

LAIN URIEL OHLWEILER

**ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A VIABILIDADE DE EMBRIÕES SUÍNOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* E VITRIFICADOS.**

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.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalira

**LAGES
2018**

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

Ohlweiler, Lain Uriel
ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A VIABILIDADE DE
EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS IN VITRO E VITRIFICADOS /
Lain Uriel Ohlweiler. - Lages , 2018.
80 p.

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

1. Vitrificação. 2. Estresse controlado. 3.
Crioprotetores. 4. Receptores de estrógeno. 5.
Apoptose. I. Mezzalira, Alceu. II. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação.
III. Título.

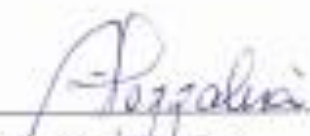
Lain Uriel Ohlweiler

**ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A VIABILIDADE DE EMBRIÕES SUÍNOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* E VITRIFICADOS.**

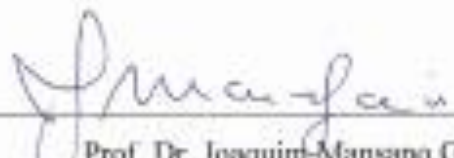
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Banca Examinadora


Orientador: _____


Prof. Dr. Alceu Mezalana
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV)


Membro: _____


Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia
Universidade Estadual Paulista (UNESP/JABOTICABAL)


Membro: _____


Prof. Dr. Marcos Henrique Barreto
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Curitiba)

Membro: _____


Prof. Dr. Lucio Pereira Rauber
Instituto Federal Catarinense (Campus Concórdia)

Membro: _____


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

Lages, 24 de abril de 2018

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que acreditam na pesquisa, seja ela básica ou aplicada, primando sempre pela produção e divulgação de pesquisas que venham a auxiliar no cotidiano de todos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pelos caminhos e oportunidades que tem me proporcionado ao longo da vida, e especialmente pela oportunidade de realizar o doutorado.

Agradeço em especial a minha família por ter sempre confiado em mim e em minhas escolhas, por proporcionar condições para a realização de meus sonhos e pelo apoio proporcionado ao longo de minha vida.

Muito obrigado a meu orientador Alceu Mezzalira pela oportunidade de te-lo como mentor desta jornada, oportunizando meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigado a Joana Claudia Mezzalira pela companhia dentro e fora do laboratório, pelo inigualável, apoio, suporte e aprendizado proporcionado.

Agradeço aos colegas do laboratório de reprodução animal professor Assis Roberto de Bem pelo apoio neste período, e também a todos aqueles que de uma ou outra forma proporcionaram alguma ajuda durante a realização deste trabalho. Especialmente agradeço aos funcionarios do Frigorífico Pamplona, que de uma ou outra forma possibilitaram a coleta de material para este trabalho.

Agradeço a UDESC por proporcionar condições estruturais, e a FUMDES pelo apoio financeiro.

RESUMO

OHLWEILER, Lain Uriel. **Estratégias para aumentar a viabilidade de embriões suínos produzidos *in vitro* e vitrificados**. 2018, 72 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2018.

Os embriões suínos apresentam importantes particularidades, tanto de desenvolvimento quanto estruturais, as quais fazem com que a sua criopreservação seja menos eficaz que as outras espécies domésticas. Na primeira fase deste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes gradientes de percoll durante a seleção dos espermatozoides utilizados na fecundação *in vitro* e sua influência no posterior desenvolvimento e qualidade embrionária. O maior gradiente avaliado (90/45) teve a menor produção e qualidade embrionária, baseado nas taxas de produção embrionária e expressão de receptores de estrógeno. O gradiente intermediário (80/40) proporcionou bons índices de produção e baixa mortalidade embrionária, associados a elevada qualidade embrionária. Já o menor gradiente (70/35) apresentou alta mortalidade embrionária. A segunda fase investigou o efeito e toxicidade de diferentes crioprotetores aos embriões suínos nos dias 5 ou 6 de cultivo. A toxicidade aos embriões está relacionada com o dia de cultivo, o agente crioprotetor, sua concentração e tempos de exposição. As menores concentrações de EG associado a DMSO são menos tóxicas e tão eficientes quanto o uso exclusivo de EG. A sacarose mostrou-se pouco tóxica a embriões dos dias 5 e 6 de cultivo. Na terceira fase, avaliou-se o efeito do estresse controlado por pressão negativa como estratégia para aumentar a viabilidade dos embriões. Quando o estresse foi aplicado aos oócitos na intensidade de 250 mBar houve maior produção embrionária, e menor índice de apoptose nos blastômeros, baseado na expressão da caspase-3 clivada. No entanto, isto não se refletiu em maior criotolerância dos embriões. Quando o estresse foi aplicado diretamente nos blastocistos, somente a pressão de 500 mBar não prejudicou o desenvolvimento embrionário, também não afetando a criotolerância dos mesmos. Quando associadas: pressão negativa de 250 mBar no oócito e 500 mBar no embrião, houve aumento na criotolerância. Na quarta fase do estudo, foi avaliado o uso do nitrogênio super-resfriado na vitrificação de embriões, que não diferiu do nitrogênio convencional. Como conclusões, o gradiente de seleção espermática influencia na qualidade embrionária, sendo que embriões do dia 5 de cultivo possuem maior viabilidade que os embriões do dia 6. Os crioprotetores exercem níveis diferentes de toxicidade aos embriões, conforme a concentração, e é possível aumentar a viabilidade de embriões vitrificados através do uso de estresse controlado por pressão negativa.

Palavras-chave: Vitrificação. Estresse controlado. Crioprotetores. Receptores de estrógeno. Apoptose.

ABSTRACT

OHLWEILER, Lain Uriel. **Strategies to improve the viability of *in vitro* produced and vitrified porcine embryos.** 2018, 72 p. Thesis (Doctorate in Animal Science). Santa Catarina State University. Post Graduate Program in Animal Science. Lages, 2018.

The porcine embryos present important structural and developmental features that play a negative role in their cryotolerance, in comparison to the other domestic species. The first phase of this study aimed to evaluate the effect of different concentrations of the percoll gradient, in the outcome of *in vitro* fertilization and its influence in the further embryo development and quality. The highest concentration assessed (90/45) resulted in the lowest embryo production and quality, based in the embryo production rate and in the expression of estrogen receptor. The outcome of the intermediate gradient (80/40) was a good rate of embryo production, with low embryo mortality and high embryo quality; whereas the lowest gradient (70/35) presented high embryo mortality. The second phase of the study aimed to assess the toxic effect of different cryoprotectant agents, to either day 5 or day 6 porcine blastocysts. Embryo toxicity was affected by the cryoprotectant agent, concentration, length of exposure time, and age of embryos. Low concentrations of EG and DMSO associated were the least toxic, and as efficient as the use of EG alone. Sucrose showed to have low toxicity to embryos of days 5 and 6 of culture. The third phase of the study aimed to evaluate the effect of the controlled stress by negative pressure, as a strategy to increase embryo viability. When the oocytes were submitted to 250 mBar of negative pressure, there was an increase in embryo production and a decrease in the rate of apoptosis, based in the expression of cleaved caspase-3. Nonetheless, their cryotolerance was not affected. When the stress was applied in the blastocysts, only the pressure of 500 mBar did not decrease the embryo development rates, not affecting, however, their cryotolerance. In the other hand, when both steps of negative pressure were applied: 250 mBar to the oocyte and 500 mBar to the blastocyst, in a sequential association, there was an increase in embryo cryotolerance. The fourth phase of the study aimed to assess the use of super-cooled nitrogen for embryo vitrification. Results found showed no differences between conventional (normal atmosphere) and super-cooled nitrogen. As main conclusions, the sperm selection gradient plays a role in the embryo quality, being day 5 embryos more resistant than the ones at day 6. The cryoprotectant agents have different levels of toxicity to the embryos, what was dependant on its concentration. Also, it is possible to increase the viability of vitrified embryos by applying a controlled stress mediated by negative pressure.

Key words: Vitrification. Controlled stress. Cryoprotectants. Estrogen receptors. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organograma representativo do experimento 1.....	33
Figura 2 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 2.	34
Figura 3 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 3.	35
Figura 4 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 4.	35
Figura 5 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 5.	39
Figura 6 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 6.	41
Figura 7 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 7.	41
Figura 8 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 8.	41
Figura 9 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 9.	42
Figura 10 -	Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 10.....	43
Figura 11 -	Porcentagem acumulada dos diferentes estágios de blastocistos (% de embriões) ao longo dos dias de cultivo para os diferentes grupos de concentração de percoll durante a seleção espermática para a FIV.....	51
Figura 12 -	Distribuição (em porcentagem) da eclosão ao longo dos dias de cultivo dos embriões (D6, D7 e D8) dos grupos constituídos das diferentes concentrações de percoll durante a seleção dos espermatozoides para a FIV (concentrações de 90/45, 80/40 e 70,35 %). ^{A,B} Letras diferentes representam diferença estatística para o mesmo grupo de concentração de percoll (P<0,05).....	51
Figura 13 -	Número médio de células totais nos blastocistos eclodidos (barras cinzas), e porcentagem de células expressando receptor de estrógeno (barras pretas). Letras diferentes mostram diferença na porcentagem de células expressando receptor de estrógeno (P<0,05).....	52
Figura 14 -	Embriões suínos eclodidos corados com DAPI (a, c) mostrando o número total de células dos embriões. Embriões corados com Alexa (b, d), mostrando as células que apresentam receptores para estrógeno. As imagens “a” e “b” representam o mesmo embrião, assim como as imagens “c” e “d”.....	53
Figura 15 -	Embrião suínos no estágio de blastocisto corado com DAPI (a) mostrando o número total de células do embrião. Embrião corado com Alexa (b), mostrando as células que apresentam expressão de caspase-3 clivada. As imagens “a” e “b” representam o mesmo embrião.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Discriminação das concentrações de crioprotetores e tempos de exposição às soluções de vitrificação e reaquecimento utilizados no experimento 2.....	33
Tabela 2 -	Concentrações e tempos de exposição aos crioprotetores utilizados para vitrificar os embriões obtidos no dia 5 de cultivo.....	37
Tabela 3 -	Concentrações e tempos de exposição aos crioprotetores utilizados para vitrificar os embriões obtidos no dia 6 de cultivo.....	38
Tabela 4 -	Desenvolvimento embrionário a partir de fecundação <i>in vitro</i> de oócitos suínos, utilizando diferentes gradientes de seleção espermática para seleção dos espermatozoides.....	54
Tabela 5 -	Número médio de células totais e de células expressando caspase 3 clivada em blastocistos e blastocistos expandidos de suínos, no dia 8 de cultivo.....	58
Tabela 6 -	Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo utilizando os crioprotetores EG, DMSO e SAC..	60
Tabela 7 -	Número de células totais (NCT) e porcentagem de células expressando caspase 3 clivada (C3C) em blastocistos e blastocistos expandidos suínos, expostos ao teste de toxicidade nos dias 5 (D5) e 6 (D6) de cultivo que eclodiram ou não até o dia 8 de cultivo.....	62
Tabela 8 -	Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo, utilizando EG em combinação aos crioprotetores PVP, SAC e TRE.....	63
Tabela 9 -	Viabilidade de embriões suínos partenotos vitrificados no dia 5 de cultivo, utilizando 4 diferentes protocolos de combinações de crioprotetores.....	64
Tabela 10 -	Viabilidade de embriões suínos partenotos vitrificados no dia 6 de cultivo utilizando 4 diferentes protocolos de combinações de crioprotetores.....	64
Tabela 11 -	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de oócitos suínos expostos ou não (Controle) ao estresse por três intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar).....	66
Tabela 12 -	Criotolerância de embriões suínos produzidos por partenogênese a partir de oócitos expostos a estresse controlado por pressão negativa de 250 mBar.....	66
Tabela 13 -	Eclusão no dia 8 de blastocistos e blastocistos expandidos, expostos ou não (Controle) ao estresse por três intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar) nos dias 5 e 6 de cultivo.....	67
Tabela 14 -	Número de células totais (NCT), porcentagem de células expressando caspase 3 clivada (% C3C) e porcentagem de células expressando receptor de estrógeno (RE ₂) de blastocistos expandidos originários de embriões do dia 5, ou embriões do dia 6, submetidos à diferentes intensidades de pressão negativa.....	68
Tabela 15 -	Eclusão de embriões suínos partenotos oriundos do dia 5 ou 6 de cultivo, vitrificados após aplicação ou não de pressão negativa.....	70
Tabela 16 -	Eclusão de embriões suínos partenotos oriundos do dia 5 ou 6 de cultivo, vitrificados após aplicação de estresse controlado nos oócitos imaturos, somado ao estresse aplicado aos embriões.....	70

Tabela 17 - Viabilidade de embriões suínos partenotos vitrificados no dia 5 e 6 de cultivo utilizando ou não o nitrogênio super-resfriado (<i>slush</i>).....	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Bl	Blastocisto
BSA	Albumina sérica bovina
Bx	Blastocisto expandido
CIV	Cultivo in vitro
C3C	Caspase-3 clivada
dbcAMP	dibutilil-AMP ciclico
DMSO	Dimetilsulfóxido
D0	Dia zero
D2	Dia dois
D5	Dia cinco
D6	Dia seis
EG	Etileno Glicol
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
h	Hora
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
mBar	Mili-Bar
mg	miligrama
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
ml	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar

NCT	Número de células totais
N ₂ L	Nitrogênio líquido
PBS	Phosphate-buffered saline
PVP	Polivinilpirolidona
PZM-3	Porcine zygote medium-3
RE ₂	Receptor de estrógeno
SAC	Sacarose
seg	segundo
SFB	Soro fetal bovino
TCM-199	Tissue culture medium-199
TRE	Trealose
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES SUÍNOS.....	25
2.2	CRIOPROTETORES E SEUS EFEITOS NAS CÉLULAS.....	27
2.2.1	Criopreservação de embriões suínos.....	27
2.2.2	Particularidades dos embriões suínos à criopreservação.....	28
2.3	EFEITOS DO SLUSH DURANTE A VITRIFICAÇÃO.....	29
2.4	ESTRESSE CONTROLADO COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA EMBRIONÁRIA A MANIPULAÇÃO.....	30
3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
3.1	FASE 1: PADRONIZAÇÃO DA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA A FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
3.1.1	Experimento 1: Efeito da concentração de percoll durante a seleção de espermatozoides suínos no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	33
3.2	FASE 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	34
3.2.1	Experimento 2: Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo utilizando diferentes concentrações dos crioprotetores EG, DMSO e SAC.....	34
3.2.2	Experimento 3: Efeito do PVP, da SAC e da TRE como crioprotetores extracelulares.....	35
3.2.3	Experimento 4. Viabilidade de embriões suínos após vitrificação com diferentes combinações de crioprotetores intra- e extra-celulares.....	35
3.3	FASE 3: ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	37
3.3.1	Experimento 5: Desenvolvimento <i>in vitro</i> de oócitos suínos expostos ou não ao estresse controlado, por três intensidades de pressão negativa.....	38
3.3.2	Experimento 6: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em oócitos imaturos, na posterior criotolerância dos blastocistos, produzidos por partenogênese.....	38
3.3.3	Experimento 7: Progressão do desenvolvimento embrionário de blastocistos, expostos ou não ao estresse controlado, por três intensidades de pressão negativa.....	39
3.3.4	Experimento 8: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em blastocistos suínos partenotos, na sua sobrevivência à vitrificação.....	41
3.3.5	Experimento 9: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado sequencialmente em oócitos suínos imaturos e posteriormente nos respectivos blastocistos partenotos, na sua sobrevivência à vitrificação.....	41
3.4	FASE 4: NITROGÊNIO SUPER RESFRIADO NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	42
3.4.1	Experimento 10: Efeito do slush na vitrificação de blastocistos suínos partenotos.....	42

4	METODOLOGIA.....	45
4.1	OBTENÇÃO DOS OÓCITOS.....	45
4.2	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	45
4.3	FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	45
4.4	ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA.....	46
4.5	CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	46
4.6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CRIOPROTETORES EM BLASTOCISTOS.....	46
4.7	VITRIFICAÇÃO DOS BLASTOCISTOS.....	47
4.8	CONTROLE DA VELOCIDADE DE RESFRIAMENTO DURANTE A VITRIFICAÇÃO.....	47
4.9	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA VIABILIDADE EMBRIONÁRIA APÓS TESTE DE TOXICIDADE E VITRIFICAÇÃO.....	48
4.10	APLICAÇÃO DE ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA AOS OÓCITOS E EMBRIÕES.....	48
4.11	AVALIAÇÃO DOS EMBRIÕES QUANTO A DENSIDADE CELULAR E PROPORÇÃO DE CÉLULAS NA MASSA CELULAR INTERNA.....	49
4.12	RESPOSTA CELULAR EMBRIONÁRIA AO ESTRESSE CONTROLADO E AOS CRIOPROTETORES: MORTE CELULAR PROGRAMADA OU APOPTOSE, E EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENO.....	49
5	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	51
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
6.1	FASE 1: PADRONIZAÇÃO DA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA A FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	53
6.1.1	Experimento 1: Efeito da concentração de percoll durante a seleção de espermatozoides suínos no desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	53
6.2	FASE 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	59
6.2.2	Experimento 2: Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos ao teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo, utilizando diferentes concentrações dos crioprotetores EG, DMSO e SAC	59
6.2.3	Experimento 3: O efeito de crioprotetores PVP, SAC e TRE como crioprotetores extracelulares	61
6.2.4	Experimento 4: Viabilidade após vitrificação de embriões suínos, com diferentes combinações de crioprotetores intra e extracelulares	62
6.3	FASE 3: ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	63
6.3.1	Experimento 5: Desenvolvimento <i>in vitro</i> de oócitos suínos expostos ou não ao estresse induzido por três intensidades de pressão negativa e a criotolerância dos embriões produzidos	64
6.3.2	Experimento 6: Uso de estresse controlado por pressão negativa em oócitos imaturos na criotolerância de blastocistos suínos produzidos por partenogênese	65
6.3.3	Experimento 7: Progressão do desenvolvimento embrionário de blastocistos expostos ou não a três intensidades de pressão negativa, como forma de estresse controlado	67

6.3.4	Experimento 8: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em embriões, na sobrevivência a vitrificação de blastocistos suínos produzidos por partenogênese	69
6.3.5	Experimento 9: Estresse controlado por pressão negativa sequencial: efeito da pressão de 250 mBar em oócitos imaturos seguido de 500 mBar de pressão em embriões, na sobrevivência dos blastocistos partenotos suínos à vitrificação	69
6.4	FASE 4: O USO DE NITROGÊNIO REFRIGERADO NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA	70
6.4.1	Experimento 10: O uso de slush no nitrogênio durante a vitrificação de embriões suínos	70
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Entre os diversos animais domésticos, os suínos figuram como uma das espécies mais sensíveis quanto a manipulação embrionária, principalmente quando se trata de embriões produzidos *in vitro*. Estudos vêm sendo conduzidos com o propósito de aumentar a viabilidade de embriões suínos, não somente frescos, como também os criopreservados. No entanto, quando comparados com espécies como os bovinos, a eficiência dessas técnicas ainda deixa muito a desejar.

