,

quando esse era o propósito. Então, antes de executar-se a associação do estresse controlado com o bloqueador meiótico, seguida da submissão a vitrificação, foi necessário verificar qual forma de manutenção seria a mais eficiente: se em MIV (meio padrão) ou TCM (MIV desprovido de gonadotrofinas e soro fetal).

Como observado na tabela 7, as taxas de maturação de todos os tratamentos criopreservados foram inferiores aos seus correspondentes mantidos frescos, sendo ainda todos os criopreservados semelhantes entre si, assim como os frescos. Já as taxas de clivagem de todos os tratamentos vitrificados foram semelhantes entre si, sendo inferiores a todos os demais tratamentos.

Na comparação entre os tratamentos não criopreservados, a recuperação em MIV, após a aplicação da pressão, proporcionou clivagem inferior ao controle fresco. Já nas taxas de blastocisto, todos os tratamentos frescos foram semelhantes entre si, e superiores aos correspondentes criopreservados. Já no que diz respeito aos tratamentos vitrificados, a associação de qualquer uma das condições de maturação reduziu a taxa de desenvolvimento a blastocisto em comparação ao tratamento controle vitrificado.

A quantidade de células totais dos diferentes grupos variou de 142,3 a 207,5 e a proporção de células em apoptose variou de 3,0 a 6,0%, sendo que ambos os parâmetros não variaram entre os grupos.

Tabela 7 - Desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética de oócitos imaturos submetidos a 500mbar de pressão negativa, em meio de maturação contendo ou não gonadotrofinas e soro fetal, e destinados ou não a vitrificação

Grupos	n oócitos	Maturados		Clivados		Blastocistos		Eclodidos	
		n	%	n	%	n	%	N	%
Controle Fresco	274	232	84,7 <sup>a</sup>	215	78,5 <sup>a</sup>	85	31,0 <sup>a</sup>	31	36,5 <sup>b</sup>
Controle Vitri	265	89	33,6 <sup>b</sup>	55	20,8 <sup>c</sup>	19	7,2 <sup>b</sup>	4	21,1 <sup>bc</sup>
500 mbar MIV Fresco	265	210	79,2 <sup>a</sup>	186	70,2 <sup>b</sup>	83	31,3 <sup>a</sup>	35	42,2 <sup>ab</sup>
500 mbar MIV Vitri	273	86	31,5 <sup>b</sup>	62	22,7 <sup>c</sup>	7	2,6 <sup>c</sup>	0	0,0 <sup>c</sup>
500 mbar TCM Fresco	264	225	85,2 <sup>a</sup>	189	71,6 <sup>ab</sup>	77	29,2 <sup>a</sup>	41	53,2 <sup>a</sup>
500 mbar TCM Vitri	284	80	28,2 <sup>b</sup>	42	14,8 <sup>c</sup>	7	2,5 <sup>c</sup>	0	0,0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) (5 repetições)

Fonte: Próprio Autor.

Conforme demonstrado na tabela 8, com a vitrificação dos oócitos imaturos, a taxa de maturação e clivagem foi inferior aos oócitos frescos. O grupo de oócitos vitrificados após a

aplicação da pressão negativa teve maturação semelhante ao grupo controle de vitrificação, demonstrando não ser prejudicial para a maturação e a clivagem dos oócitos.

O uso do bloqueador 6-DMAP previamente à vitrificação, reduziu a taxa de maturação e clivagem dos oócitos em relação ao protocolo controle de vitrificação e ao grupo vitrificado após submissão à pressão negativa. Quando a pressão negativa foi seguida do 6-DMAP, antes da vitrificação, observou-se as menores taxas de maturação e clivagem dentre todos os grupos. Isto demonstra que o período para que ocorra uma resposta do oócito ao estímulo estressor, deve acontecer na ausência de bloqueador. Caso contrário, este estresse torna-se prejudicial ao processo de maturação e clivagem do oócito.

