

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE OÓCITOS
IMATUROS DE *Bos taurus taurus* E EMBRIÕES DE *Mus musculus domesticus* NA
EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES**

Autor: Bruno Silveira Becker

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE OÓCITOS
IMATUROS DE *Bos taurus taurus* E EMBRIÕES DE *Mus musculus domesticus* NA
EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES**

Autor: Bruno Silveira Becker

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção
do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de
Biotécnicas da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE

2020

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

CIP - Catalogação na Publicação

Becker, Bruno Silveira
DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE
OÓCITOS IMATÚROS DE *Bos taurus taurus* E EMBRIÕES DE
Mus musculus domesticus NA EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *in*
vitro DE EMBRIÕES / Bruno Silveira Becker. -- 2020.
172 f.
Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. alta pressão gasosa. 2. HGP. 3. gameta. 4.
embrião. 5. estresse subletal. I. Rodrigues, José Luiz
Rigo, orient. II. Título.

Bruno Silveira Becker

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE OÓCITOS
IMATUROS DE *Bos taurus taurus* E EMBRIÕES DE *Mus musculus domesticus* NA
EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

Aprovado em:

APROVADO POR:

Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Membro da Comissão

Prof^ª. Dra. Adriana Bos-Mikish

Membro da Comissão

Prof. Dr. Mauricio Barbosa Salviano

Membro da Comissão

Dedico este trabalho à minha família, que sempre soube entender meus momentos de ausência, ao meu Irmão, ao meu Pai e, de modo especial, à minha Mãe, que onde quer que ela esteja, sempre me conduziu certo nos caminhos tortuosos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador de mestrado e de doutorado, o Prof. Dr. José Luiz Rodrigues, pela parceria desde junho de 2012 com o convite para que me juntasse a equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução e pelo apoio recebido em todos os momentos tensos pelos quais seus ensinamentos e conversas foram muito valiosos. Também agradeço pelos conselhos e visões de mundo distribuídos ao longo de todos esses oito anos, ensinando-me que o resultado na pesquisa científica e na ciência é mérito daqueles que, simplesmente, praticam diariamente suas técnicas e teorias, sem contar os grandes ensinamentos sobre enologia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, por todas as oportunidades e parcerias que, dentro de todas as dificuldades e limitações que o serviço público impõe, foram construídas ao longo destes anos, bem como pelas rodas de chimarrão e café regadas por muitas conversas e conselhos entre amigos.

À toda equipe do Laboratório, em especial, ao Sr. João Roberto, colega de funcionalismo amigo, bem como ao meu amigo e colega de doutorado, Favorino Collares, amizade que se iniciou com no laboratório e certamente levarei para a vida extra acadêmica.

Aos colegas da secretaria do PPGCV, Zico e Alice, por todo auxílio necessário, pela amizade e pelas ótimas conversas sobre a vida cotidiana, não esquecendo dos litros de café compartilhados.

Aos meus amigos que, embora muitas vezes distantes, sempre estiveram prontos para estender a mão. Obrigado pelo companheirismo e bons momentos.

A toda minha família pelas inúmeras formas de suporte. Ao meu irmão Lucas por todos os momentos de gargalhadas que suas histórias propiciaram. Ao meu Pai, por todo apoio dado nas horas necessárias, e à minha Mãe, que embora tenha partido exatamente na semana em que este ciclo acadêmico na FAVET começou, sabia que havia me encaminhado na direção de nunca se cansar da busca pelo conhecimento.

E, aos demais que de alguma forma contribuíram para minha chegada a esta etapa, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A alta pressão gasosa (HGP, do inglês *high gaseous pressure*) tem sido descrita como um agente estressante capaz de induzir respostas ao estresse subletal, fornecendo proteção celular e estímulos positivos a desafios subsequentes, como a criopreservação, produção *in vitro* de embriões (PIVE), entre outras biotécnicas da reprodução, embora os mecanismos celulares, a modulação epigenética e as modificações no padrão de expressão gênica envolvidos ainda não estejam totalmente elucidados. Este princípio foi investigado em gametas bovinos e embriões murinos no presente trabalho. Foram realizados dois experimentos independentes. No primeiro, avaliou-se o efeito da exposição de oócitos bovinos no estágio de vesículas germinativa à HGP na eficiência e cinética de desenvolvimento da PIVE por fecundação *in vitro* (FIV). Os resultados revelaram que oócitos expostos a HGP em temperatura ambiente apresentaram taxa de maturação *in vitro* (MIV) e cinética de desenvolvimento até o estágio de blastocisto semelhantes ao controle mantido em condições ideais durante o tratamento do grupo experimental, diferentemente do observado no grupo com CCOs mantidos em temperatura ambiente durante a exposição à HGP. Em um segundo experimento, observou-se as alterações no padrão de expressão gênica de blastocistos murinos expostos previamente à alta pressão gasosa no estágio de embrião de 8-células, bem como se este desafio alterava a taxa de sobrevivência destes blastocistos após serem submetidos ao processo de criopreservação. A análise do padrão de transcrição revelou que um gene associado ao estresse oxidativo (*Sod2*) teve sua expressão aumentada, enquanto genes de proliferação e desenvolvimento (*Igf2* e *Igf2R*) tiveram sua expressão reduzida, quando comparados com os embriões no estágio de 8-células, embora a relação *Igf2/Igf2R* não demonstrou ser afetada. O tratamento por HGP mostrou-se eficiente no aumento da taxa de sobrevivência de blastocistos após a criopreservação. Os experimentos permitiram concluir que a resposta ao estresse subletal estimulada pela HGP é eficiente na melhora da performance de gametas femininos e embriões submetidos a novas situações estressantes.