Dentre os principais aspectos relacionados com as variações na eficiência das técnicas de criopreservação, podem ser citados: a origem embrionária, o estágio de desenvolvimento em que o embrião se encontra, o agente crioprotetor utilizado (e sua toxicidade às células), assim como a curva de resfriamento utilizada no processo de congelamento. A criopreservação de embriões é, de fato, uma importante ferramenta para a preservação e disseminação de genética entre diferentes locais do mundo.

Além dos fatores anteriormente citados, os embriões suínos também apresentam assincronia de desenvolvimento, apresentando com isso índices de produção embrionária variáveis nos diferentes estágios de desenvolvimento, ou seja, a cinética de desenvolvimento embrionário é variável ao longo do cultivo pré-implantação. Comportamento semelhante a este, também é observado durante o desenvolvimento *in vivo* dos embriões suínos. Portanto, essa particularidade dificulta a utilização dos processos de criopreservação, pois existem diferenças de criotolerância entre os distintos estágios de desenvolvimento.

Apesar da maior sensibilidade dos embriões suínos às técnicas de reprodução assistida como a criopreservação, o esclarecimento dos mecanismos celulares que são desencadeados durante as etapas de aplicação desta técnica já tem demonstrado significativos avanços. Durante a criopreservação, a sensibilidade embrionária, em conjunto com a toxicidade dos crioprotetores, atuam de forma singular na redução da sua viabilidade, configurando assim um dos principais motivos pelos quais ainda há grande variação na eficiência dos distintos protocolos de criopreservação para embriões suínos.

Uma das estratégias mais recentemente empregadas, objetivando aumentar a viabilidade de embriões e gametas, é a aplicação de alguma modalidade de estresse controlado. A submissão a esse estresse promove maior resistência das estruturas no enfrentamento a estresses futuros, entre eles a própria criopreservação. Dentre as modalidades conhecidas de estresse controlado utilizadas em gametas e embriões, destacam-se a pressão hidrostática positiva e o estresse osmótico. Uma forma alternativa de estresse controlado é a

pressão negativa, que já se mostrou eficiente para oócitos e embriões bovinos, e também para espermatozoides ovinos.

Ainda, sabe-se que a criopreservação de embriões suínos produzidos *in vitro* é dificultada pelo alto teor lipídico de suas células. Em função disso, a técnica de criopreservação que apresenta os melhores resultados é a vitrificação. Esta técnica associa a utilização de elevadas concentrações de crioprotetores com a alta velocidade de resfriamento, proporcionando uma rápida passagem pela fase de transição dos lipídeos. O aumento significativo da velocidade de resfriamento pode ser produzido através do uso do “slush” (produzindo o nitrogênio super-resfriado), que potencialmente pode aumentar a eficiência da vitrificação de embriões suínos.

A hipótese geral desse estudo está baseada na combinação de crioprotetores associado ao emprego de estresse controlado, em conjunto com o uso do nitrogênio super-resfriado (slush), aumentará a eficiência da vitrificação dos embriões suínos obtidos nos diferentes dias de desenvolvimento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUÍNOS

A multiplicação de animais de interesse, através da manipulação de gametas e embriões, está bem disseminada em algumas espécies domésticas, tais como bovinos, equinos, caprinos e ovinos. No caso dos suínos, mesmo sendo uma espécie de alto interesse zootécnico (Martinez et al., 2016), biomédico (Romar et al., 2016) e tendo ainda raças e fenótipos ameaçados de extinção, a sua multiplicação através de técnicas de reprodução assistida seja *in vivo* ou *in vitro*, ainda é muito limitada devido a baixa eficiência. Também, ao contrário de outras espécies domésticas, os suínos têm uma eficiência de produção embrionária muito baixa, sendo inclusive normal haver cerca de 25-30% de perda embrionária no início da gestação, mesmo quando esta foi concebida naturalmente (Koutsotheodoros et al., 1998). Este fato demonstra a fragilidade natural dos embriões suínos e a baixa competência dos gametas.

Além de limitações na produção embrionária por concepção natural, a eficiência também é limitada após protocolos de superovulação, bem como na produção *in vitro* e transferência de embriões. Quando é realizada a superovulação de porcas, são obtidos em média 20 embriões por doadora (Nohalez et al., 2017), sendo transferidos entre 17 a 45 embriões por receptora, podendo-se obter eficiência de 22,1% de leitões nascidos (Nakazawa et al., 2008). Já para embriões produzidos *in vivo* e vitrificados, a eficiência de nascimento varia de 7,1 a 23,0%, dependendo da técnica de transferência utilizada (Martinez et al., 2015).

A qualidade dos embriões produzidos *in vitro* é pobre, se comparada com a de embriões obtidos *in vivo* (Gil et al., 2010; Nakamura et al., 2017). Kikuchi et al. (1999) relataram que oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* por um a dois dias, já apresentam reduzida capacidade de desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto, e também reduzido desenvolvimento de gestação a termo após transferência dos embriões. Isto tem sido atribuído a diversos fatores, tais como a maturação citoplasmática inadequada dos oócitos, que pode estar relacionada, ao menos em parte, com a maior frequência de polispermia (Gil et al., 2010). Embriões polispérmicos não apresentam alterações nas taxas de clivagem, permitindo ainda o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, embora com menor eficiência em comparação a embriões monospérmicos (Gil et al., 2013). Por vezes, a

eficiência de produção de blastocistos por fecundação *in vitro* (45,2%) pode ser inclusive superior a eficiência da fecundação monospermica (38,4%) (Cuello et al., 2013), demonstrando que parte dos oócitos polispermicos se desenvolvem até o estágio de blastocisto.

A seleção dos espermatozoides utilizados para a fecundação *in vitro* pode ser realizada de diversas formas, sendo frequentemente utilizado o gradiente de percoll, por resultar em altas taxas de fecundação (Jeong et al., 2001, Matás et al., 2011), clivagem (Noguchi et al., 2015) e produção de blastocistos (Matas et al., 2003, Noguchi et al., 2015). O método de seleção dos espermatozoides é capaz de influenciar diretamente na viabilidade dos mesmos, visto que para a seleção dos espermatozoides para a realização da fecundação *in vitro* podem ser realizadas lavagens simples por centrifugação (Gil et al., 2003, Gil et al., 2013). Por este motivo, com a utilização de soluções a base de sílica (como o percoll) durante a seleção dos espermatozoides, podem ocorrer lesões aos espermatozoides, assim como a alteração da osmolaridade da solução pode interferir na viabilidade dos mesmos. Além disso, Martinez et al. (2014) demonstraram que o cultivo *in vitro* de embriões produzidos *in vivo*, em meio quimicamente definido, mantém a viabilidade embrionária. Entretanto, somente essa manipulação já é responsável por causar um atraso no desenvolvimento desses embriões.

Embriões totalmente produzidos *in vitro* apresentam uma baixa eficiência de eclosão (Kim et al., 2004), quando comparados aos seus contemporâneos obtidos *in vivo*. A produção *in vitro* de embriões suínos pode ainda ser realizada por partenogênese. Embriões partenotos tem a habilidade de sinalizar e manter o início da gestação por 30 dias (Kawarasaki et al., 2009), sendo que a co-transferência de 20 embriões partenotos, com apenas uma mórula ou blastocisto produzido *in vivo*, foi capaz de produzir sete gestações e nascimentos, após nove transferências (Kawarasaki et al., 2009).

Como já é sabido, para que ocorra a manutenção inicial da gestação nos suínos é necessário ter a presença de ao menos quatro embriões viáveis no útero (Polge et al., 1966). Este reconhecimento inicial da gestação ocorre devido a liberação de estrógeno pelo embrião, que é secretado entre os dias 11 e 13 pós-fecundação, para assim garantir que nutrientes e prostaglandina F2-alfa sejam secretados no lúmen uterino, ao invés de serem liberados na veia uterina, o que levaria à luteólise e falha na manutenção da gestação (Bazer e Johnson, 2014). O estrógeno é liberado através das células do trofocotoderma embrionário (Perry et al., 1976), sendo possível detectar a presença de receptores de estrógeno nas células embrionárias, já no estágio de uma célula (Ying et al., 2000), através de imunocitoquímica, sendo que a atividade

dos receptores de estrógeno é necessária para o efeito direto do estrógeno nos embriões (Ying et al., 2000). A detecção da presença de receptores de estrógeno pode, portanto, ser considerada como um forte indício da presumível competência embrionária em embriões suínos produzidos *in vitro*.

2.2 CRIOPROTETORES E SEUS EFEITOS NAS CÉLULAS

É considerado crioprotetor qualquer soluto que quando adicionado às células permite sobrevivência superior comparada a sua não adição durante a criopreservação (Karow, 1969). Os crioprotetores são divididos basicamente em intra e extracelulares. Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular, que são permeáveis a membrana celular, o que é também dependente da temperatura. Por outro lado, os crioprotetores extracelulares possuem elevado peso molecular, não são permeáveis a membrana celular, e por essa razão promovem a desidratação celular. Todos os crioprotetores tem seu potencial tóxico às células, podendo esta toxicidade ser de origem química ou osmótica (Zhmakin, 2009).

Durante a criopreservação, a água que está ligada a solutos (crioprotetores) é considerada “osmoticamente inativa” e não está disponível para participar da formação de cristais de gelo (Elliot et al., 2017). É neste propósito que se baseia a vitrificação, forma mais eficiente de criopreservar os embriões suínos. Por definição, vitrificação é a solidificação de uma solução, quando exposta a baixas temperaturas, por adquirir uma alta viscosidade sem ocorrer a formação de cristais de gelo (Wowk, 2010). Na vitrificação, a associação de dois crioprotetores, um intra e um extracelular, geralmente proporciona a melhor combinação entre baixa toxicidade celular, e melhor efeito de crioprotetor. Por vezes, a concentração de crioprotetores pode ser reduzida se esta proporção for substituída por outro crioprotetor de ação semelhante, reduzindo assim a toxicidade às células, já que diferentes crioprotetores não possuem efeito tóxico cumulativo. Conforme relatado por Zhmakin (2009), embriões de diferentes espécies podem se comportar diferentemente a um mesmo crioprotetor, por este motivo é de grande relevância avaliar o efeito do crioprotetor na criopreservação dos diferentes tipos celulares.

2.2.1 Criopreservação de embriões suínos

A criopreservação de embriões suínos tem grande potencial para o armazenamento e para o intercâmbio de material genético de animais de alto valor zootécnico, na suinocultura e na biomedicina (Bartolac et al., 2015). Dentre os métodos de criopreservação, a vitrificação tem se mostrado mais eficiente para embriões suínos (Dobrinsky e Johnson, 1994; Cuello et al., 2004; Sanchez-Osorio et al., 2008).

A vitrificação consiste na exposição das estruturas a altas concentrações de crioprotetores, associado a uma alta velocidade de resfriamento, sem que ocorra a formação de cristais de gelo (Rall e Fahy 1985). Devido ao fato dos embriões suínos produzidos *in vitro* serem mais sensíveis a manipulações e possuem menor potencial de desenvolvimento, os protocolos de vitrificação tem sido desenvolvidos e testados, primeiramente, em embriões produzidos *in vivo*. Alguns trabalhos avaliaram variações de concentração de determinados crioprotetores, como o etileno-glicol (EG) (Cameron et al., 2000), EG e Polivinilpirrolidona (PVP) (Beebe et al., 2005), EG e Sacarose (SAC) (Cuello et al., 2008), as combinações de EG e dimetilsulfóxido (DMSO) associados a SAC (Kuwayama et al., 2005; Du et al., 2007, Cuello et al. 2008; Li et al., 2013; Berthelot et al., 2000; Berthelot et al., 2007), glicerol e SAC (Dobrinsky et al., 1998), associação de EG, propilenoglicol (PROP) e Ficoll (Bartolac et al., 2015) e associação de EG, Trealose (TRE) e Polietilenoglicol (Mito et al., 2015). Em busca de uma simplificação do protocolo de vitrificação, possibilitando assim a transferência direta dos embriões, alguns autores buscaram realizar o reaquecimento em um passo (Berthelot et al., 2007; Cuello et al., 2004; Sanchez-Osorio et al., 2008), ao invés do reaquecimento em dois (Beebe et al., 2005) ou quatro passos (Berthelot et al., 2000). De um modo geral, o que se observa quando se avalia os protocolos de vitrificação, são diversas variações de um único protocolo, apenas com comparações de diferentes concentrações dessa mesma combinação de crioprotetores.

Para embriões produzidos *in vivo*, a taxa de sobrevivência à vitrificação é maior para blastocistos em comparação a mórulas (90,7% vs. 75,0%) (Martinez et al., 2015), fato que também foi observado por outros autores (Pollard e Leibo, 1994; Beebe et al., 2002; Cuello et al., 2004; Ushijima et al., 2004).

2.2.2 Particularidades dos embriões suínos à criopreservação

Diversas são as particularidades dos embriões suínos em relação a outras espécies domésticas, que acabam tornando-os mais sensíveis às diversas manipulações envolvidas nas diferentes técnicas de reprodução assistida, sendo estes inclusive mais sensíveis aos danos causados pela criopreservação (Dobrinsky, 1997; Pollard e Leibo, 1994). Entre as causas desta sensibilidade exacerbada estão a alta ocorrência de polispermia seguida do posterior desenvolvimento embrionário (Gil et al., 2013), a grande quantidade de lipídeos nos embriões (Polge e Willadsen, 1978; Nagashima et al., 1994), e a diferença de velocidade de desenvolvimento entre os embriões. Inclusive, vem sendo estudada a eficiência distinta de sobrevivência a vitrificação entre embriões obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo (Morató et al., 2014).

Para melhorar a eficiência dos protocolos de fecundação *in vitro* (FIV) e reduzir a incidência de polispermia, vários são os ajustes nos protocolos de FIV, tais como o método de seleção dos espermatozoides, e até a forma de co-incubação destes com os oócitos. Já para tornar os embriões mais criotolerantes, uma alternativa previamente testada é a delipidação dos mesmos (Nagashima et al., 1994), que já se mostrou eficiente tanto para embriões produzidos por partenogênese (Esaki et al., 2004), quanto para embriões produzidos por FIV (Men et al., 2006; Cuello et al., 2013). O uso de soro fetal bovino (SFB) torna os embriões suínos produzidos *in vitro* mais hábeis à criopreservação (Men et al., 2005), no entanto o uso de meios quimicamente definidos tem por vezes recebido atenção por diminuir o risco de transmissão de doenças, por vezes sem reduzir a capacidade de desenvolvimento dos embriões (Sánchez-Osorio et al., 2010).

Devido a complexidade de associar todas estas particularidades, ainda há muita variação quanto aos crioprotetores e aos tempos de exposição utilizados nos protocolos de vitrificação. Variações que ocorrem entre os diferentes sistemas de produção de embriões também podem representar um entrave para a extrapolação de protocolos entre diferentes laboratórios. Todavia, a investigação cuidadosa dos efeitos de diferentes protocolos para cada estágio de desenvolvimento pode trazer uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na sobrevivência pós criopreservação para embriões suínos em estágio de pré-implantação.

2.3 EFEITOS DO SLUSH DURANTE A VITRIFICAÇÃO

A exposição do nitrogênio líquido ao vácuo faz com que ocorra redução na sua temperatura de -196°C para temperaturas abaixo de -210°C , além de modificar a estrutura física de líquido para sólido, promovendo o chamado “slush”. Esta menor temperatura do nitrogênio permite que ao submergir qualquer objeto no nitrogênio líquido, não ocorra a formação de bolhas de ar ao redor do objeto, durante e imediatamente após a imersão, aumentando assim a velocidade de resfriamento das estruturas criopreservadas. O uso do *slush* na criopreservação já se mostrou eficiente para oócitos bovinos (Santos et al., 2006), sendo que para embriões bovinos, essa estratégia não evidenciou diferenças de eficiência (Werlich et al., 2006).

Devido a alta sensibilidade dos embriões suínos, o uso do slush se mostra como uma alternativa para promover maior criotolerância a estes embriões. No entanto, ainda há controvérsias quanto a eficiência desta técnica, com estudos não demonstrando a melhora na sobrevivência dos embriões (Cuello et al. 2004), e outros demonstrando a melhora da sobrevivência pós-reaquecimento dos embriões (Beebe et al., 2005). Com o uso do nitrogênio super-resfriado, a velocidade de resfriamento pode ultrapassar $135.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Beebe et al., 2005). Com a diminuição da temperatura e do estado físico do nitrogênio, aumenta-se a velocidade de resfriamento, sendo possível diminuir a concentração de crioprotetores durante a vitrificação, diminuindo assim a toxicidade aos mesmos.

2.4 ESTRESSE CONTROLADO COMO ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA EMBRIONÁRIA A MANIPULAÇÃO

O uso de pressão hidrostática positiva, utilizada inicialmente para aumentar o tempo de prateleira de alimentos, teve seus estudos iniciados em 1899, sendo aplicada ao leite *in natura* (Hite, 1899), vindo posteriormente a ser testada para uma infinidade de alimentos. Wememkamp-Kamphuis et al. (2002) observaram que a pressão hidrostática positiva, além de aumentar o tempo de prateleira de determinados alimentos, aumentou a sobrevivência e multiplicação da listéria. Este fato chamou a atenção e desde então vem sendo testado o uso do estresse controlado por pressão positiva para aumentar a viabilidade de embriões, oócitos (Du et al., 2008) e espermatozoides.

A pressão hidrostática positiva tem se mostrado adequada para o aumento da eficiência de oócitos suínos durante a clonagem manual e posterior incremento na criotolerância dos embriões produzidos (Du et al., 2008). Além desta forma de estresse controlado, tem-se avaliado o uso de outras formas de estresse, tais como o choque osmótico (Lin et al., 2009) e a pressão negativa, esta última já previamente testada em oócitos e embriões bovinos (Mezzalana, 2018).