O desenvolvimento a blastocisto dos grupos vitrificados foi inferior ao grupo controle fresco. O uso da pressão negativa diminuiu o desenvolvimento embrionário em relação ao grupo controle de vitrificação. Embora o uso do 6-DMAP tenha prejudicado o desenvolvimento inicial dos oócitos vitrificados, a taxa de blastocistos deste grupo foi semelhante ao grupo controle de vitrificação. Isto demonstra a eficiência da droga para o desempenho de blastocistos, mesmo que ela tenha sido prejudicial no início do desenvolvimento embrionário.

A associação da pressão negativa com o 6-DMAP prejudicou o desenvolvimento a blastocisto, assim como havia ocorrido no início do desenvolvimento embrionário. Embora a taxa de eclosão dos blastocistos não tenha diferido estatisticamente, os grupos vitrificados após o uso da pressão negativa não apresentaram eclosão, demonstrando que o uso deste tipo de estresse controlado não é indicado previamente a vitrificação de oócitos bovinos imaturos.

A quantidade total de células dos blastocistos eclodidos variou de 92 a 185 e a porcentagem de células em apoptose variou de 0,0 a 6,7%, para os diferentes grupos.

Tabela 8 - Desenvolvimento embrionário após ativação partenogênica de oócitos imaturos submetidos sucessivamente a pressão negativa de 500 mbar e ao bloqueador 6-DMAP, ou a cada um dos fatores isoladamente

Grupos	n oócitos	Maturados		Clivados		Blastocistos		Eclodidos	
		n	%	N	%	n	%	n	%
Controle Fresco	306	252	82,4 <sup>a</sup>	216	70,6 <sup>a</sup>	90	29,4 <sup>a</sup>	29	32,2 <sup>a</sup>
Controle Vitri	285	96	33,7 <sup>b</sup>	67	23,5 <sup>b</sup>	16	5,6 <sup>b</sup>	2	12,5 <sup>a</sup>
500 mbar MIV Vitri	299	94	31,4 <sup>b</sup>	68	22,7 <sup>b</sup>	8	2,7 <sup>cd</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>
6DMAP Vitri	285	53	18,6 <sup>c</sup>	46	16,1 <sup>c</sup>	11	3,9 <sup>bc</sup>	2	18,2 <sup>a</sup>
500mbar + 6DMAP Vitri	273	31	11,4 <sup>d</sup>	19	7,0 <sup>d</sup>	2	0,7 <sup>d</sup>	0	0,0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) (5 repetições)

Fonte: Próprio Autor.





## 6 DISCUSSÃO GERAL

Os eventos que culminam ou não com a sobrevivência embrionária certamente estão longe de ser totalmente elucidados, ainda mais em função de efeitos distintos ocasionados entre os diferentes sistemas de produção. Nos embriões em estágios mais adiantados de desenvolvimento (blastocisto expandido, eclodido ou em expansão após eclodir), se sabe que além de alta atividade de apoptose, há ocorrência de fagossomos e lisossomos, inclusive com a detecção de células mortas, que são fagocitadas pelas células adjacentes (Plante & King 1994; Green & Reed 1998). Conforme dados contidos na figura 3, a pressão negativa de 500 mBar aplicada em oócitos ocasionou uma incidência de apoptose superior ao grupo controle, em que os oócitos foram mantidos à pressão atmosférica. Em contraste, a densidade celular dos blastocistos derivados de oócitos tratados pela pressão de 750 mBar foi superior ao grupo controle, o que apesar de parecer controverso em um primeiro momento, é perfeitamente aceitável em função de a taxa de blastocistos do grupo 750 mBar ter sido semelhante aos demais grupo, porém a taxa de clivagem foi estatisticamente superior ao grupo 250 mBar. Pode ter havido uma espécie de aumento na pressão de seleção.

Logo, quando oócitos foram tratados com a intensidade mais elevada (750 mBar) ou mais baixa (250 mBar) de pressão negativa, os blastocistos não expressaram a mais alta resistência à criopreservação, sendo, portanto, a pressão média entre as duas (500 mBar) o presumível plateau ótimo de intensidade para incremento da posterior criotolerância de embriões. Porém, novos estudos são necessários para verificar a incidência de apoptose nos embriões após a criopreservação.

Independente da interação entre os fatores presentes em nosso sistema de produção de embriões, ou qual a rota que leve, ou não, ao incremento dos resultados, a utilização da caspase 3 clivada (Coutinho et al., 2000), por ser mais específica, pode eliminar outros fatores que culminam com a morte ou com a resiliência celular. De fato, Frey et al. (2008) também relataram que, após considerável aumento da pressão hidrostática positiva aplicada em células, estas acabam entrando na rota da necrose, o que corrobora com a redução nas taxas de eclosão promovida pela submissão de blastocistos (Tabela 3) à 750 mBar de pressão negativa.

Uma possível explicação para a redução da eclosão dos embriões tratados com a pressão mais intensa é que o limiar entre os ajustes proporcionados pela rota das caspases foi extrapolado, e assim não houve tempo suficiente para a sinalização da apoptose. A explicação que nós sugerimos, baseado nos dados encontrados para a densidade celular e para a incidência de apoptose, é que, conforme a intensidade de pressão negativa aplicada, tanto em

oócitos quanto em embriões, essa pressão exerça uma curva-limite, ou um plateau de ação ótima. Uma vez atingido o limiar para desencadear a entrada na rota da apoptose, haverá um incremento de eficiência, desde que o limite não seja extrapolado. Em especial, os blastocistos podem destinar alguns blastômeros para manter a integridade do embrião como um todo, evitando assim que esse processo entre em alguma das rotas de necrose. Essa hipótese pode ser confirmada em função da maior incidência de caspase 3 nos embriões tratados pela pressão (500 mBar) que nos embriões que foram posteriormente vitrificados (Tabela 4), anulando a diferença entre embriões frescos e criopreservados.

Esse padrão de incidência de apoptose deixou de ocorrer quando foram comparados os embriões previamente vitrificados, após a sua eclosão. Esse nivelamento pode ser atribuído ao que foi explicado por Matwee et al. (2000), que sugeriram que os embriões, a medida que progredem no desenvolvimento embrionário, podem acomodar fatores nocivos tais como danos celulares, e ainda sugerem que embriões maiores possuem maior potencial de desenvolvimento.

Aliados a fatores intrínsecos desencadeados pelos próprios oócitos e embriões, os eventos buscados na modalidade de manipulações embrionárias envolvendo etapas de submissão a estresse controlado, foram mostrados por distintos grupos de pesquisa (Fleming et al. 1985, Lonergan et al., 1997, Huddleston et al. 1997, Blondin et al. 2000), sugerindo uma enorme participação de uma adequada maturação citoplasmática no sucesso da produção de embriões.

Esses eventos, apesar de muitas vezes não serem avaliados de forma direta, ajudaram a postular os pré-requisitos e benefícios de favorecimento da maturação citoplasmática, correlacionando empiricamente os achados de Lonergan et al. (1997), que ao atrasarem o início da maturação *in vitro* de oócitos bovinos, mostraram um efeito positivo na posterior produção de embriões. Ao cruzar os dados da literatura com os protocolos já utilizados em nosso laboratório, foi encontrado um lugar comum entre uma molécula que é efetiva na interferência da progressão da meiose, porém reversível o suficiente para proporcionar índices ótimos de desenvolvimento embrionário, mesmo que estudos prévios (Anderiesz et al., 2000) tenham indicado que ele não promova aumento da competência. Com alguns ajustes nos tempos de exposição (reduzindo de 24-52 para apenas 3 h), os resultados aqui encontrados após pré-maturação com exposição ao 6-DMAP mostraram que ele é efetivo para incrementar as taxas de blastocisto (Tabela 5), inclusive quando associado ao estresse de 500 mBar de pressão negativa (Tabela 6). Ainda, dependendo da ordem de associação dos tratamentos

(pressão negativa/incubação em 6-DMAP), proporciona incremento na densidade celular embrionária (Figura 5).

Estes resultados foram bastante animadores, mesmo levando em consideração os potenciais efeitos nocivos do 6-DMAP (Oliveira et al., 2015), que encontraram ação mutagênica e genotóxica da molécula, em função do grande efeito residual. No caso das manipulações embrionárias, sempre há o cuidado de promover sucessivas lavagens entre as diferentes soluções utilizadas em cada etapa da produção. Porém, nas nossas condições, as etapas de remoção do 6-DMAP sempre foram realizadas com mais ênfase, justamente para evitar efeitos residuais.