Desta forma, existe uma convergência de fatos apontando que embriões suínos que chegam ao estágio de blastocisto em momentos distintos do cultivo, exigem distintas adequações para a manutenção de sua viabilidade. No presente estudo, busca-se adequar a qualidade de embriões suínos produzidos por FIV, bem como o desenvolvimento de protocolos de criopreservação que proporcionem o aumento da eficiência no uso de embriões originalmente distintos quanto a sua viabilidade.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

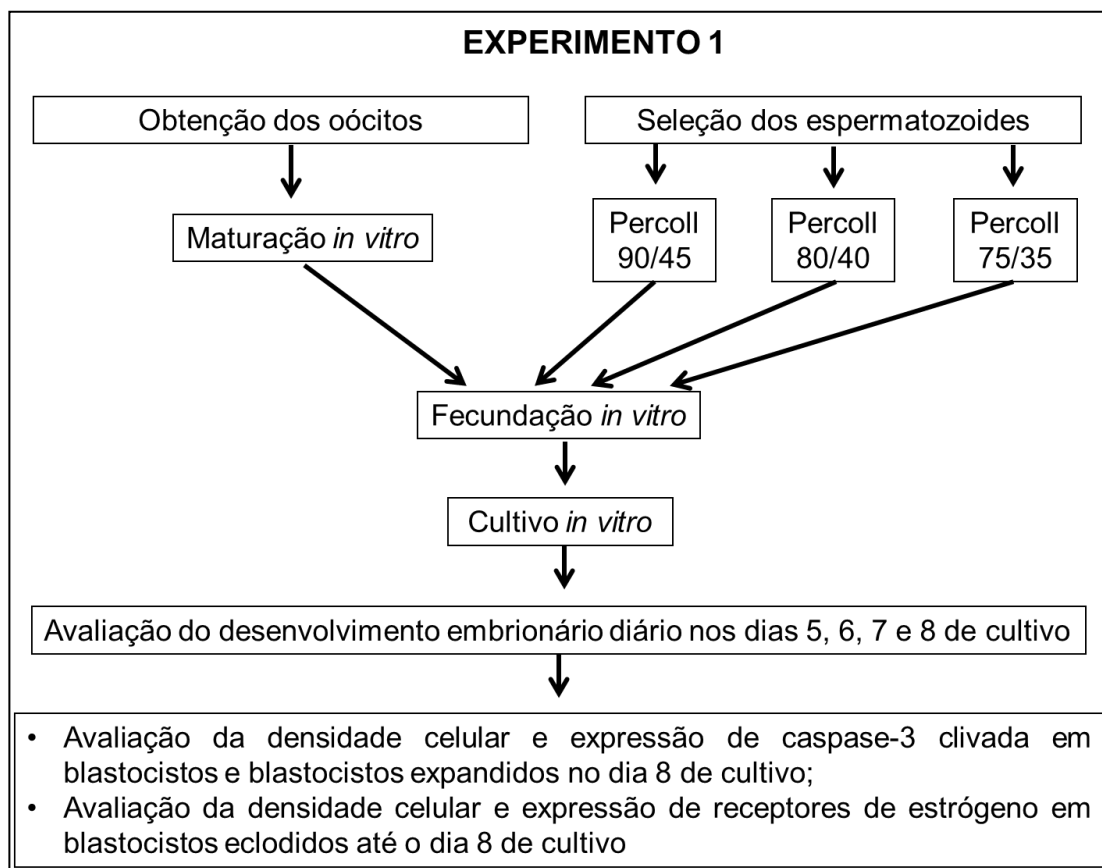
3.1 FASE 1: PADRONIZAÇÃO DA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA A FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

3.1.1 Experimento 1: Efeito da concentração de percoll durante a seleção de espermatozoides suínos no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Na primeira fase, que buscou padronizar a metodologia de processamento do sêmen de forma mais eficiente para realizar a fecundação *in vitro* de forma mais eficiente. Para tal, foram realizadas quatro repetições, testando diferentes gradientes proporcionais de percoll (90/45%, 80/40% e 70/35%) para a seleção espermática, avaliando o seu efeito ao longo do desenvolvimento embrionário. A hipótese deste trabalho baseia-se no fato de que as menores concentrações de percoll são menos tóxicas aos espermatozoides, dando origem a embriões com maior viabilidade.

O organograma representativo do experimento 1 encontra-se na figura 1.

Figura 1. Organograma representativo do experimento 1.



Fonte. Elaborado pelo autor, 2018.

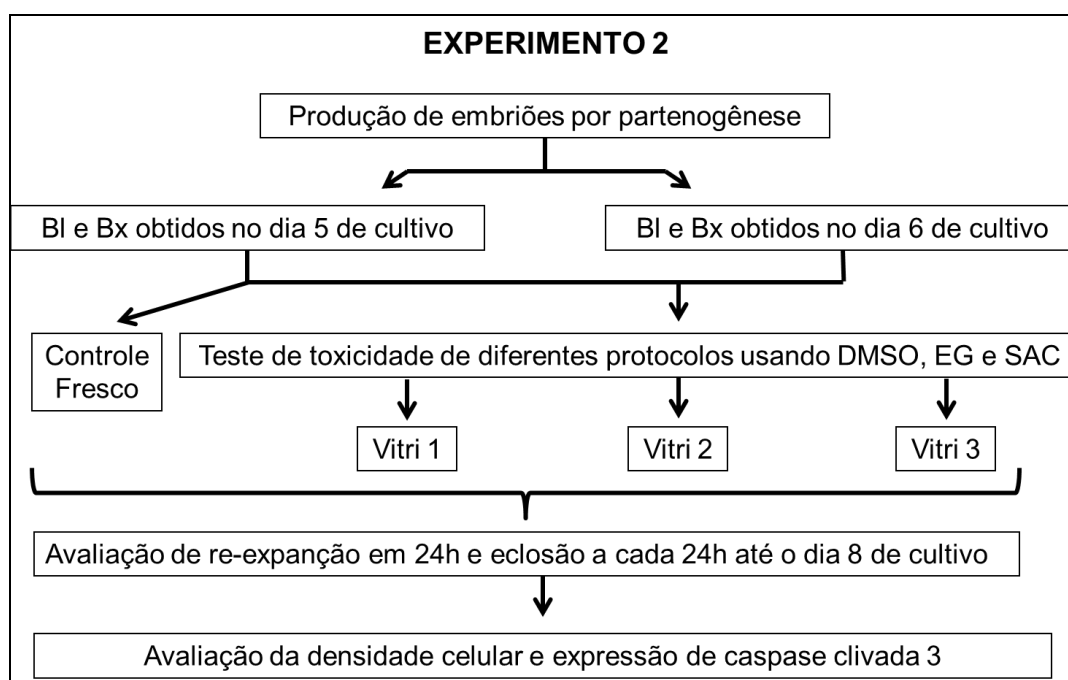
3.2 FASE 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

3.2.1 Experimento 2: Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo utilizando diferentes concentrações dos crioprotetores EG, DMSO e SAC

Nessa segunda fase, foi avaliado o uso de diferentes crioprotetores na vitrificação de embriões suínos produzidos por ativação partenogênética. Inicialmente, no experimento 2 (seis repetições) foram avaliadas a re-expansão e a eclosão de embriões (BI e Bx) obtidos nos D5 e D6, previamente expostos a testes de toxicidade, comparando três protocolos de vitrificação (Du et al., 2007, adaptado de protocolo de vitrificação utilizado inicialmente para vitrificação de oócitos humanos – Kuwayama et al. 2005, Vitri 1; Cuello et al. 2008, Vitri 2; Li et al., 2013) que utilizam os mesmos crioprotetores combinados (Dimetilsulfóxido - DMSO, Etileno-glicol – EG, e Sacarose - SAC), em diferentes concentrações e tempos de incubação.

O delineamento experimental está resumido na figura 2.

Figura 2. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

O detalhamento das soluções de vitrificação e reaquecimento utilizados no experimento 2 encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Discriminação das concentrações de crioprotetores e tempos de exposição às soluções de vitrificação e reaquecimento utilizados no experimento 2.

Grupo	Soluções de Vitirificação				Soluções de Reaquecimento			
	Solução 1		Solução 2		Solução 1		Solução 2	
	[]	Tempo	[]	Tempo	[]	Tempo	[]	Tempo
Vitri 1	7,5% DMSO 7,5% EG	5-15 min	15% DMSO 15% EG 0,5M SAC	1 min	1M SAC	1 min	0,5M SAC	3min
Vitri 2	7,5% DMSO 7,5% EG	3 min	16% DMSO 16% EG 0,4M SAC	1 min	0,13M SAC	5 min	—	—
Vitri 3	10% DMSO 10% EG	3 min	18% DMSO 18% EG 0,5M SAC	1 min	1M SAC	1 min	0,5M SAC	3min

3.2.2 Experimento 3: Efeito do PVP, da SAC e da TRE como crioprotetores extracelulares

No experimento 3 (quatro repetições), comparou-se a toxicidade de diferentes protocolos de vitrificação com base no crioprotetor intracelular EG (solução de equilíbrio com 2M de EG por 5 min, e solução de vitrificação com 8M de EG por 1 min) associado a diferentes crioprotetores extracelulares, durante a vitrificação. Os crioprotetores extracelulares testados foram Polivinilpirolodona (Grupo PVP, adaptado de Beebe et al., 2005, 7% de PVP 10), Sacarose (Grupo SAC, adaptado de Cuello et al., 2008, 0,4M de SAC) e Trealose (Grupo TRE, adaptado de Mito et al., 2015, 0,6M TRE). O reaquecimento de todos os grupos foi feito com 0,13M de SAC por 5 min.

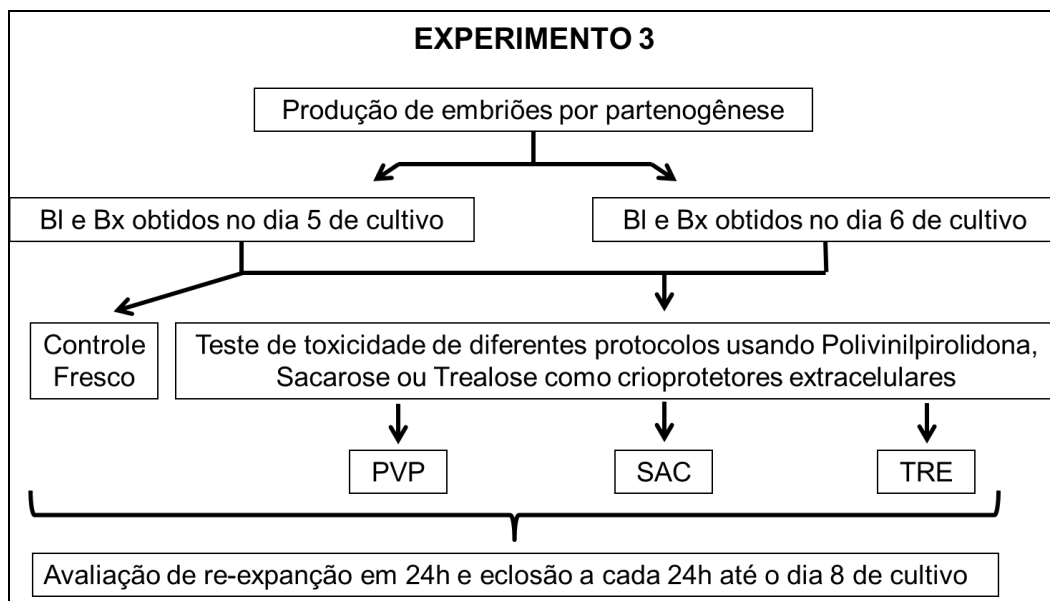
O delineamento experimental está resumido na figura 3.

3.2.3 Experimento 4. Viabilidade de embriões suínos após vitrificação com diferentes combinações de crioprotetores intra- e extra-celulares

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foram estruturados quatro protocolos, a partir das melhores combinações de crioprotetores intra e extra-celulares para vitrificar embriões dos dias 5 e 6 de desenvolvimento.

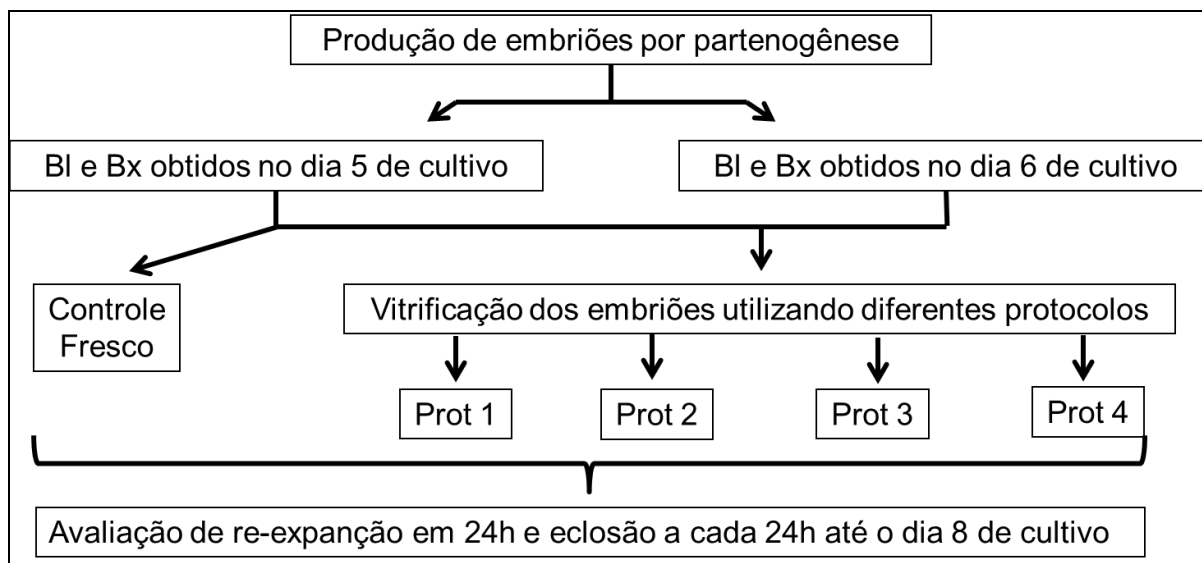
O delineamento experimental encontra-se ilustrado na figura 4.

Figura 3. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 3.



Fonte. Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 4. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 4.



Fonte. Elaborado pelo autor, 2018.

O experimento 4 (10 repetições) empregou, para os embriões do dia 5, quatro diferentes protocolos, que estão expostos na tabela 2.

Tabela 2. Concentrações e tempos de exposição aos crioprotetores utilizados para vitrificar os embriões obtidos no dia 5 de cultivo

Grupo	Soluções de Vitirificação				Soluções de Reaquecimento	
	Solução 1		Solução 2		Solução 1	
	[]	Tempo	[]	Tempo	[]	Tempo
Prot 1	7,5% DMSO 7,5% EG	5-15 min	15% DMSO 15% EG 0,5M SAC	1 min	0,13M SAC	5 min
Prot 2	7,5% DMSO 7,5% EG	5-15 min	15% DMSO 15% EG 0,5M SAC	1 min	0,13M TRE	5 min
Prot 3	2M EG	5 min	8M EG 0,5M SAC	1 min	0,13M SAC	5 min
Prot 4	2M EG	5 min	8M EG 0,5M SAC	1 min	0,13M TRE	5 min

Para os embriões do dia 6 foram testados quatro protocolos, que estão descritos na tabela 3.

3.3 FASE 3: ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

Na fase 3 foi avaliado o efeito do estresse controlado por pressão negativa e sua influência no desenvolvimento e criotolerância de embriões suínos, produzidos por ativação partenogenética.

Tabela 3. Concentrações e tempos de exposição aos crioprotetores utilizados para vitrificar os embriões obtidos no dia 6 de cultivo

Grupo	Soluções de Vitirificação				Soluções de Reaquecimento	
	Solução 1		Solução 2		Solução 1	
	[]	Tempo	[]	Tempo	[]	Tempo
Prot 1	7,5% DMSO 7,5% EG	5-15 min	15% DMSO 15% EG 0,6M TRE	1 min	0,13M SAC	5 min
Prot 2	7,5% DMSO 7,5% EG	5-15 min	15% DMSO 15% EG 0,6M TRE	1 min	0,13M TRE	5 min
Prot 3	2M EG	5 min	8M EG 0,6M TRE	1 min	0,13M SAC	5 min
Prot 4	2M EG	5 min	8M EG 0,6M TRE	1 min	0,13M TRE	5 min

3.3.1 Experimento 5: Desenvolvimento *in vitro* de oócitos suínos expostos ou não ao estresse controlado, por três intensidades de pressão negativa

No experimento 5 (seis repetições), oócitos imaturos foram expostos a três diferentes intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750, mBar) avaliando-se o seu posterior desenvolvimento após ativação partenogenética.

O delineamento experimental está ilustrado na figura 5.

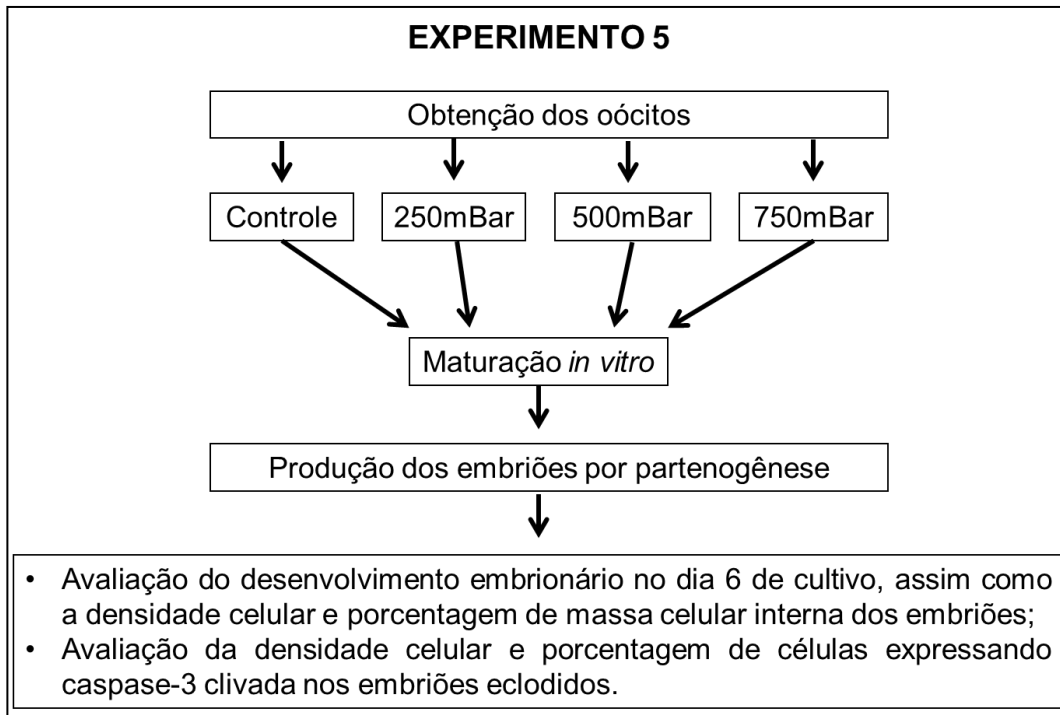
3.3.2 Experimento 6: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em oócitos imaturos, na posterior criotolerância dos blastocistos, produzidos por partenogênese

No experimento 6 (quatro repetições), foi avaliado o efeito do uso de estresse controlado pela pressão negativa de 250 mBar (que foi selecionada a partir do desempenho anteriormente, no experimento 5) em oócitos imaturos, na criotolerância dos blastocistos

produzidos nos dias 5 e 6 de cultivo. O protocolo de vitrificação utilizado foi o mesmo do grupo (Vitri 1) avaliado no experimento 2.

O delineamento experimental referente ao experimento 6 está representado na figura 6.

Figura 5. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 5.