Mesmo assim, a associação de estratégias encontradas nesse estudo para promover maior produção e competência embrionária, não foi eficiente para maximizar os índices para oócitos criopreservados. Uma vez que todos os oócitos foram criopreservados utilizando-se “slush”, através do nitrogênio super-resfriado (Santos et al., 2013), outras rotas deverão ser estudadas para encontrar alternativas que incrementem os índices que foram obtidos para os grupos de vitrificação pelo protocolo padrão. Talvez a sensibilidade ao resfriamento possa ter sido exacerbada, ou mesmo a fase de transição de temperatura (Arav et al. 1996) pode ter sido alterada por eventos celulares e sub-celulares não investigados neste estudo. Pode ser que novos ajustes nos tratamentos realizados nos oócitos destinados a criopreservação, em novos estudos, sejam suficientes para buscar o sinergismo entre as técnicas utilizadas para maximizar a produção de embriões.

Como conclusões gerais, oócitos que serão destinados para a produção *in vitro* de embriões que serão transferidos a fresco, apresentam melhor eficiência após a submissão ao estresse controlado por 500 mBar de pressão negativa.

Ainda, para embriões bovinos em estágio de blastocisto produzidos *in vitro* que serão transferidos a fresco, a pressão negativa de 500 mBar também é a melhor estratégia de estresse controlado para proporcionar aumento na eficiência.

No que diz respeito a oócitos bovinos imaturos, que serão criopreservados por vitrificação, os tratamentos de estresse controlado não proporcionaram nenhum efeito aditivo de eficiência na posterior produção de embriões. Os resultados sugerem que a vitrificação de oócitos bovinos imaturos em nitrogênio super-resfriado não mantém capacidade de expressar maior eficiência, mesmo quando são submetidos às modalidades de estresse controlado que proporcionaram maior criotolerância aos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Como perspectivas futuras, a combinação dos melhores resultados obtidos nesse estudo para oócitos e embriões devem ser associadas com outras estratégias já previamente

testadas (ainda que de forma isolada), tais como a substituição da solução de vitrificação ou os tratamentos de pré-maturação mais eficientes. O protocolo mais eficiente de pré-maturação identificado nesse estudo deve ser testado novamente, porém na produção de embriões por fecundação *in vitro*.

Em última instância, a expressão de genes que favorecem a competência e a implantação pós-eclosão devem ser posteriormente avaliadas, assim como a eficiência *in vivo*, após transferência dos embriões para fêmeas receptoras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anderiesz C, Young CY, Bongso A, Trounson AO. Regulation of human and mouse oocyte maturation in vitro with 6-dimethylaminopurine. *Human reproduction* v. 15, n. 2, p. 379-388, 2000.

Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 81, p. 96-102, 2014. *Therio* 2014.

Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, v. 33, 0. 589-599, 1996.

Bates S, Vousden KH. P53 signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 6, p. 12-19, 1996.

Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 117, p.97-105, 1999.

Blondin P. Status of Embryo Production in the World. *Anim. Reprod.*, v. 12, n. 3, p. 356-358, Jul/Set 2015

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M. Manipulation of follicular development to produce developmentally competence bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 38-43, 2002.

Bunn S, Cruz FB, Pedrazzi CAF, Bertolini M, Vieira, AD, Mezzalira A. Aumento na sobrevivência após vitrificação de oócitos bovinos imaturos em recipientes com maior condutividade térmica e nitrogênio líquido super-resfriado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36 (3), p. 255-261, 2008.

Casali R, Silva, LG, Acergo CC, Mozzaquatro FD, Mezzalira A. Negative pressure in the pre-freezing of ram sêmen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 42, p. 1240, 2014.