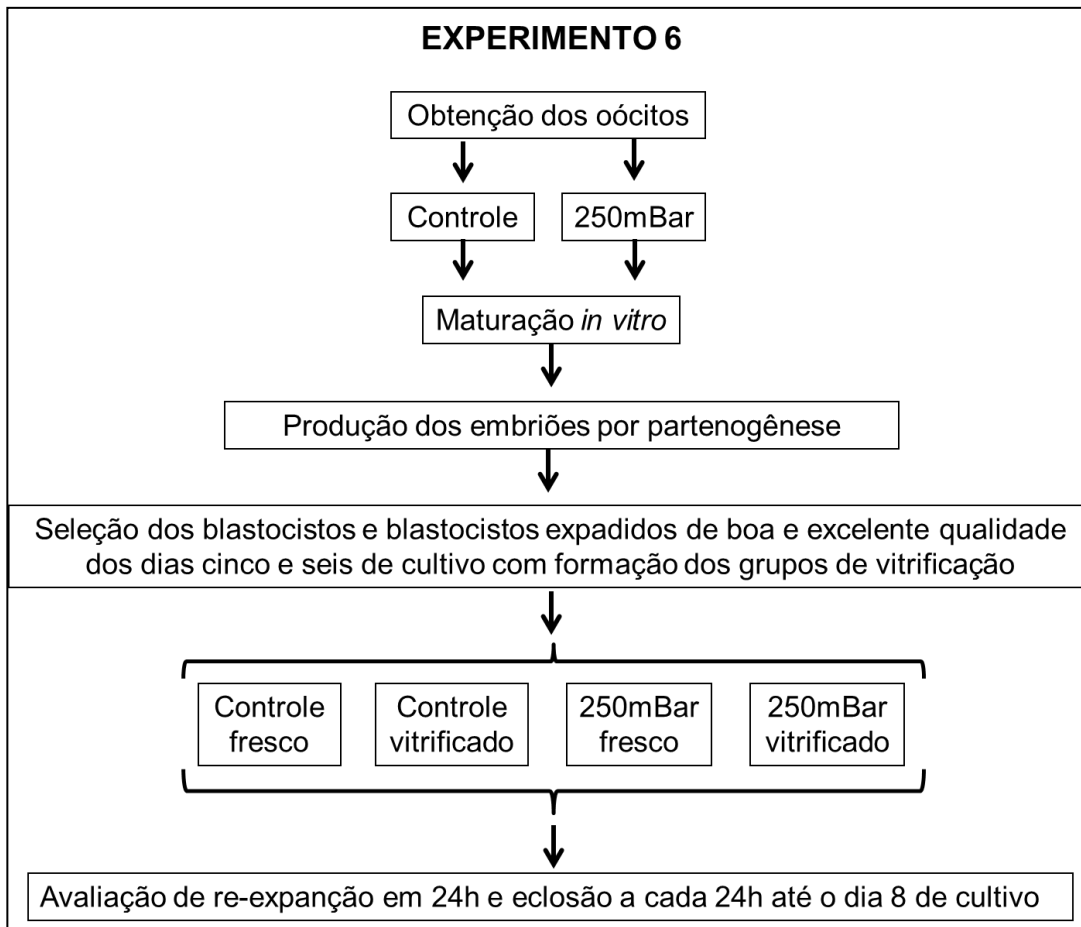
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.3.3 Experimento 7: Progressão do desenvolvimento embrionário de blastocistos, expostos ou não ao estresse controlado, por três intensidades de pressão negativa

No experimento 7 (cinco repetições), blastocistos e blastocistos expandidos de qualidade boa e excelente, obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo, foram expostos a três diferentes intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar), avaliando-se o seu posterior desenvolvimento.

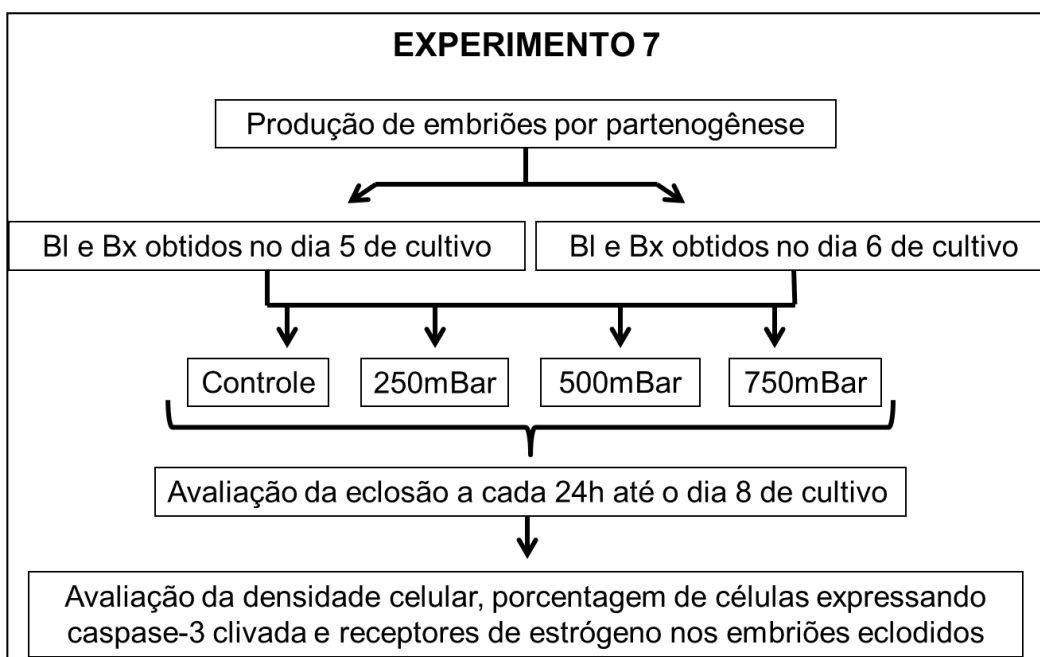
A figura 7 apresenta o organograma do delineamento experimental referente ao experimento 7.

Figura 6. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 6.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

Figura 7. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 7.



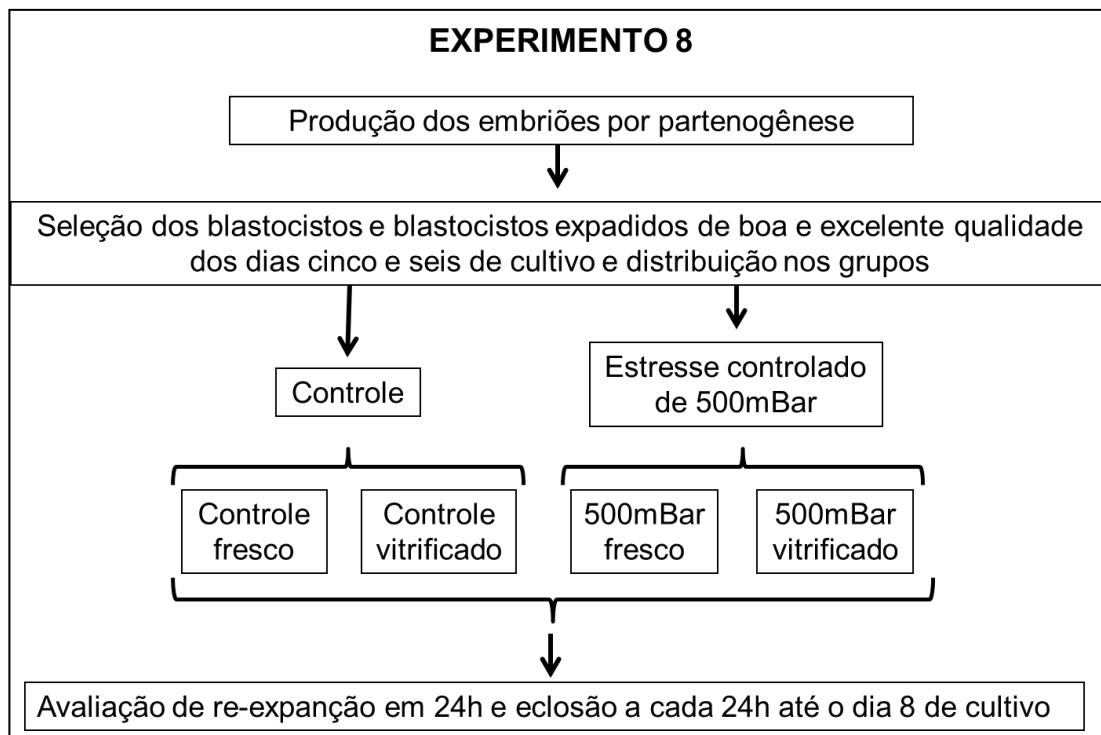
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018

3.3.4 Experimento 8: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em blastocistos suínos partenotos, na sua sobrevivência à vitrificação

No experimento 8 (quatro repetições), avaliou-se o uso de estresse controlado pela pressão negativa de 500 mBar (melhor resultado obtido no experimento 7) em embriões na vitrificação de blastocistos e blastocistos expandidos, de qualidade boa e excelente, obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo. O protocolo de vitrificação utilizado foi o mesmo do grupo (Vitri 1) avaliado no experimento 2.

A figura 8 ilustra o delineamento referente ao experimento 8.

Figura 8. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 8.



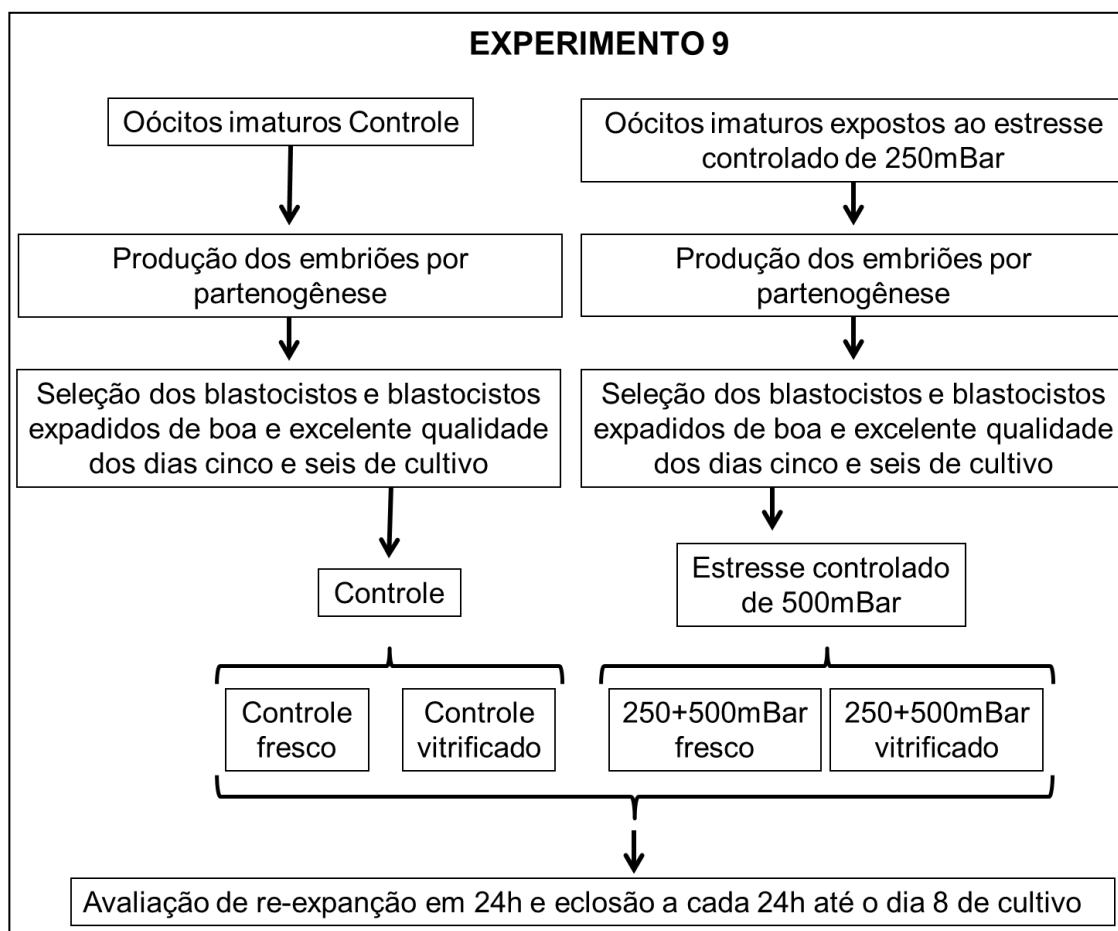
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.3.5 Experimento 9: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado sequencialmente em oócitos suínos imaturos e posteriormente nos respectivos blastocistos partenotos, na sua sobrevivência à vitrificação

No experimento 9 (quatro repetições), avaliou-se o efeito do estresse controlado por pressão negativa em oócitos imaturos (250 mBar) somado ao estresse em embriões (500 mBar) na vitrificação de blastocistos e blastocistos expandidos, de qualidade boa e excelente, obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo. O protocolo de vitrificação utilizado foi o mesmo do grupo (Vitri 1) avaliado no experimento 2.

O delineamento referente ao experimento 9 está representado na figura 9.

Figura 9. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 9.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

3.4 FASE 4: NITROGÊNIO SUPER RESFRIADO NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

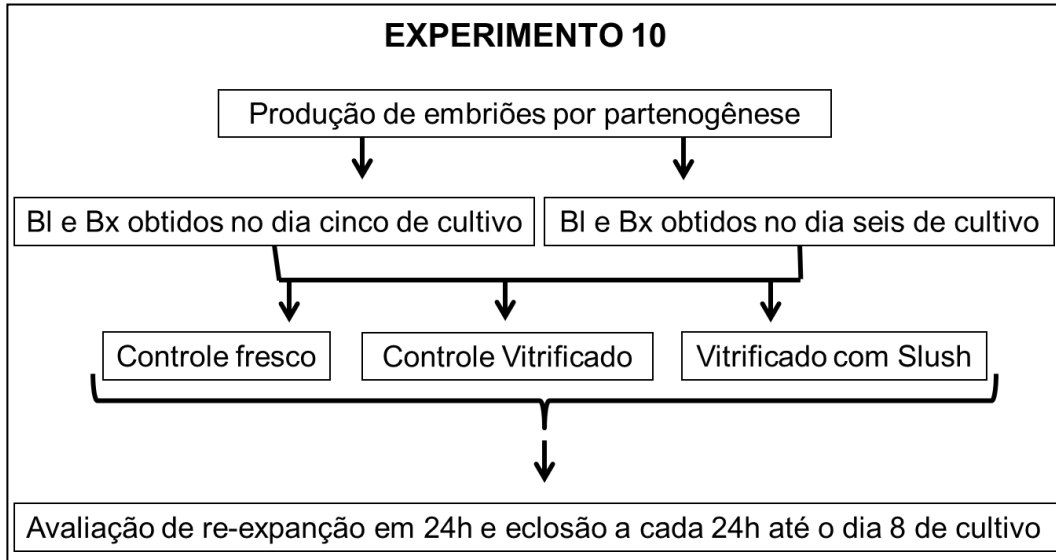
3.4.1 Experimento 10: Efeito do slush na vitrificação de blastocistos suínos partenotos

No experimento 10 (quatro repetições), avaliou-se o uso de slush (por super resfriamento) no nitrogênio, durante a vitrificação de blastocistos e blastocistos expandidos,

de qualidade boa e excelente, obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo. O protocolo de vitrificação utilizado foi o mesmo do grupo (Vitri 1) avaliado no experimento 2.

O organograma da figura 10 representa o delineamento do experimento 10.

Figura 10. Organograma do delineamento experimental referente ao experimento 10.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

Ovários coletados de abatedouro foram transportados até o laboratório em recipiente térmico e hermeticamente fechado, sendo aspirados os folículos medindo entre 3-6 mm, com auxílio de uma bomba de vácuo e agulha de 18G. Os complexos cumulus oócitos (CCOs) recuperados foram selecionados sob lupa estereomicroscópica no próprio líquido folicular centrifugado. Após classificação morfológica, os oócitos de qualidade boa ou excelente, de acordo com os critérios de classificação previamente descritos (Brogni et al., 2016) foram selecionados para produção dos embriões. Resumidamente, os critérios consistiam em ser completamente cobertos por células do cumulus compactas, tendo pouca ou nenhuma granulação no citoplasma do oócito.

4.2 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Os CCOs selecionados foram submetidos à MIV em placas de cultivo celular de 4 poços contendo 400µL de meio de maturação, em grupos de 40-50 CCOs por poço. Durante as primeiras 22 h de MIV o meio era composto por TCM-199 com 25% (v/v) de líquido folicular suíno, suplementado com 0,1 mg/mL de cisteína, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (Invitrogen), 0,91 mM de piruvato de sódio, 3,05 mM de D-glicose, 0,5 mg/mL de hormônio luteinizante (LH, Lutropin, Bioniche, Animal Health, Canada), 0.01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH, Folltropin, Bioniche, Animal Health, Belleville, Ontario, Canada), 1 mM de dibutiril-AMP cíclico (dbcAMP), 100 IU/mL de penicilina G e 0.1 mg/mL de sulfato de estreptomicina. Após este período, os oócitos foram lavados e incubados por mais 20-24h, no mesmo meio de maturação, porém desprovido de LH, FSH e dbcAMP. Todas as incubações da MIV foram em estufa a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, com umidade saturada.

4.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

O sêmen fresco utilizado era coletado 24 h antes, de um suíno previamente comprovado para a FIV, sendo armazenado a 17°C sob proteção da luz em diluente BTS (Beltsville Thawing Solution) até momentos antes da FIV. O sêmen era aquecido durante 40

min em banho-maria a 37°C, sendo os espermatozoides selecionados posteriormente através de um gradiente descontínuo de mini-percoll, conforme o tratamento avaliado (90 e 45%, 80 e 40%, ou 70 e 35%). Foram utilizados 300 µL de cada concentração de percoll e 100 µL de semen. Após centrifugação (13.100 x g, por 2 minutos) e lavagem em meio mTBM (Brogni et al., 2016) (11.400 x g por 45 segundos), era determinada a concentração espermática, sendo a FIV realizada com uma dose inseminante de 125.000 espermatozoides/mL. Os oócitos maturados eram transferidos para meio de manipulação (TCM-Hepes com 20% de soro fetal bovino), para que as células do cumulus fossem removidas por pipetagens sucessivas, sendo estes então passados para placas contendo meio mTBM adicionado de 2 mM de cafeína. O período de co-incubação dos oócitos maturados com os espermatozoides selecionados era de 3 horas, nas mesmas condições de atmosfera e temperatura das descritas para MIV. Após a co-incubação os oócitos eram novamente submetidos a pipetagens sucessivas para remoção dos espermatozoides aderidos a zona pelúcida.

4.4 ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

Os oócitos maturados eram submetidos ao desnudamento por pipetagens sucessivas em meio de manipulação e ativados através da exposição a ionomicina (15 µM por 5 min) em TCM-Hepes, seguido da incubação em 6-dimetilaminopurina (2 mM por 3-4h) em meio PZM-3 (Yoshioka et al., 2002). Após a ativação, os oócitos eram passados para o cultivo *in vitro* (CIV).

4.5 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Após o término da FIV ou, quando fosse o caso, da ativação partenogenética (D0, dia zero do cultivo e desenvolvimento embrionário), os presumíveis zigotos eram cultivados *in vitro* em meio PZM-3 (Yoshioka et al., 2002), nas mesmas condições descritas para MIV. No dia 4 de cultivo o meio era suplementado com 10% de SFB. As taxas de clivagem eram avaliadas no D2, e as taxas de blastocisto eram avaliadas nos dias 5, 6, 7 e 8 de CIV, de acordo com o experimento em questão.