Coutinho ARS, Assumpção MEO, Bordignon V. Presence of cleaved caspase 3 in swine embryos of different developmental capacities produced by parthenogenetic activation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, p. 673-683, 2001

Doreé M, Peaucelier G, Picard A. Activity of the maturation-promoting factor and the extent of the protein phosphorylation oscillate simultaneously during meiotic maturation of starfish oocytes. *Developmental Biology*, v. 99, p. 489-501, 1983.

Du Y, Lin L, Schmidt M, Bøgh IB, Kragh PM, Sørensen CB, Li J, Purup S, Pribenszky C, Molnár M, Kuwayama M, Zhang X, et al. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. *Cloning Stem Cells* 2008; 10:325–330.

Fleming AD, Salgado R, Kuehl TJ. Maturation of baboon or cow oocytes into a surrogate. *Theriogenology*, v. 23, p. 192, 1985.

Frey B, Jank C, Ebel N, Meister S, Schlucker E, Meyer-Pittroff R, Fiektau R, Herrman M, Gaipf US. Cells under pressure – treatment of eukaryotic cells with high hydrostatic pressure, from physiologic aspects to pressure induced cell death. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 2329-2336, 2008.

Gerhart, Wu, Kirshner al. Cell Cycles Dynamics of an M-Phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J. Cell Biol*, 98, 1247-1255, 1984.

Gerace L, Blobel G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell*, v. 19, p. 277-287, 1980.

Gordo AC, Wu H, He CL, Fissore RA. Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and oocyte age. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1370-1379, 2000.

Green DR, Reed, JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.

Hardy K, 1997. Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*, v. 3, p. 919-925, 1997.

Hardy k, Handyside AH. Metabolism and cell allocation during parthenogenetic mouse preimplantation development. *Molecular Reproduction and Development*. V 43, p. 313-322, 1996.

Hashimoto N, Kishimoto T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*, v. 126, p. 242-252, 1988.

Hayman MM, Anantheswaran RC, Knabel SJ. Heat shock induces barotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v. 71, n. 2, p.426-430, 2008.

Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk. A preliminary report. *West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin*. V. 58, p. 15-35, 1899

Hoelker M, Kassens A, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Neuhoef C, Schellander K, Held-Hoelker E. Birth of Healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 97, p. 41-49, 2017.

Huddleston HG, Racowsky C, Jackson KV, Fox JH, Ginsburg ES. Coasting vs. Cryopreservation of all embryos for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, v.90, n.4, p. 1259-1262, 2008).

Hyttel P, Viuff D, Avery B, Laurincik J, Greve T. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 108, p. 263-270, 1996.

Kassens A, Held E, Salileu-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki D, Tesfaye D, Neuhoef C, Schellander K, Held-Hoelker E. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and *in vitro*-matured oocyte results in viable blastocysts and birth of healthy calves. *Biology of Reproduction*, v. 92 (6) p. 150, 2015.

Kuo YH, Pribenszky C, Huang SY. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. *Theriogenology* 2008; 70:1395

Lindner GM, Wright JRW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v. 20, p. 407-416, 1983.

Lonergan P, Khatir H, Carolan C, Mermillod P. Bovine blastocyst production in vitro after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24 h. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 355-365, 1997.

Mapletoft R J. History and perspectives on bovine embryo transfer. *Animal Reproduction*, v. 10, n. 3, p. 168-173, Jul/Set 2013.

Matwee CB, Betts, DH, King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8 Feb, p. 57-68, 2000.

Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *The Journal of General Physiology*, v. 47, p. 347-369, 1963.

Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v. 233, p. 125-126, 1971.

Mezzalira JC, Vieira AD, Zanardi G, Gonçalves MC, Rodrigues MF, Martins LT, Ohlweiler LU, Bertolini M, Mezzalira A. A homemade N<sub>2</sub> supercooling device (Nitrocooler) enhances viability after vitrification of bovine oocytes but not in vitro-produced embryos. 2009, *Reproduction Fertility and Development*, v. 21, p. 134, 2009.

Mezzalira JC, Ohlweiler LU, Urio M, Neto SG, Marinho LR, Zago FC, Forell F, Bertolini M, Mezzalira A. Effect of nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22 (1), p. 210, 2010.