4.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE CRIOPROTETORES EM BLASTOCISTOS

Foram testadas diferentes combinações de crioprotetores, tanto intracelulares (Etileno Glicol - EG e Dimetilsulfoxido - DMSO), quanto extracelulares (Sacarose - SAC, Trealose - TRE e Polivinilpirolidona - PVP). A toxicidade em embriões dos estágios de blastocisto e blastocisto expandido foi avaliada em embriões obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo. Foram utilizados embriões de qualidade excelente (com coloração homogênea, sem a presença de fragmentos ou vacúolos), ou de qualidade boa (com coloração homogênea, com a presença de poucos fragmentos ou vacúolos). As concentrações e tempos de exposição aos crioprotetores que foram avaliadas, eram semelhantes a protocolos de vitrificação já previamente estabelecidos para embriões suínos. Para a execução dos testes, os embriões eram expostos a uma das soluções de equilíbrio, seguida de uma das soluções de vitrificação, sendo então passados para os meios de reaquecimento de acordo com o protocolo testado, sem a execução da criopreservação. Durante todas as repetições, um grupo de embriões foi mantido como controle, sem exposição aos crioprotetores. Após a execução dos testes de toxicidade, os embriões eram novamente colocados em CIV e mantidos até o dia 8 de cultivo.

4.7 VITRIFICAÇÃO DOS BLASTOCISTOS

Conforme os resultados encontrados nos testes de toxicidade, associações de crioprotetores que se evidenciaram menos tóxicas aos embriões foram utilizadas na vitrificação embriões. Foram utilizados somente os blastocistos e blastocistos expandidos de qualidade boa e excelente. Para a vitrificação, um grupo de 3 a 5 embriões era exposto a solução de equilíbrio, contendo somente o crioprotetor intra-celular, na metade da sua concentração final. Então os blastocistos eram imediatamente submetidos à solução de vitrificação, contendo os crioprotetores intra e extracelulares. Já durante a exposição à solução de vitrificação, os embriões eram envasados por capilaridade, em uma micropipeta de vidro estirada, que ao término do tempo de exposição era submersa no nitrogênio líquido (N₂L).

Para o reaquecimento, as micropipetas com os embriões foram removidas do N₂L e a ponta da micropipeta de vidro submersa na solução de reaquecimento, onde os embriões ficavam de acordo com o protocolo em questão. Após, os embriões eram transferidos para o meio de manipulação, onde permaneciam por 10 min adicionais, antes que fossem novamente colocados na estufa, onde continuidade da incubação, na própria placa de CIV.

4.8 CONTROLE DA VELOCIDADE DE RESFRIAMENTO DURANTE A VITRIFICAÇÃO

Para a vitrificação convencional, o N₂L era apenas mantido em uma caixa de isopor contendo suportes parcialmente submersos, onde as micropipetas eram mantidas de acordo com o grupo experimental. No entanto, para realizar o incremento da velocidade de resfriamento durante a vitrificação (vitrificação com slush), o N₂L era mantido em recipiente de isopor que era submetido ao tratamento por pressão negativa, no interior do aparelho Nitrocooler. Este, através da aplicação de pressão negativa, durante alguns minutos, induzia a solidificação e o consequente resfriamento do N₂L, induzindo assim o fenômeno denominado slush. Os blastocistos e blastocistos expandidos foram vitrificados pela exposição das micropipetas de vidro ao nitrogênio, com ou sem slush (Controle).

4.9 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA VIABILIDADE EMBRIONÁRIA APÓS TESTE DE TOXICIDADE E VITRIFICAÇÃO

Os critérios de viabilidade utilizados após a realização dos testes de toxicidade, assim como após as vitrificações propriamente ditas, foram a taxa de re-expansão (avaliada 24 h após a manipulação) e a taxa de eclosão, avaliada a cada 24 h, até o dia 8 de cultivo. A cada avaliação que continha blastocistos eclodidos, estes eram coletados em PBS contendo 4% de formol, acrescentado de 3% de BSA, para avaliação da expressão de receptores para estrógeno e caspase.

4.10 APLICAÇÃO DE ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA AOS OÓCITOS E EMBRIÕES

O equipamento Nitrocooler, que foi desenvolvido no próprio laboratório, e posteriormente implementado para experimentos de indução de estresse controlado, foi utilizado para aplicação da pressão negativa.

Cada grupo de oócitos e embriões foi exposto a 3 diferentes intensidades de pressão, 250, 500 e 750 mBar, respectivamente. A pressão foi aplicada nas estruturas mantidas em placas de 4 poços, contendo 400 µL de meio de maturação para os oócitos imaturos e em meio de cultivo para os blastocistos. Os blastocistos e blastocistos expandidos submetidos à pressão negativa eram de qualidade boa e excelente, e obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo.

As placas eram colocadas na câmara hermética do equipamento, que era fechada antes que este fosse ligado. 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 equipamento era desligado, porém mantendo a válvula fechada, por mais 3 min. A pressão era então gradualmente aumentada (5 mBar/seg), através de cuidadosa abertura manual da válvula, até atingir a pressão atmosférica. Em seguida, as placas contendo as estruturas eram retiradas do equipamento.

Após a aplicação da pressão negativa e normalização da pressão na câmara do equipamento, os oócitos e embriões eram novamente incubados na estufa de cultivo celular, de acordo com o respectivo meio, para oócitos ou embriões, e então se prosseguiam as manipulações.

4.11 AVALIAÇÃO DOS EMBRIÕES QUANTO A DENSIDADE CELULAR E PROPORÇÃO DE CÉLULAS NA MASSA CELULAR INTERNA

O número total de células nos embriões, assim como a proporção de massa celular interna foram determinadas por coloração diferencial, de acordo com Mezzalira et al. (2010). Os embriões foram expostos a solução de PBS contendo 10 µg/mL de iodeto de propídio e 1 mg/mL Triton X-100 (solução de permeabilização) por 40 s, em temperatura ambiente. Estes foram então fixados por 7 min em álcool absoluto contendo 15 µg/mL Hoechst. Após fixados, os embriões eram então colocados em gotas de 2 µL de glicerol, entre lâmina e lamínula, sendo avaliados imediatamente, sob luz ultravioleta, utilizando-se microscópio invertido de epifluorescência.

O número total de células era observado através da coloração do DNA celular pelo Hoechst, enquanto o número de células do trofotoderma foi avaliada pela coloração do citoplasma das células pelo iodeto de propídio. A proporção de células na massa celular interna era calculada com base na diferença entre os valores de células totais e os valores de células do trofotoderma.

4.12 RESPOSTA CELULAR EMBRIONÁRIA AO ESTRESSE CONTROLADO E AOS CRIOPROTETORES: MORTE CELULAR PROGRAMADA OU APOPTOSE, E EXPRESSÃO DE RECEPTORES PARA ESTRÓGENO

Para avaliar a ocorrência de morte celular programada, através da detecção de caspase-3 clivada (C3C); e a competência embrionária, através da expressão de receptores de estrógeno (RE₂), foi realizada técnica de imunofluorescência (IF) nos embriões.

Para tal, os embriões foram coletados e fixados por pelo menos 20 min em solução de PBS contendo 4% de formol e 3% de BSA. Os embriões eram então incubados, em PBS suplementado com 3% BSA e 0.5% Triton X-100 (solução de permeabilização) por 1 h a 37°C. Após, estes eram lavados 2 vezes em solução de bloqueio (PBS com 0.2% de Tween-20 e 3% BSA), expostos *overnight* ao anticorpo primário anti-caspase 3 clivada em coelho, ou anti-receptor de estrógeno, também em coelho, que era diluído em solução de bloqueio na proporção 1:400 e 1:200, respectivamente. Após essa incubação, os embriões eram lavados 3 vezes por 20 min, em solução de bloqueio e incubados por 2 h a 37°C na presença do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 cabra anti-coelho na proporção de 1:400. Após, era realizada a lavagem em solução de bloqueio por 20 min, seguido de nova lavagem em solução de bloqueio contendo DAPI 1:1000, por 20 min, seguido de 20 min em solução de bloqueio. Ao término desta, os embriões eram colocados entre lâmina e lamínula, em uma gota de mowiol, e observados sob luz ultra-violeta em microscópio invertido de epifluorescência.

O número de células positivas para C3C ou RE₂ era contabilizado em cada embrião, sendo a sua proporção calculada com base na diferença entre o número total de células dos embriões, que tinham os núcleos corados com DAPI, e o número de células expressando fluorescência através do anti-corpo secundário Alexa Fluor 488.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A proporção de células positivas para expressão de CC3, RE₂, e da massa celular interna foram analisadas através do teste de Chi-quadrado, assim como as taxas de clivagem, produção de blastocistos, expansão e eclosão. As análises de densidade celular foram submetidas a ANOVA, e quando necessário os dados foram normalizados através do arco-seno da raiz quadrada do valor analisado, e comparados pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%, em todos os experimentos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 FASE 1: PADRONIZAÇÃO DA SELEÇÃO ESPERMÁTICA PARA A FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

6.1.1 Experimento 1: Efeito da concentração de percoll durante a seleção de espermatozoides suínos no desenvolvimento embrionário *in vitro*

Para aumentar a eficiência da técnica de fecundação *in vitro* (FIV), buscando aumentar a produção de embriões mais competentes, foram testadas diferentes concentrações do gradiente de percoll durante a seleção espermática, em quatro repetições. Utilizando sêmem fresco de um cachão adulto, foram testados os gradientes de 70% e 35% (70/35), 80% e 40% (80/40), e 90% e 45% (90/45) de percoll. Os resultados (Tabela 1) demonstram que não houve influência da seleção dos espermatozoides nas taxas de clivagem dos embriões.

Entretanto, a produção embrionária foi influenciada pela concentração de percoll empregada durante a seleção espermática, sendo que os grupos 70/35 (40,0%) e 80/40 (37,5%) obtiveram maior produção de embriões em relação ao grupo 90/45 (24,9%), sendo os primeiros semelhantes entre si (Tabela 1).

A maior taxa de eclosão embrionária no D8 foi do grupo 80/40 (45,5%), que foi superior ao grupo 90/45 (27,5%), sendo ambos semelhantes ao grupo 70/35 (32,9%) (Tabela 4). Ainda, foi observado que no grupo 70/35 houve a morte de 34,2% dos embriões até o dia 8 de cultivo, valor superior ao encontrado no grupo 80/40 (16,7%). Para o grupo 90/45, ocorreu a morte de 28,6% dos embriões, proporção semelhante ao demais grupos (Tabela 4). Esta elevada taxa de mortalidade embrionária observada no grupo 70/35, deve-se possivelmente ao fato de espermatozoides menos viáveis passarem através do gradiente de percoll realizando a fecundação, porém originando assim embriões menos viáveis.

Na avaliação diária da cinética de desenvolvimento embrionário, avaliado entre os dias 5 e 8 de cultivo, observou-se que o grupo 90/45 não teve diferença nas taxas de produção embrionária ao longo dos dias (Figura 11).

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário a partir de fecundação *in vitro* de oócitos suínos, utilizando diferentes gradientes de seleção espermática para seleção dos espermatozoides

Grupos	Cultivo	Clivagem	Blastocistos*	Morte embrionária**	Eclosão D8
	N	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)*
90/45	169	139 (82,2)	42 (24,9) ^b	12/42 (28,6) ^{ab}	11/42 (26,2) ^b
80/40	176	144 (81,8)	66 (37,5) ^a	11/66 (16,7) ^b	30/66 (45,5) ^a
70/35	190	152 (80,0)	76 (40,0) ^a	26/76 (34,2) ^a	25/76 (32,9) ^{ab}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

*Valores de porcentagem baseados no número máximo de embriões produzidos em cada grupo experimental até o dia 8 de cultivo

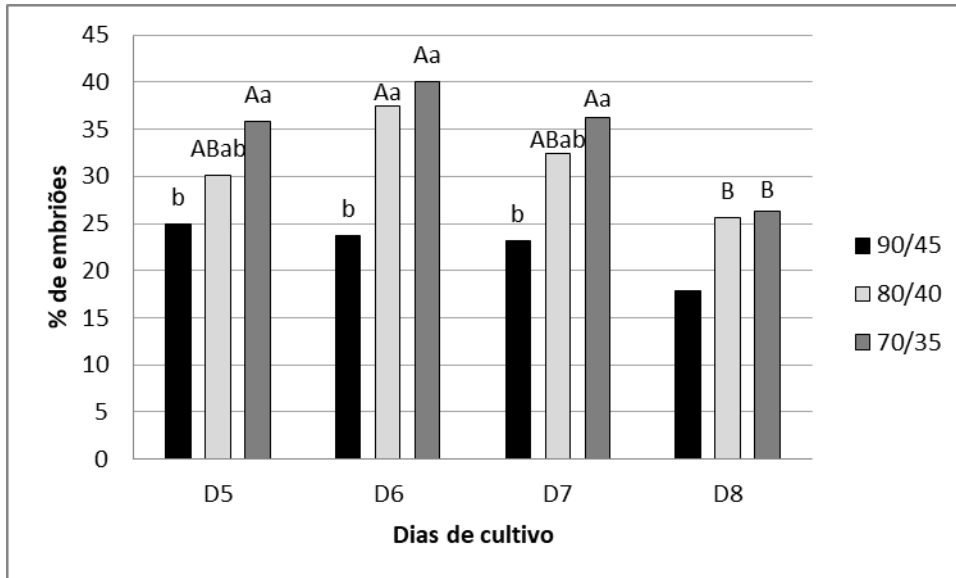
** Valores baseados no número de embriões que morreram até o dia 8 de cultivo

Ainda, avaliando-se os diferentes grupos ao longo dos dias, observa-se que o grupo 70/35 teve produção embrionária superior ($P \leq 0,05$) ao grupo 90/45 nos dias 5 (35,8 vs. 24,9%), dia 6 (40,0 vs. 23,7%) e dia 7 (36,3 vs. 23,1%). O grupo 80/40 foi superior ao grupo 90/45 somente no dia 6 de cultivo (37,5 vs. 23,7%) (Figura 11).

Os embriões obtidos nos grupos 80/40 e 70/35 apresentaram maior porcentagem de embriões eclodidos nos dias 6 e 7 de cultivo, e menor porcentagem de eclosão no dia 8 (Figura 12). Já os embriões do grupo 90/45 apresentaram maior taxa de eclosão no dia 7 de cultivo em relação aos dias 6 e 8 (Figura 12).

Os blastocistos eclodidos dos diferentes gradientes (90/45, 80/40 e 70/35) apresentaram semelhante número médio de células totais; $88,6 \pm 17,1$; $94,6 \pm 13,7$; e $102,1 \pm 13,2$, respectivamente (Figuras 13 e 14). No entanto, os blastocistos eclodidos dos grupos 80/40 e 70/35 obtiveram maior porcentagem de células expressando receptores de estrógeno em comparação ao grupo 90/45 ($22,6 \pm 5,7$; $39,3 \pm 5,5$; versus $3,6 \pm 7,2$, $P < 0,01$) (Figuras 13 e 14). Isto demonstra que embriões que são produzidos em um sistema em que a eclosão é concentrada mais tardiamente, como observado no grupo 90/45, embora apresentem uma adequada quantidade de células totais, podem ter menos chance de promover uma adequada sinalização da gestação, por apresentarem menos células expressando receptores de estrógeno.

Figura 11. Porcentagem acumulada dos diferentes estágios de blastocistos (% de embriões) ao longo dos dias de cultivo para os diferentes grupos de concentração de percoll durante a seleção espermática para a FIV.

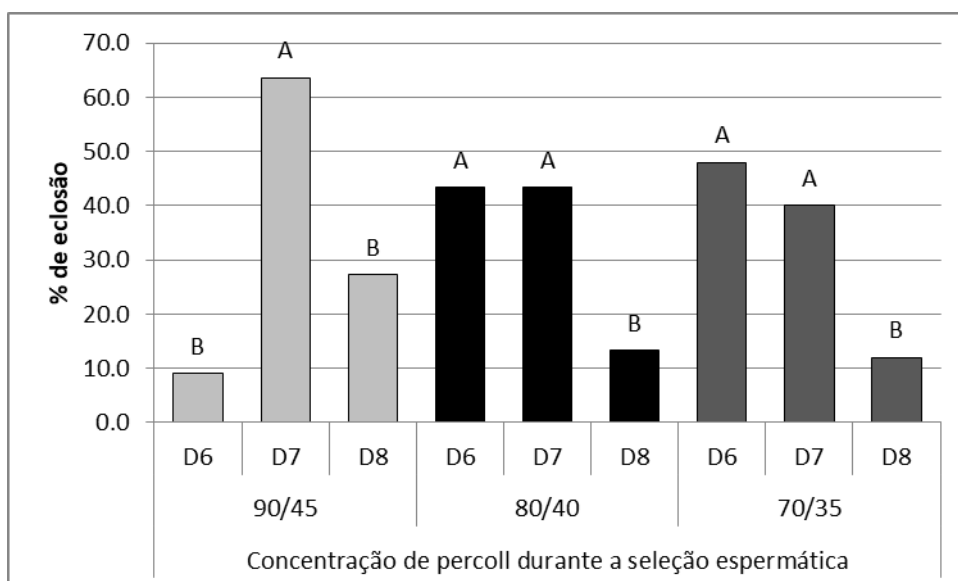


^{a,b} Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os grupos, no mesmo dia de cultivo ($P \leq 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes representam diferença para o mesmo grupo, entre os diferentes dias de cultivo ($P \leq 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Figura 12. Distribuição (em porcentagem) da eclosão ao longo dos dias de cultivo dos embriões (D6, D7 e D8) dos grupos constituídos das diferentes concentrações de percoll durante a seleção dos espermatozoides para a FIV (concentrações de 90/45, 80/40 e 70,35 %).