Mezzalira JC, Ohlweiler LU, Klein N, Brum DS, Leivas FG, Mezzalira A. Intracytoplasmic sperm injection after vitrification of immature oocytes in follicular fluid increases bovine embryo production. *Ascta Scientiae Veterinariae*, v. 45, 1511, 2017.

Motlik J, Pvllov A, Kubelka M, Kalous J, Kalab P. Interplay between DCD2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 49, p. 461-469, 1998,

Ohlweiler LU, Brum DS, Leivas FG, Moyses AB, Ramos RS, Klein N, Mezzalira JC, Mezzalira A. Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 79, p. 778-783, 2013.

Oliveira LH, Sanches CP, Seddon AS, Veras MB, Lima FA, Monteiro Jr PLJ, Wiltbank M, Sartori R. Short Communication: Follicle superstimulation before ovum pick-up for in vitro production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 11, p. 9307-9312, 2016.

Oliveira RJ, Mantovani MS, Pesarini JR, Mauro MO, da Silva AF, Souza TR, Ribeiro LR. 6-Dimethylaminopurine and cycloheximide are mutagenic and alter reproductive performance and intra-uterine development *in vivo*. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 1, p. 834-849, 2015.

Plante L, King WA. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 11, n. 10, 1994.

Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, Lin L, Bolund L, Yovich J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biology of Reproduction*, v. 83, p. 690-697, 2010.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v. 164, p. 666.

Pribenszky C, Molnár M, Horváth A, Kútvölgyi G, Harnos A, Szenci O, Degg J, Lederer J. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:181–182.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, fev 1985.

Reed JC. Cytochrome c: can't live with it – can't live without it (Mini review). *Cell*, v. 91, p. 559-562, 1997.

Ribeiro ES, Gerger RP, Ohlweiler LU, Ortigari Jr I, Mezzalira JC, Forell F, Bertolini LR, Rodrigues JL, Ambrosio CE, Miglino MA, Mezzalira A, Bertolini M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. *Cloning Stem Cells*, v. 11, p. 377–386, 2009.

Rime H, Neant I, Guerrier P, Ozon R. 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP), a reversible inhibitor of the transition to metaphase during the first meiotic cell division of the mouse oocyte. *Developmental Biology*, v. 133, p. 169-179, 1989.

Santos RM, Barreta MH, Frajblat M, Cucco DC, Mezzalira JC, Bunn S, Cruz FB, Vieira AD, Mezzalira A. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1501-1506, 2006.

Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction Review*, v. 141, p. 1-19, 2011.

Severo NC. *História Ilustrada da Inseminação Artificial*, p. 53-55 1 ed. São Paulo / Rio de Janeiro: Livre Expressão, 480 p., 2013.

Sprícigo JFW, Netto SBS, Muterlle CV, Rodrigues SAD, Leme LO, Guimarães AL, Caixeta FMC, Franco MM, Pivato I, Dode MAN. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 86, p. 2054, 2062, 2016.



Shojaei Saadi HA, Vigneault C, Sargolzaei M, Gagné D, Fournier E, de Montera B, Chesnais J, Blondin P, Robert C. Impact of whole-genome amplification on the reliability of pre-transfer cattle embryo breeding value estimates. *BMC Genomics*, v. 15, p.889, 2014.

Susko-parrish JL, Leibfried-Rotledge ML, Northey DL, Schutzuikus V, First NL. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. *Developmental Biology*, v. 166, p. 729-739, 1994.

Suthar VS, Shah RG. Bovine *in vitro* embryo production: an overview. *Veterinary World*, v. 2, n. 12, p. 478-479, 2009.

Tyler P, Young CM, Carlke A. Temperature and pressure tolerance of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* (Echinodermata: Echinoidea): potential for deep-sea invasion from high latitudes. *Marine Ecology Progress Series*, v. 192, p. 173-180, 2000.

Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature oocytes. *Cryobiology*, v. 45, p. 91-94, 2002.

Wememkamp-Kamphuis HH, Karatzas AK, Wouters JA, Abee T. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 456-463, fev, 2002.

Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Records*, v. 92, p.686-690 1973.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science*, v. 178, p. 411-4, 1972.