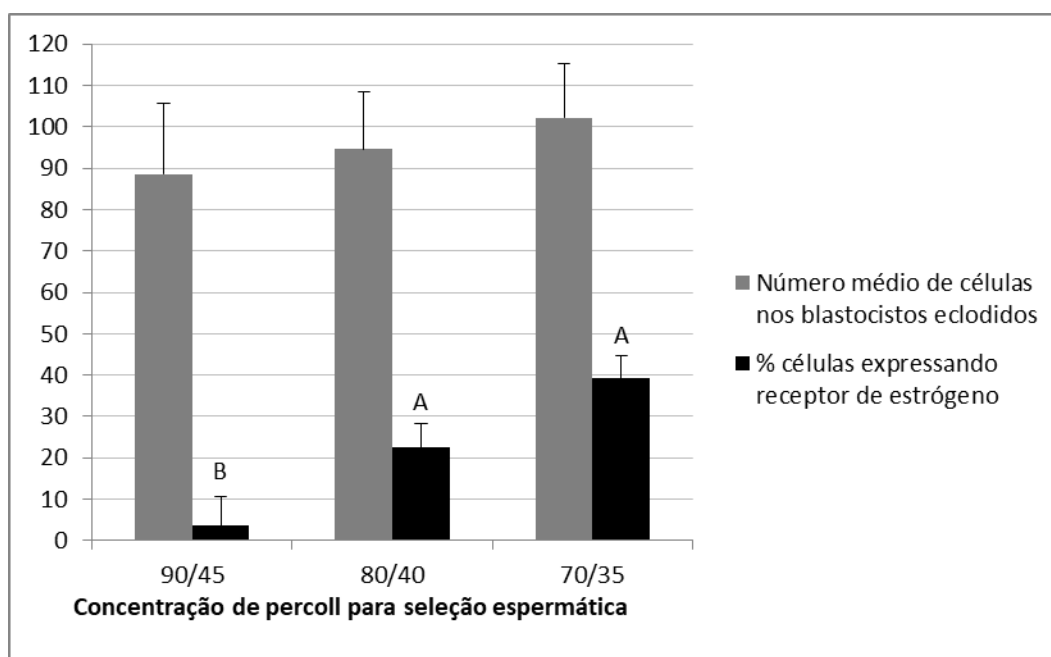


^{A,B} Letras diferentes representam diferença estatística para o mesmo grupo de concentração de percoll ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Os embriões eclodidos nos diferentes dias de cultivo (D6, D7 e D8) para os diferentes gradientes de percoll não apresentaram diferença na porcentagem de células expressando receptores de estrógeno. Deste modo, pode-se inferir que os embriões eclodidos dentro do mesmo grupo, indiferente do dia em que ocorreu a eclosão, apresentam semelhante potencial de sinalização de gestação, ou seja, se assemelham na presumível capacidade em estabelecer gestação.

Figura 13. Número médio de células totais nos blastocistos eclodidos (barras cinzas), e porcentagem de células expressando receptor de estrógeno (barras pretas).



Letras diferentes mostram diferença na porcentagem de células expressando receptor de estrógeno ($P < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

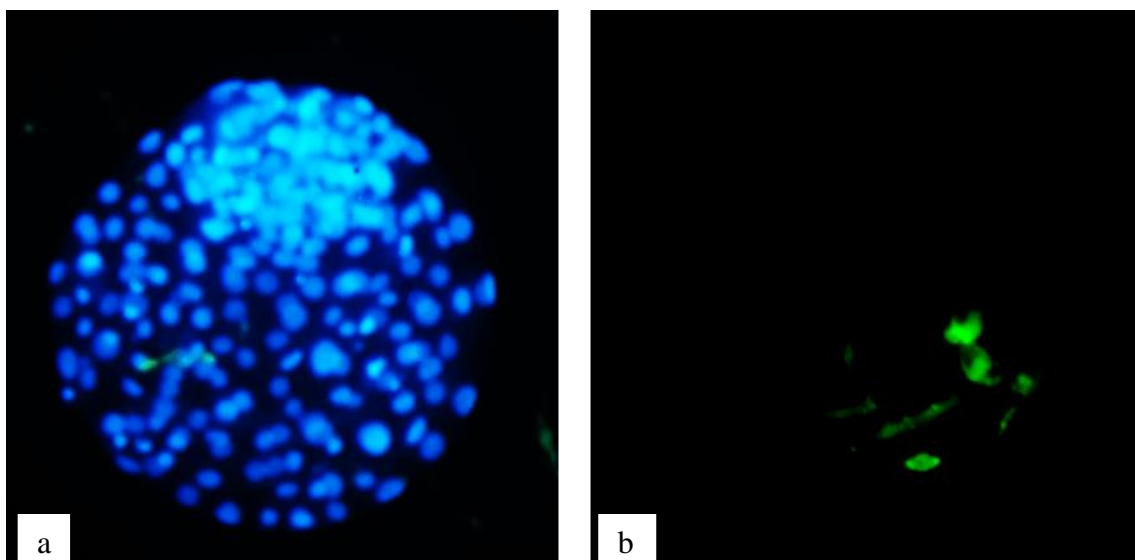
Em suínos, o estrógeno é essencial para a progressão de mórula compacta para o estágio de blastocisto (Niemann e Elsaesser, 1986). Este evento pode estar ligado ao maior índice de produção de blastocistos dos grupos 80/40 e 70/35, e da alta taxa de eclosão nestes

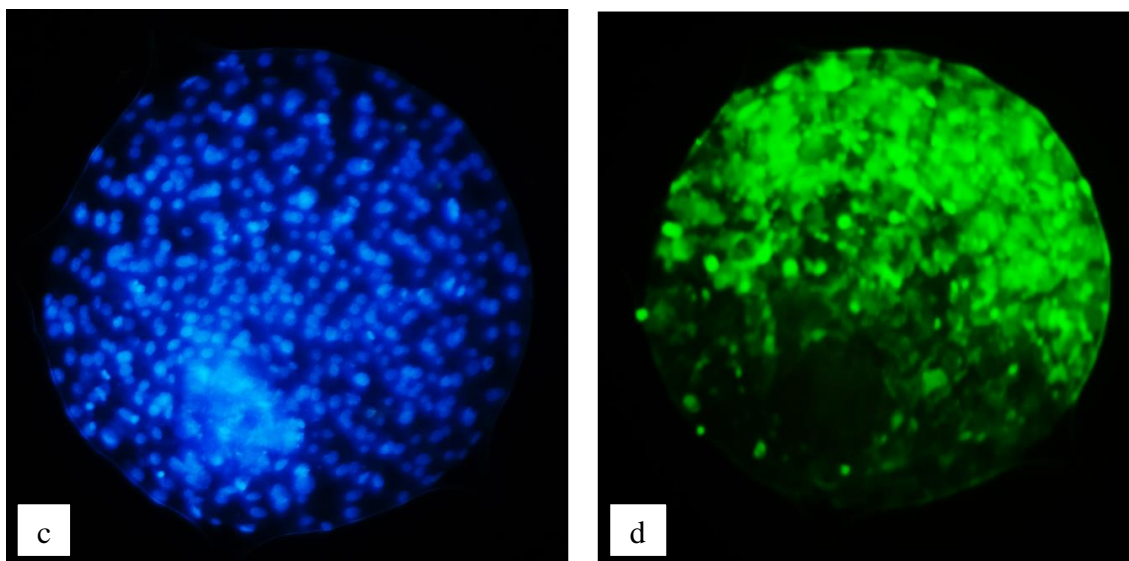
grupos, pois estes melhores índices embrionários corroboram com a maior proporção de células expressando receptor de estrógeno por eles apresentado.

Os embriões eclodidos tiveram semelhante proporção de células expressando caspase-3 clivada (13,1; 12,8 e 9,9% para os gradientes de 90/45, 80/40 e 70/35%, respectivamente). Já os embriões em estágio de blastocisto e blastocisto expandido, que não eclodiram até o dia 8 de cultivo, expressaram maior porcentagem de caspase-3 clivada no grupo 90/45 (18,3%) em comparação aos grupos 80/40 (12,7%) e 70/35 (10,7%), sendo que os últimos apresentaram proporções semelhantes entre si (Tabela 5, Figura 15). Estes embriões não eclodidos também mostraram diferença na quantidade total de células no dia 8. Os embriões do grupo 90/45 apresentaram menor número de células totais ($41,9 \pm 6,2$) em relação ao grupo 70/35 ($58,5 \pm 5,7$), sendo estes semelhantes ao grupo 80/40 ($50,7 \pm 7,0$).

Estes resultados permitem inferir que uma maior concentração de percoll durante a seleção dos espermatozoides afeta negativamente o desenvolvimento (Tabela 4) e a qualidade embrionária (Figura 13, Tabela 5), tanto em embriões eclodidos, quanto nos ainda não eclodidos. Sendo assim, é necessário o ajuste da concentração do gradiente de percoll para melhorar a eficiência na produção de embriões viáveis, a partir da técnica de FIV.

Figura 14. Embriões suínos eclodidos corados com DAPI (a, c) mostrando o número total de células dos embriões. Embriões corados com Alexa (b, d), mostrando as células que apresentam receptores para estrógeno. As imagens “a” e “b” representam o mesmo embrião, assim como as imagens “c” e “d”.





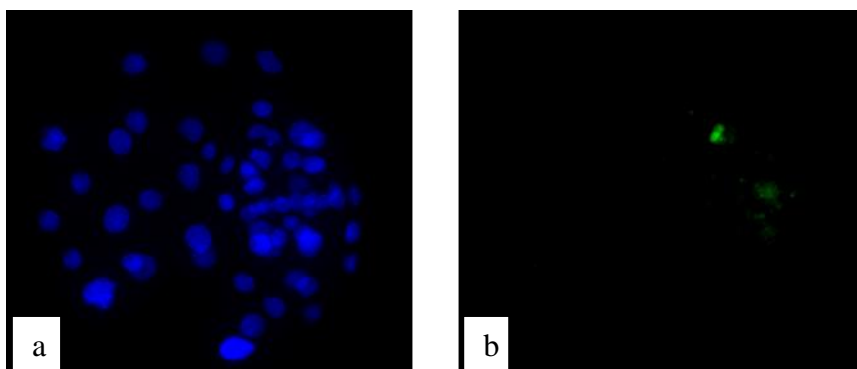
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Tabela 5. Número médio de células totais e de células expressando caspase 3 clivada em blastocistos e blastocistos expandidos de suínos, no dia 8 de cultivo.

Grupos	Blastocistos e blastocistos expandidos			
	Embriões avaliados N	Células totais ± EP	Células caspase 3 clivada positiva	
			N	%
90/45	15	41,9 ± 6,2 ^b	135/736	18,3 ^a
80/40	14	50,7 ± 7,0 ^{ab}	133/1048	12,7 ^b
70/35	20	58,5 ± 5,7 ^a	147/1379	10,7 ^b

^{a, b} na mesma coluna expressam diferença ($P < 0,05$)

Figura 15. Embrião suínos no estágio de blastocisto corado com DAPI (a) mostrando o número total de células do embrião. Embrião corado com Alexa (b), mostrando as células que apresentam expressão de caspase-3 clivada. As imagens “a” e “b” representam o mesmo embrião.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

6.2 FASE 2: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

6.2.1 Experimento 2: Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos ao teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo, utilizando diferentes concentrações dos crioprotetores EG, DMSO e SAC

Os dados da tabela 6 (6 repetições) mostram a re-expansão e a eclosão de embriões (Bl e Bx) obtidos nos dias 5 e 6 de cultivo e expostos ao teste de toxicidade. Esse teste comparou três protocolos de vitrificação (Vitri 1, Vitri 2, e Vitri 3) que utilizam os mesmos crioprotetores (DMSO, EG e SAC), combinados em concentrações e tempos de exposição diferentes. Observou-se que as taxas de expansão e de eclosão dos embriões Controle do dia 6, foram inferiores ($P < 0,05$) aos embriões do dia 5 de cultivo. Isto reflete a maior fragilidade dos embriões que chegam no estágio de Bl e Bx no dia 6 em relação aos que já haviam atingido esse estágio no dia 5 (Tabela 6).

As taxas de re-expansão dos grupos Vitri 2 e Vitri 3 foram menores quando utilizados embriões obtidos no dia 6 em relação ao dia 5 de cultivo. O grupo Controle para embriões do dia 5 teve expansão (100,0%), assim como a eclosão (60,8%) superiores aos grupos expostos aos crioprotetores, sendo que para os grupos Vitri 1 e Vitri 2 as taxas de expansão foram semelhantes entre si (50,0 e 52,8% respectivamente) e superiores ao grupo Vitri 3 (35,6%). Já as taxas de eclosão dos grupos Vitri 1 (15,3%), Vitri 2 (9,7%) e Vitri 3 (5,5%) foram semelhantes entre si.

Para os embriões obtidos no dia 6, a expansão do grupo Controle (84,5%) foi superior a todos os grupos expostos aos crioprotetores. O grupo Vitri 1 teve expansão (50,0%) superior aos grupos Vitri 2 (31,0%) e Vitri 3 (3,6%), sendo o grupo Vitri 2 superior ao grupo Vitri 3. Já a eclosão do grupo Controle (39,7%) foi semelhante ao grupo Vitri 1 (23,2%), sendo ambos superiores ao grupo Vitri 2 (8,6%), e ainda, estes superiores ao grupo Vitri 3 (0,0%).

Cuello et al. (2008) encontraram que com 15% de crioprotetor intracelular pode não haver adequada crioproteção. No entanto, foi com esta concentração que os embriões mais sensíveis (do dia 6 de cultivo) apresentaram maiores taxas de expansão e eclosão. Como o grupo Vitri 1 possuía 0,5M de SAC, seu potencial crioprotetor pode ser superior ao testado por Cuello et al. (2008), pois os autores utilizaram 15% de EG e DMSO, com 0,4M de concentração de SAC, tendo assim uma menor capacidade desidratante nas células.

Tabela 6. Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo utilizando os crioprotetores EG, DMSO e SAC.

Grupo	Embriões do dia 5 de cultivo			Embriões do dia 6 de cultivo		
	Blastocistos	Expandidos	Eclodidos	Blastocistos	Expandidos	Eclodidos
	N	n (%)	n (%)	N	n (%)	n (%)
Controle	74	74 (100,0) ^{aA}	45 (60,8) ^{aX}	58	49 (84,5) ^{aB}	23 (39,7) ^{aY}
Vitri 1	72	36 (50,0) ^{bc}	11 (15,3) ^b	56	28 (50,0) ^b	13 (23,2) ^a
Vitri 2	72	38 (52,8) ^{bA}	7 (9,7) ^b	58	18 (31,0) ^{cB}	5 (8,6) ^b
Vitri 3	73	26 (35,6) ^{cA}	4 (5,5) ^b	56	2 (3,6) ^{dB}	0 (0,0) ^c

^{a,b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P < 0,05$)

^{A,B} Letras diferentes indicam diferença na taxa de blastocistos expandidos na linha ($P < 0,05$)

^{X,Y} Letras diferentes indicam diferença na taxa de blastocistos eclodidos na linha ($P < 0,05$)

Vitri 1: Solução de vitrificação com 15% de EG, 15% de DMSO e 0,5M de SAC, reaquecimento com 1M de SAC por 1 min seguido de 3 min em 0,5M de SAC

Vitri 2: Solução de itrificação com 16% de EG, 16% de DMSO e 0,4M de SAC, reaquecimento com 0,13M de SAC por 5 min

Vitri 3: Solução de itrificação com 18% de EG, 18% de DMSO e 0,5M de SAC, reaquecimento com 1M de SAC por 1 min seguido de 3 min em 0,5M de SAC

A quantidade de células totais nos embriões eclodidos do grupo Vitri 1 ($94,0 \pm 17,0$) foi superior ao encontrado para os embriões do grupo Vitri 3 ($45,8 \pm 12,6$), quando o teste de toxicidade foi realizado no dia 5, porém, não houve diferença entre os demais grupos (Tabela 7). Estes resultados vão de encontro demonstrado por Cuello et al. (2008), quando utilizaram a associação de EG e SAC. Naquelas condições, utilizando-se 17% de crioprotetores intracelulares, houve uma redução na capacidade de proliferação celular em embriões produzidos *in vivo*, sendo comparável ao encontrado no grupo Vitri 3 (com 18% de cada crioprotetor intracelular) deste estudo. Já nos embriões eclodidos após a manipulação no dia 6, observou-se que aqueles do Controle e do grupo Vitri 1 apresentaram número de células totais semelhantes entre si, e superiores ao grupo Vitri 2 ($75,0 \pm 3,6$; $65,0 \pm 4,2$; e $33,0 \pm 6,2$, respectivamente). Estes resultados reforçam o fato de que menor concentração de EG e DMSO (15%), mesmo com maior tempo de exposição, é mais adequada, mesmo para embriões mais sensíveis, nesse caso, os obtidos no dia 6. Os embriões manipulados nos dias 5 e 6 que não eclodiram, mas que aparentavam estar viáveis pela avaliação morfológica realizada no dia 8, apresentaram semelhante número total de células, independente dos grupos.

Todos os grupos, inclusive o controle, obtiveram maior proporção de células expressando caspase-3 clivada, nos embriões não eclodidos, em relação aos seus correspondentes eclodidos (Tabela 7). Isso foi confirmado tanto nos embriões manipulados no

dia 5, quanto nos manipulados no dia 6. Um fato que reafirma a maior sensibilidade dos blastocistos e blastocistos expadidos obtidos no dia 6 de cultivo, foi que ao avaliar esses embriões que não eclodiram, houve maior porcentagem de caspase-3 clivada nos embriões manipulados no dia 6, em comparação ao grupo Controle, fato que não ocorreu para os embriões do dia 5 (Tabela 7). Já quando foram avaliados os embriões eclodidos, estes não apresentaram diferença na expressão de caspase-3 clivada para os diferentes grupos (manipulados ou não), no mesmo dia de manipulação, assim como entre os dias 5 e 6 para o mesmo grupo (Tabela 7). Isto evidencia que os embriões que apresentaram a capacidade de eclodir, apresentam semelhante viabilidade de suas células.

6.2.2 Experimento 3: O efeito de crioprotetores PVP, SAC e TRE como crioprotetores extracelulares

O uso de EG como único crioprotetor intracelular durante a vitrificação de embriões suínos tem sido relatado (Beebe et al., 2005; Cuello et al., 2008), geralmente em combinação com diferentes crioprotetores extracelulares, nos diferentes passos da vitrificação e/ou do reaquecimento. Dentre os crioprotetores extracelulares, se destacam o PVP (Beebe et al., 2005) e a SAC (Cuello et al., 2008), sempre utilizando SAC durante o reaquecimento. Ao avaliar o uso do PVP, da SAC e da TRE durante a vitrificação, constatou-se que, em nosso sistema, os grupos PVP e SAC proporcionaram as melhores taxas de expansão (68,7 e 65,9%) em comparação ao grupo TRE (43,8%), sendo todos inferiores ao grupo Controle (89,9%), quando os embriões eram do dia 5 de cultivo. Ainda, para embriões do dia 5, o grupo SAC teve eclosão (28,0%) semelhante ao grupo PVP (15,7%) e superior ao grupo TRE (12,5%), ao passo que a eclosão dos grupos PVP e TRE foram semelhantes entre si.

Já para os embriões do D6, o grupo TRE foi o único que teve taxa de expansão (58,6%) semelhante ao grupo Controle (73,2%); enquanto o grupo SAC teve expansão (42,6%) semelhante aos grupos TRE (58,6%) e PVP (39,3%). Ainda, a taxa de expansão do grupo PVP foi inferior ao grupo TRE. A eclosão dos embriões do D6 foi semelhante entre os grupos Controle (12,5%), SAC (5,6%) e TRE (5,2%) sendo, entretanto para o grupo PVP (1,8%), semelhante aos grupos SAC e TRE, e inferior ao Controle. Apesar da trealose ter sido considerada uma molécula promissora, em função das conhecidas propriedades de promover estabilização de membranas nas células em situações de estresse (Sampedro e Uribe, 2004), devido a interações específicas com os fosfolipídios de membrana (Hu et al., 2009), a taxa de

expansão que proporcionou foi apenas satisfatória, não chegando a ter um efeito positivo na eclosão dos embriões.

Tabela 7. Número de células totais (NCT) e porcentagem de células expressando caspase 3 clivada (C3C) em blastocistos e blastocistos expandidos suínos, expostos ao teste de toxicidade nos dias 5 (D5) e 6 (D6) de cultivo que eclodiram ou não até o dia 8 de cultivo

Grupo	Teste de toxicidade	Embriões não eclodidos		Embriões eclodidos	
		NCT ± EP	% C3C	NCT ± EP	% C3C
Controle		43,3 ± 8,1	21,5 ^X	75,3 ± 7,1 ^{ab}	7,4 ^Y
Vitri 1	D5	34,0 ± 9,8	22,5 ^X	94,0 ± 17,0 ^a	7,7 ^Y
Vitri 2		49,5 ± 12,2	21,0 ^{X*}	67,7 ± 12,2 ^{ab*}	10,3 ^Y
Vitri 3		36,0 ± 25,3	24,0 ^X	45,8 ± 12,6 ^b	9,7 ^Y
Controle		39,6 ± 8,4	20,2 ^{Xy}	75,0 ± 3,6 ^x	8,1 ^Y
Vitri 1	D6	35,0 ± 10,8	30,5 ^{Xx}	65,0 ± 4,2 ^x	10,1 ^Y
Vitri 2		39,8 ± 9,4	31,4 ^{Xx*}	33,0 ± 6,2 ^{y*}	6,1 ^Y
Vitri 3		34,8 ± 9,8	30,5 ^x	0,0	0,0

^{A,B} Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença para a quantidade de células totais ($P < 0,05$)

^{X,Y} Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença para a porcentagem de células expressando caspase 3 clivada ($P < 0,05$)

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença para embriões manipulados no dia 5 ($P < 0,05$)

^{x,y} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença para embriões manipulados no dia 6 ($P < 0,05$)

*Indica diferença na mesma coluna entre embriões dos dias 5 e 6 para o mesmo grupo ($P < 0,05$)

Conforme já observado no experimento anterior, as taxas de expansão e eclosão do grupo Controle, com embriões do dia 5 de cultivo, foram superiores às encontradas para embriões do dia 6 (Tabela 8), evidenciando mais uma vez a maior fragilidade dos embriões do mais tardios (dia 6).

Entretanto, o mesmo comportamento de redução nas taxas de expansão e eclosão observados nos embriões do dia 6 de cultivo, também foram observados nos grupos PVP e SAC com embriões do dia 5 (Tabela 8). Os resultados oriundos do nosso sistema mostraram-se contrários aos observados por Morató et al. (2014), onde blastocistos do dia 6 tiveram maior qualidade, com maior sobrevivência (avaliada em taxa de expansão) após o reaquecimento, quando comparados a blastocistos do dia 5.

6.2.3 Experimento 4: Viabilidade após vitrificação de embriões suínos, com diferentes combinações de crioprotetores intra e extracelulares

Devido a clara diferença de sensibilidade observada entre os blastocistos e blastocistos expandidos durante os experimentos anteriormente conduzidos, fica clara a necessidade da escolha de protocolos de vitrificação específicos para cada um dos dois dias (5 e 6 de cultivo). Desta forma, este experimento buscou testar 4 diferentes protocolos de vitrificação, especificamente para os embriões dos dias 5 e 6 de cultivo. Os resultados estão descritos respectivamente nas tabelas 6 e 7.

Para os embriões do dia 5, observou-se que, apesar de todos os grupos vitrificados terem expansão e eclosão inferior ao grupo Controle fresco, a expansão do protocolo 1 (Prot 1) (20,0%) foi superior aos demais grupos de vitrificação (4,3%, 4,3% e 4,4%, respectivamente para os grupos Prot 2, Prot 3 e Prot 4). Já as taxas de eclosão não diferiram entre os grupos vitrificados (Tabela 9).

Para os embriões do dia 6 de cultivo, tanto as taxas de expansão quanto de eclosão dos grupos vitrificados não diferiram entre si, sendo ambos estatisticamente inferiores ao grupo Controle fresco (Tabela 10).

Tabela 8. Viabilidade de embriões suínos partenotos expostos a teste de toxicidade nos dias 5 e 6 de cultivo, utilizando EG em combinação aos crioprotetores PVP, SAC e TRE

Grupo	D5			D6		
	Blastocistos N	Expandidos n (%)	Eclodidos n (%)	Blastocistos n (%)	Expandidos n (%)	Eclodidos n (%)
Controle	79	71 (89,9) ^{aA}	41 (51,9) ^{aX}	56	41 (73,2) ^{aB}	7 (12,5) ^{aZ}
PVP	83	57 (68,7) ^{bA}	13 (15,7) ^{bcX}	56	22 (39,3) ^{cB}	1 (1,8) ^{bZ}
SAC	82	54 (65,9) ^{bA}	23 (28,0) ^{bX}	54	23 (42,6) ^{bcB}	3 (5,6) ^{abZ}
TRE	80	35 (43,8) ^c	10 (12,5) ^c	58	34 (58,6) ^{ab}	3 (5,2) ^{ab}

^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

^{A, B} Letras maiúsculas diferentes representam diferença na mesma linha para as taxas de expansão ($P \leq 0,05$)

^{X, Z} Letras maiúsculas diferentes representam diferença na mesma linha para as taxas de eclosão ($P \leq 0,05$)

6.3 FASE 3: ESTRESSE CONTROLADO POR PRESSÃO NEGATIVA E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

6.3.1 Experimento 5: Desenvolvimento *in vitro* de oócitos suínos expostos ou não ao estresse induzido por três intensidades de pressão negativa e a criotolerância dos embriões produzidos

Tabela 9. Viabilidade de embriões suínos partenotos vitrificados no dia 5 de cultivo, utilizando 4 diferentes protocolos de combinações de crioprotetores

Grupo	D5			
	Blastocistos	Expandidos		Eclodidos
	N	n	(%)	n (%)
Controle	46	44	(95,7) ^a	19 (41,3) ^a
Prot 1	45	9	(20,0) ^b	1 (2,2) ^b
Prot 2	47	2	(4,3) ^c	0 (0,0) ^b
Prot 3	46	2	(4,3) ^c	0 (0,0) ^b
Prot 4	45	2	(4,4) ^c	0 (0,0) ^b

^{a, b, c} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

Prot 1 – Sol 1 = (7,5% EG + 7,5% DMSO – 5-15 min.) Sol 2 = (15% EG + 15% DMSO + 0,5M SAC – 1 min.- Reaquecimento = 0,13M SAC – 5 min.

Prot 2 – Sol 1 = (7,5% EG + 7,5% DMSO – 5-15 min.) Sol 2 = (15% EG + 15% DMSO + 0,5M SAC – 1 min.- Reaquecimento = 0,13M TRE – 5 min.

Prot 3 – Sol 1 (2M EG 5 min.) Sol 2 = (8M EG + 0,5M SAC 1 min.) – Reaq. 0,13M SAC 5 min.

Prot 4 – Sol 1 (2M EG 5 min.) Sol 2 = (8M EG + 0,5M SAC 1 min.) – Reaq. 0,13M TRE 5 min.

Tabela 10. Viabilidade de embriões suínos partenotos vitrificados no dia 6 de cultivo utilizando 4 diferentes protocolos de combinações de crioprotetores

Grupo	D6		
	Blastocistos	Expandidos	Eclodidos
	n (%)	n (%)	n (%)
Controle	60	52 (86,7) ^a	23 (38,3) ^a
Prot 1	62	7 (11,3) ^b	0 (0,0) ^b
Prot 2	58	2 (3,4) ^b	0 (0,0) ^b
Prot 3	60	8 (13,3) ^b	0 (0,0) ^b
Prot 4	60	5 (8,3) ^b	0 (0,0) ^b

^{a, b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

Prot 1 – Sol 1 = (7,5% EG + 7,5% DMSO – 5-15 min.) Sol 2 = (15% EG + 15% DMSO + 0,6M TRE – 1 min.- Reaquecimento = 0,13M SAC – 5 min.

Prot 2 – Sol 1 = (7,5% EG + 7,5% DMSO – 5-15 min.) Sol 2 = (15% EG + 15% DMSO + 0,6M TRE – 1 min.- Reaquecimento = 0,13M TREA – 5 min.

Prot 3 – Sol 1 (2M EG 5 min.) Sol 2 = (8M EG + 0,6M TRE 1 min.) – Reaq. 0,13M SAC 5 min.

Prot 4 – Sol 1 (2M EG 5 min.) Sol 2 = (8M EG + 0,6M TRE 1 min.) – Reaq. 0,13M TREA 5 min.

Já foram reportados estudos investigando o estresse controlado aplicado por pressão hidrostática positiva em oócitos suínos, onde houve um efeito positivo na produção de embriões clones, assim como na sua posterior criopreservação (Du et al., 2008). Nessa fase do nosso estudo, foi avaliado o efeito do estresse controlado, induzido por 3 diferentes intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar). A maior intensidade de pressão negativa aplicada aos oócitos imaturos (750 mBar) causou uma redução na clivagem embrionária em relação aos grupos Controle (sem estresse), 250 mBar e 500 mBar (Tabela 11). Já o grupo 250 mBar proporcionou incremento na produção embrionária em relação ao Controle (30,8% vs, 23,5%). O número de células totais dos embriões no dia 6 de cultivo foi inferior para o grupo 750 mBar ($33,7 \pm 12,9$) em relação ao grupo Controle ($76,8 \pm 13,6$), sendo ambos os valores semelhantes aos grupos 250 mBar ($60,1 \pm 10,9$) e 500 mBar ($60,2 \pm 11,3$).

Segundo Nakamura et al. (2017) o número médio de células de embriões fecundados *in vitro* e cultivados *in vivo*, no dia 6 (78,7) foi significativamente superior aos embriões cultivados *in vitro* (39,7 células). Os valores encontrados nos embriões cultivados *in vivo* são semelhantes aos encontrados em nossos embriões produzidos por ativação partenogênética, exceto para os embriões do grupo 750 mBar, que teve menor densidade celular, e próxima ao que foi encontrado por Nakamura et al. (2017), para embriões cultivados *in vitro*. Já a proporção de células na massa celular interna não diferiu entre os grupos, variando de 19,0% a 25,3% (Tabela 11), valores estes muito próximos ao encontrado por Langendijk et al. (2016), em embriões produzidos *in vivo*, que tiveram média de 22,8% de massa celular interna.

A produção embrionária do grupo 750 mBar foi inferior aos demais grupos, além das médias de densidade celular total dos embriões do dia 6 de cultivo, também terem sido menores. No entanto, o número médio de células dos blastocistos eclodidos até o dia 8 não diferiu dos demais grupos (Tabela 11). Já na avaliação de caspase-3 clivada, o grupo 250 mBar apresentou incidência de apoptose inferior aos demais grupos, que não variaram entre si (Tabela 11).

6.3.2 Experimento 6: Uso de estresse controlado por pressão negativa em oócitos imaturos na criotolerância de blastocistos suínos produzidos por partenogênese

Neste estudo foi avaliado se oócitos imaturos submetidos ao estresse controlado por pressão negativa podem produzir blastocistos mais criotolerantes. O estresse controlado por pressão negativa do grupo 250 mBar mostrou um efeito positivo quando comparado ao grupo Controle, na produção de embriões. Porém, não exerceu influência na qualidade dos embriões produzidos. Ainda, os blastocistos e blastocistos expandidos produzidos a partir do grupo 250 mBar foram vitrificados nos dias 5 e 6 de cultivo, sendo as avaliações realizadas dentro de cada dia. A expansão e a eclosão dos embriões do grupo 250 mBar vitrificados (250 Vitri) foram semelhantes ao grupo Controle submetido a vitrificação (Controle Vitri), tanto para os embriões do dia 5, quanto para os embriões do dia 6 (Tabela 12). Ambos os grupos vitrificados tiveram taxas de expansão e eclosão inferior aos seus contemporâneos frescos, para os dias 5 e 6 de cultivo (Tabela 12).

Tabela 11. Desenvolvimento *in vitro* de oócitos suínos expostos ou não (Controle) ao estresse por três intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar)

Grupos	Cultivo N	Clivagem n (%)	Blastocisto n (%)	Células nos blastocistos		Células nos blastocistos eclodidos	
				Média total	% de MCI	Média total	% C3C
Controle	281	237 (84,3) ^a	66 (23,5) ^b	76,8 ± 13,6 ^a	25,3 ± 3,4	92 ± 11,0	3,7 ^a
250mBar	325	276 (84,9) ^a	100 (30,8) ^a	60,1 ± 10,9 ^{ab}	23,2 ± 3,4	104 ± 10,4	1,1 ^b
500mBar	335	286 (85,4) ^a	99 (29,5) ^{ab}	60,2 ± 11,3 ^{ab}	24,0 ± 2,9	89,0 ± 12,1	3,5 ^a
750mBar	338	260 (76,9) ^b	99 (29,3) ^{ab}	33,7 ± 12,9 ^b	19,0 ± 3,6	103 ± 11,1	3,9 ^a

^{a, b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

Tabela 12. Criotolerância de embriões suínos produzidos por partenogênese a partir de oócitos expostos a estresse controlado por pressão negativa de 250 mBar

Grupos	Bl e Bx D5			Bl e Bx D6		
	n	Expandidos n (%)	Eclodidos n (%)	n	Expandidos n (%)	Eclodidos n (%)
Controle Fresco	28	26 (92,9) ^a	15 (53,6) ^a	27	26 (96,3) ^a	13 (48,1) ^a
Controle Vitri	28	8 (28,6) ^b	1 (3,6) ^b	28	7 (25,0) ^b	1 (3,6) ^b
250 mBar Fresco	30	30 (100,0) ^a	15 (50,0) ^a	25	24 (96,0) ^a	12 (48,0) ^a
250 mBar Vitri	30	14 (46,7) ^b	2 (6,7) ^b	26	9 (34,6) ^b	1 (3,8) ^b

^{a, b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

Embora a expansão do grupo 250 mBar tenha sido semelhante ao grupo Controle, a taxa de expansão de 46,6% é muito próxima ao encontrado por Cuello et al. (2013), após a delipidação de embriões produzidos por FIV (45%). Isto demonstra que a exposição de

oócitos imaturos ao estresse controlado por pressão negativa de 250 mBar promove um incremento na criotolerância embrionária, que se assemelha ao incremento já reportado por outras técnicas, como a delipidação.

6.3.3 Experimento 7: Progressão do desenvolvimento embrionário de blastocistos expostos ou não a três intensidades de pressão negativa, como forma de estresse controlado

Os efeitos do estresse controlado por pressão negativa em embriões suínos no estágio de blastocisto ainda não foi reportado. Em nosso estudo, os blastocistos e blastocistos expandidos obtidos no dia 5 de cultivo não mostraram diferença nas taxas de eclosão, entre os grupos de embriões submetidos ao estresse e o grupo Controle (Tabela 13). Entretanto, para os embriões obtidos no dia 6, o estresse induzido pelas intensidades de 250 mBar e 750 mBar resultou em uma redução nas taxas de eclosão, em comparação aos grupos Controle e pressão de 500 mBar.

Para os tratamentos 250 e 750 mBar, os embriões do dia 6 apresentaram uma redução nas taxas de eclosão, em comparação aos embriões do dia 5. Isto demonstra que o estresse provocado por 250 mBar não foi o suficiente para induzir nos embriões uma resposta positiva de estímulo ao desenvolvimento, assim como foi encontrado por exemplo, após a aplicação de 250 mBar em oócitos imaturos; bem como a pressão de 750 mBar pode ter sido excessiva aos embriões. Todavia, a pressão de 500 mBar pode ter estressado os embriões em uma intensidade muito próxima ao ideal, para que os mesmos conseguissem prosseguir o seu desenvolvimento, entretanto sem reduzir as taxas de eclosão.

Tabela 13. Eclosão no dia 8 de blastocistos e blastocistos expandidos, expostos ou não (Controle) ao estresse por três intensidades de pressão negativa (250, 500 e 750 mBar) nos dias 5 e 6 de cultivo

Grupos	Embriões BI e Bx do D5			Embriões BI e Bx do D6		
	N	Be no D8		n	Be no D8	
		N	%		n	%
Controle	117	67	57.3	66	29	43.9 ^a
250 mBar	105	55	52.4 ^A	66	17	25.8 ^{bB}
500 mBar	109	60	55.0	66	28	42.4 ^a
750 mBar	103	58	56.3 ^A	66	17	25.8 ^{bB}

^{A,B} na mesma linha indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

^{a,b} na mesma coluna indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Dos embriões eclodidos que atingiram o estágio de blastocisto no dia 5, houve uma maior expressão de caspase-3 clivada para os grupos 250 (3,2%) e 750 mBar (3,4%), quando comparados ao grupo Controle (1,4%). Sendo que o grupo Controle, ainda, apresentou um incremento na apoptose, baseado na proporção de células positivas para caspase-3 clivada, dos embriões eclodidos do dia 5 para os embriões do dia 6 (Tabela 14), o que vai de encontro aos resultados reportados por Morató et al. (2014), onde blastocistos em processo de eclosão e já eclodidos apresentaram maior porcentagem de células apoptóticas para embriões do dia 6, em comparação tanto a blastocistos frescos quanto seus correspondentes vitrificados no dia 5.

Já a presença de células com expressão de receptores para estrógeno do grupo 250 mBar (11,7%) foi inferior ao grupo 750 mBar (15,8%), que por sua vez foi também inferior aos grupos Controle (22,9%) e 500 mBar (25,7%), que são semelhantes entre si (Tabela 14). No entanto, a competência para implantação, baseada na presença de células com expressão de receptores de estrógeno dos grupos 250 e 750 mBar, aumentou para os embriões eclodidos no dia 6, tornando esta expressão semelhante aos demais grupos (Tabela 14). Estes resultados permitem inferir que o estresse provocado por pressões de 250 e 750 mBar foi prejudicial, tanto para embriões do dia 5, quanto para embriões do dia 6. Para os embriões do dia 5, houve um incremento da quantidade de células positivas para caspase-3 clivada e diminuição da quantidade de células positivas para receptores de estrógeno. Já para os embriões do dia 6 estas pressões foram prejudiciais por reduzir o número de embriões eclodidos.

Tabela 14. Número de células totais (NCT), porcentagem de células expressando caspase 3 clivada (% C3C) e porcentagem de células expressando receptor de estrógeno (RE₂) de blastocistos expandidos originários de embriões do dia 5, ou embriões do dia 6, submetidos à diferentes intensidades de pressão negativa

Grupos	Embriões Be D5-D8			Embriões Be D6-D8		
	NTC ± EP	% RE ₂	% C3C	NTC ± EP	% RE ₂	% C3C
Controle	114,8 ± 13,8	22,9 ^a	1,4 ^{bX}	130,8 ± 13,2	20,8	3,9 ^Y
250 mBar	127,2 ± 14,5	11,7 ^{cB}	3,2 ^a	96,1 ± 11,8	21,5 ^A	2,3
500 mBar	139,6 ± 14,6	25,7 ^a	2,1 ^{ab}	110,9 ± 11,4	23,1	2,9
750 mBar	116,5 ± 11,8	15,8 ^{bB}	3,4 ^a	116,4 ± 12,7	21,3 ^A	3,7

^{A,B} na mesma linha indicam diferença significativa para a % C3C ($P \leq 0,05$)

^{X,Y} na mesma linha indicam diferença significativa para a % RE₂ ($P \leq 0,05$)

^{a,b} na mesma coluna indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

6.3.4 Experimento 8: Efeito do estresse controlado por pressão negativa aplicado em embriões, na sobrevivência a vitrificação de blastocistos suínos produzidos por partenogênese

Para avaliar se o uso da pressão negativa de 500 mBar nos B1 e Bx obtidos em D5 e D6 poderia conferir maior viabilidade embrionária após a vitrificação, utilizou-se o protocolo de vitrificação descrito por Du et al. (2008) (grupo Vitri 1 do testado no experimento 2). Os resultados encontrados mostram que os embriões do dia 5, oriundos do grupo 500 mBar e vitrificados (500 mBar Vitri) apresentaram taxa de expansão semelhante ao Controle vitrificado (Controle Vitri), e eclosão inferior ao grupo Controle Vitri (Tabela 15). Sendo que para os embriões do dia 6, não houve diferença nas taxas de expansão e eclosão entre os grupos Controle Vitri e 500 mBar Vitri. Para os embriões dos dias 5 e 6, os grupos não vitrificados (Frescos) apresentaram taxas de expansão e eclosão superiores aos correspondentes grupos vitrificados.

6.3.5 Experimento 9: Estresse controlado por pressão negativa sequencial: efeito da pressão de 250 mBar em oócitos imaturos seguido de 500 mBar de pressão em embriões, na sobrevivência dos blastocistos partenotos suínos à vitrificação

O estresse controlado já se mostrou positivo para oócitos imaturos, refletindo em maior produção e melhor viabilidade embrionária (Du et al., 2008), dados esses que corroboram os resultados do experimento 5. Como o estresse controlado aplicado nos embriões, não apresentou benefício ao desenvolvimento embrionário, neste experimento, buscou-se avaliar a adição da pressão negativa de 250 mBar nos oócitos somada a pressão negativa de 500 mBar nos embriões em estágio de blastocisto. Este procedimento melhorou a expansão dos embriões vitrificados no dia 5, em comparação ao grupo controle vitrificado (Controle vitri) (60,0 vs. 29,6%) (Tabela 16). No entanto, a eclosão dos embriões do dia 5 não apresentou diferença entre os grupos vitrificados. Para os embriões do dia 6, no entanto, não houve diferença nas taxas de expansão e de eclosão dos grupos vitrificados, que foram inferiores aos grupos frescos.

Tabela 15. Eclosão de embriões suínos partenotos oriundos do dia 5 ou 6 de cultivo, vitrificados após aplicação ou não de pressão negativa

Grupos	Bl e Bx D5			Bl e Bx D6		
	n embriões	Expandidos* n (%)	Eclodidos** n (%)	n embriões	Expandidos* n (%)	Eclodidos** n (%)
Controle Fresco	57	57 (100,0) ^{Aa}	39 (68,4) ^a	60	54 (90,0) ^{Ba}	34 (56,7) ^a
Controle Vitri	58	13 (22,4) ^c	4 (6,9) ^b	60	9 (15,0) ^c	1 (1,7) ^b
500 mBar Fresco	57	52 (91,2) ^{Ab}	40 (70,2) ^{Xa}	62	34 (54,8) ^{Bb}	25 (40,3) ^{Ya}
500 mBar Vitri	57	6 (10,5) ^c	0 (0,0) ^c	63	12 (19,0) ^c	2 (3,2) ^b

^{a, b, c} Letras minúsculas na mesma coluna representam diferença ($P \leq 0,05$)

^{A, B} Letras maiúsculas na mesma linha representam diferença ($P \leq 0,05$)

^{X, Y} Letras maiúsculas na mesma linha representam diferença ($P \leq 0,05$)

*Expansão avaliada 24h após reaquecimento dos embriões

**Eclosão avaliada até o dia 8 de cultivo dos embriões

Tabela 16. Eclosão de embriões suínos partenotos oriundos do dia 5 ou 6 de cultivo, vitrificados após aplicação de estresse controlado nos oócitos imaturos, somado ao estresse aplicado aos embriões

Grupos	Bl e Bx D5			Bl e Bx D6		
	n embriões	Expandidos* n (%)	Eclodidos** n (%)	n embriões	Expandidos* n (%)	Eclodidos** n (%)
Controle Fresco	28	26 (92,9) ^a	14 (50,0) ^a	27	25 (92,6) ^a	14 (51,9) ^a
Controle Vitri	27	8 (29,6) ^c	1 (3,7) ^b	27	7 (25,9) ^b	1 (3,7) ^b
250+500 mBar Fresco	30	29 (96,7) ^a	16 (53,3) ^a	28	25 (89,3) ^a	13 (46,4) ^a
250+500 mBar Vitri	30	18 (60,0) ^b	1 (3,3) ^b	28	12 (42,9) ^b	1 (3,6) ^b

^{a, b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

6.4 FASE 4: O USO DE NITROGÊNIO REFRIGERADO NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES SUÍNOS PRODUZIDOS POR ATIVAÇÃO PARTENOGENÉTICA

6.4.1 Experimento 10: O uso de slush no nitrogênio durante a vitrificação de embriões suínos

O nitrogênio super-resfriado tem se mostrado uma alternativa para aumentar a viabilidade da criopreservação de estruturas muito sensíveis, como oócitos bovinos. No entanto, seus resultados são controversos quando do uso em embriões bovinos e suínos. Mesmo assim, devido ao fato dos embriões suínos terem grande quantidade de lipídios, o slush ainda se mostra uma boa alternativa para aumentar a velocidade de resfriamento da

vitricificação e proporcionar maior viabilidade aos embriões criopreservados. Segundo Cuello et al. (2008) uma das características da vitricificação é de que quanto mais aumenta a velocidade de resfriamento, a concentração de crioprotetor pode ser reduzida. Assim, isto pode ser potencializado com o uso do slush.

Neste experimento, avaliando a eficiência do *slush* durante a vitricificação de embriões nos dias 5 e 6 de cultivo não se observou diferença na expansão e eclosão dos embriões de ambos os dias (Tabela 17). Beebe et al. (2005) tiveram melhora na sobrevivência dos embriões suínos produzidos *in vivo* após o uso do slush, ao contrário de Cuello et al. (2004) que não observaram efeito do uso do *slush*. Em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avaliou o uso da vitricificação de embriões suínos produzidos *in vitro* com o uso de nitrogênio super-resfriado “*slush*”.

Tabela 17. Viabilidade de embriões suínos partenotos vitricificados no dia 5 e 6 de cultivo utilizando ou não o nitrogênio super-resfriado (*slush*)

Grupo	D5			D6		
	Blastocistos	Expandidos	Eclodidos	Blastocistos	Expandidos	Eclodidos
	N	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Controle Fresco	47	46 (97,9) ^a	32 (68,1) ^{Aa}	52	48 (92,3) ^a	22 (42,3) ^{Ba}
Vitri Controle	46	11 (23,9) ^b	0 (0,0) ^b	52	11 (21,2) ^b	1 (1,9) ^b
Vitri Slush	46	15 (32,6) ^b	1 (2,2) ^b	51	15 (29,4) ^b	0 (0,0) ^b

^{a, b} Letras minúsculas diferentes representam diferença na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

^{A, B} Letras maiúsculas diferentes representam diferença na mesma linha ($P \leq 0,05$)

7 CONCLUSÕES

Uma redução moderada no gradiente de percoll utilizado para a seleção espermática exerceu influência positiva na produção e na qualidade embrionária;

Embriões do dia 5 de cultivo são mais resistentes a toxicidade dos crioprotetores do que embriões do dia 6, porém com ajustes na concentração do crioprotetor intracelular, é possível obter índices semelhantes de expansão e eclosão;

O aumento na concentração de crioprotetor intracelular reduziu significativamente o número total de células, tanto para embriões do dia 5, quanto para os do dia 6;

Os protetores extracelulares PVP e SAC proporcionam os melhores resultados para embriões do dia 5, ao passo que a SAC e TRE proporcionam os melhores resultados para embriões do dia 6;

A vitrificação de embriões suínos reduz significativamente a expansão e a eclosão embrionária, sendo o protocolo mais promissor a base de SAC, EG e DMSO, para embriões do dia 5; A vitrificação também é mais prejudicial para embriões do dia 6, confirmando os dados obtidos previamente nos testes de toxicidade;

O estresse controlado pela pressão negativa de 250 mBar nos oócitos incrementa a produção embrionária e reduz o índice de mortalidade celular por apoptose, não afetando, contudo, a criotolerância dos embriões oriundos dos oócitos tratados por nenhuma das intensidades de pressão testadas;

O estresse controlado por pressão negativa, quando aplicado aos embriões em estágio de blastocisto, não interfere nas taxas de eclosão, e inclusive a pressão de 500 mBar piora a criotolerância;

A aplicação de pressão negativa sequencial em oócitos e embriões, melhora a expansão embrionária quando se tratam de embriões do dia 5 de cultivo;

O aumento da velocidade de resfriamento através do slush não afeta os índices de eficiência pós-criopreservação.

Em suma, embriões do dia 5 de cultivo possuem maior viabilidade que embriões do dia 6, sendo que a forma de seleção dos espermatozoides influencia na qualidade embrionária. Ainda, os crioprotetores e as suas concentrações exercem toxicidade diferentes aos embriões, sendo possível aumentar a viabilidade de embriões vitrificados através do uso de estresse controlado por pressão negativa.

REFERÊNCIAS

BARTOLAC, L.K. et al. A comparison of different vitrification devices and the effect of blastocoele collapse on the cryosurvival of in vitro produced porcine embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, [Tokyo], v. 61, p. 525-531, set. 2015.

BAZER, F.W., JOHNSON, G.A. Pig blastocyst–uterine interactions. **Differentiation**, [Berlin], v. 87, p. 52-65, jan. 2014.

BEEBE, L.F.S. et al. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 57, p. 2155–65, jun. 2002.

BEEBE, L.F.S. et al. Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improved litter size after transfer. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 64, p. 879-890, set. 2005.

BERTHELOT, F. et al. Piglets Born after Vitrification of Embryos Using the Open Pulled Straw Method. **Cryobiology**, [San Diego], v. 41, p. 116-124, set. 2000.

BERTHELOT, F. et al. Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 68, p. 178–185, jun. 2007.

BROGNI, C.F. et al. Pré-incubação dos espermatozoides suínos diminui polispermia e aumenta a produção embrionária em oócitos de baixa qualidade. **Ciencia Rural**, [Santa Maria], v. 46, n. 6, jun. 2016

CAMERON, R.D.A. et al. Piglets born from vitrified early blastocysts using a simple technique, **Aust. Vet. J.**, [Brunswick], v. 78, p. 195–196, mar. 2000.

CUELLO, C. et al. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 62, p. 1144–1152, set. 2004.

CUELLO, C. et al. Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS vitrified porcine blastocysts. **Cryobiology**, [San Diego], v. 56, p. 189–194, fev. 2008.

CUELLO, C. et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. **Animal Reproduction Science**, [Amsterdam] v. 136, p. 296-302, jan. 2013.

DOBRINSKY, J. R. Cryopreservation of pig embryos. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, [Oxford], v. 52, p. 301–312, 1997.

DOBRINSKY, J.R. et al. Birth of normal piglets after cytoskeletal stabilization of embryos and cryopreservation by vitrification. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 49, p. 166, mar. 1998.

DU, Y. et al. Simplified cryopreservation of porcine cloned blastocysts. **Cryobiology**, [San Diego], v. 54, p. 181–187, abr. 2007.

DU, Y. et al. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. **Cloning and Stem Cells**, [S.I.] v. 10, p. 325-330, set. 2008.

ELLIOTT, G.D., WANG, S., FULLER, B.J. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, [San Diego], v. 76, p. 74-91, abr. 2017.

ESAKI, R. et al. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. **Biol Reprod**, [Champaign], v. 71, p. 432–437, ago. 2004.

GIL, M.A. et al. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 60, p. 767–76, set. 2003.

GIL, M. et al. Advances in Swine In Vitro Embryo Production Technologies. **Reproduction in Domestic Animals**, [Berlin], v. 45, p. 40-48, mai. 2010.

GIL, M.A. et al. The in vitro and in vivo developmental capacity of selected porcine monospermic zygotes. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 79, p. 392-398, nov. 2013.

HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. A preliminary report. **West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin**, [Virginia], v. 58, p. 15-35, jun. 1899.

JIAN-HONG, H. et al. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. **Animal Reproduction Science**, [Amsterdam], v. 112, p. 107–118, mai. 2009.

JEONG, B.S., YANG, X. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Mol Reprod Dev**, [New York], v. 59, p. 330–335, jul 2001.

KAROW, Jr.M., Cryoprotectants-a new class of drugs, **J. Pharm. Pharmacol.**, [S.l.], v. 21, p. 209-223, abr 1969.

KAWARASAKI, T. et al. Co-transfer of parthenogenotes and single porcine embryos leads to full-term development of the embryos. **Animal Reproduction Science**, [Amsterdam], v. 112, p. 8-21, abr 2009.

KIKUCHI, K. et al. Developmental competence, after transfer to recipients, of porcine oocytes matured, fertilized, and culture in vitro. **Biology of Reproduction**, [Champaign], v. 60, p. 336–340, fev 1999.

KIM, H.-S. et al. Improved in vitro development of porcine embryos with different energy substrates and serum. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 61, p. 1381-1393, mai 2004.

KOUTSOTHEODOROS, F. et al. The effects of post-weaning progestagen treatment (Regumate) of early-weaned primiparous sows on subsequent reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, [Amsterdam], v. 52, p. 71–79, jun 1998.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, **Reprod. Biomed. Online**, [S.l.], v. 11, p. 300–308, set 2005.

LANGENDIJK, P. et al. Energy balance influences number of ovulations rather than embryo quality in the pig. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 86, p. 1008–1013, set 2016.

LI, R. et al. Development and quality of porcine parthenogenetically activated embryos after removal of zona pellucida. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 80, p. 58-64, abr 2013.

LIN, L. et al. Osmotic stress induced by sodium chloride, sucrose or trehalose improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, [Melbourne], v. 21, p. 338–344, set 2009.

MARTINEZ, E.A. et al. Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. **PLoS One**, [S.l.], 9:e104696, ago 2014.

MARTINEZ, E.A. et al. Recent advances toward the practical application of embryo transfer in pigs. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 85, p. 152-161, jan 2016.

MARTINEZ, E.A. et al. Nonsurgical deep uterine transfer of vitrified, in vivo-derived, porcine embryos is as effective as the default surgical approach. **Scientific Reports**, [London], v. 5, 10587, jun 2015.

MATAS, C. et al. Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs. **Reproduction**, [Cambridge], v. 125, p. 133-41, jan 2003.

MATAS, C. et al. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. **Anim Reprod Science**, [Amsterdam], v. 127, p. 62-72, agos 2011.

MEN, H. et al. Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 64, p. 1340-1349, out 2005.

MEN, H. et al. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 66, p. 2008-2016, nov 2006.

MEZZALIRA, J.C. et al. Effect of Nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, [Melbourne], v. 22, n. 1, p. 210, dez 2010.

MEZZALIRA, J.C. Estresse controlado e moduladores de cromatina para otimizar a criotolerância e o desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Tese**. [Lages], Universidade do Estado de Santa Catarina, abr 2018.

MITO, T. et al. Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. **Theriogenology**, [Stoneham], nov 2015.

MORATÓ, R. et al. Cryotolerance of porcine in vitro-produced blastocysts relies on blastocyst stage and length of in vitro culture prior to vitrification. **Reprod Fertil Dev**, [Melbourne], v. 28, n. 7, p. 886-892, jun 2014.

NAGASHIMA, H. et al. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biol Reprod**, [Champaign], v. 51, p. 618-622, out 1994.

NAKAZAWA, Y. et al. Effect of volume of non-surgical transfer medium on ability of porcine embryos to survive to term. **Journal of Reproduction and Development**, [Tokyo], v. 54, 1, p. 30-34, fev 2008.

NAKAMURA, Y., TAJIMA, S., KIKUCHI, K. The quality after culture in vitro or in vivo of porcine oocytes matured and fertilized in vitro and their ability to develop to term. **Animal Science Journal**, [Tokyo], v. 88, p. 1916–1924, dez 2017.

NIEMANN, H., ELSAESSER, F. Evidence for estrogen-dependent blastocyst formation in the pig. **Biol Reprod**, [Champaign], v. 35, p. 10–16, ago 1986.

NOGUCHI, M. et al. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. **Zygote**, [London], v. 23, n. 1, p. 68-75, fev 2015.

NOHALEZ, A. et al. Factors of importance when selecting sows as embryo donors. **Animal**, [S.I.], v. 11, n. 8, p. 1330–1335, ago 2017.

PERRY, J. S. et al. Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. **J. Reprod. Fert., Suppl.**, [Oxford], v. 25, p. 85, out 1976.

POLGE C, ROWSON L, CHANG M. The effect of reducing the number of embryos during early stage of gestation on the maintenance of pregnancy in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, [Cambridge], v. 12, p. 395–397, out 1966.

POLGE, C., WILLADSEN, S.M. Freezing eggs and embryos of farm animals. **Cryobiology**, [San Diego], v. 15, p. 370–373, jun 1978.

POLLARD, J. W., LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 41, p. 101–106, jan 1994.

RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, [London], v. 313, p. 573–575, fev 1985.

ROMAR, R., FUNAHASHI, H., COY, P. In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 85, p. 125-134, jan 2016.

SANCHEZ-OSORIO, J. et al. Factors affecting the success rate of porcine embryo vitrification by the Open Pulled Straw method. **Anim Reprod Science**, [Amsterdam], v. 108, p. 334–344, nov 2008.

SÁNCHEZ-OSORIO, J. et al. Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. **Theriogenology**, [Stoneham], v. 73, p. 300–308, fev 2010.

SANTOS, R.M. et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, [Santa Maria], v. 132, p. 839-848, set 2006.

SAMPEDRO, J.G., URIBE, S. Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity, **Mol. Cell. Biochem.**, [S.l.], v. 256, p. 319–327, jan-fev 2004.

USHIJIMA, H. et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, [Tokyo], v. 50, p. 481–486, ago 2004.

WEMEMKAMP-KAMPHUIS, H.H. et al. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, [Washington], v. 68, n. 2, p. 456-463, fev 2002.

WERLICH, D.E. et al. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, [Porto Alegre], v. 34, n. 1, p. 77-82, mar 2006.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, [San Diego], v. 60, p. 11-22, fev 2010.

YING, C., Hsu, W.-L., Hong, W.-F., Cheng, W.T.K., Yang, Y.C. Estrogen receptor is expressed in pig embryos during preimplantation development. **Molecular Reproduction and Development**, [New York], v. 55, p. 83-88, jan 2000.

YOSHIOKA, K. et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. **Biol. Reprod**, [Champaign], v. 66, p. 112–119, jan 2002.

ZHMAKIN, A.I. Fundamentals of cryobiology: Physical phenomena and mathematical models. **Springer**, [Berlin], dez 2009.