Palavras-Chave: Alta pressão gasosa, HGP, gameta, embrião, estresse subletal

ABSTRACT

High gaseous pressure (HGP) has been described as stressor, providing cell protection and positive stimuli to subsequent challenges like cryopreservation, embryo in vitro production (IVP), among other reproduction biotechnologies, although cells mechanisms, epigenetic modulation and transcriptional modifications are not totally elucidated. This principle was investigated in bovine gametes and murine embryos in this report at two independent studies. First, the effect of bovine oocyte exposure to HGP in germinal vesicle stage was evaluated to efficiency and development kinect of IVP by in vitro fertilization (IVF). Results showed that oocytes exposed to HGP at room temperature had in vitro maturation (IVM) rate and developmental kinect to reach the blastocyst stage similar to control group kept in ideal conditions during experimental group treatment, differently that what was observed in the group with COCs just kept at room temperature during HGP exposure. In the second experiment, modifications in transcriptional response were observed in murine blastocysts previously exposed to HGP when embryo 8-cells stage, as well if this challenge modified survival rate of this blastocysts after cryopreservation procedures. The analysis of the transcriptional pattern revealed that a gene associated to oxidative stress (*Sod2*) was upregulated, while genes of proliferation and development (*Igf2* and *Igf2R*) were downregulated, when compared with 8-cells embryos, even though the ratio *Igf2/Igf2R* appeared not be affected. HGP treatment showed to be efficient to improve blastocyst survival rate to cryopreservation. The experiments enable inferring that sublethal response stimulated by HGP was efficient to enhance performance of female gametes and embryos exposed to new stressor situations

Palavras-Chave: High gaseous pressure, HGP, gamete, embryo, sublethal stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 5

- Figure 1 Relative transcription (LSM+SEM) of 8-cells group (relative transcription = 1) and blastocysts groups (P1, P2, CE and CB) for *Slc2a1*, *Slc2a3*, *Bax*, *Aqp3* and *Sod2* genes.....148
- Figure 2 Relative transcription (LSM+SEM) of 8-cells group (relative transcription = 1) and blastocysts groups (P1, P2, CE and CB) for **(a)** Insulin-like growth factor 2, *Igf2*, **(b)** Insulin-like growth factor 2 receptor, *Igf2r*.....149
- Figure 3 Relative transcription (LSM+SEM) of blastocysts experimental groups (P1, P2, CB) compared to CE blastocyst group (relative transcription = 1) for *Slc2a1*, *Slc2a3*, *Bax*, *Aqp3* and *Sod2* genes.....150
- Figure 4 **(a)** Relative transcription (LSM+SEM) of blastocysts experimental groups (P1, P2, CB) compared to CE blastocyst group (relative transcription = 1) for insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) and insulin-like growth factor 2 receptor (*Igf2r*)....151

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO 4**

Table 1	IVM Rates.....	117
Table 2	Developmental kinect of COCs from experimental groups at Day 2 (48 after IVF).....	118
Table 3	Blastocyst rates among experimental and control groups after IVP of COCs...	118

CAPÍTULO 5

Table 1	Eight-cell embryo development capacity to reach blastocyst stage and blastocysts survival after cryopreservation.....	146
Table 2	Primers for RT-qPCR.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
μL	Microlitro
μM	Concentração micromolar
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico (<i>Adenosine monophosphate cyclic</i>)
ANOVA	Análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
AQP	Aquaporina
<i>Aqp11</i>	Gene da proteína aquaporina 11 (<i>Aquaporin 11 protein gene</i>)
<i>Aqp3</i>	Gene da proteína aquaporina 3 (<i>Aquaporin 3 protein gene</i>)
atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
<i>Bax</i>	Gene do regulador apoptótico BAX (<i>Apoptosis regulator BAX gene</i>)
BAX	proteína reguladora apoptótica BAX (<i>Apoptosis regulator BAX protein</i>)
<i>Bcl2</i>	Gene da proteína de linfoma de células B tipo 2 (<i>B-cell lymphoma protein 2 gene</i>)
BCL2	Proteína de linfoma de células B tipo 2 (<i>B-cell lymphoma protein 2 gene</i>)
BSA	Albumina bovina sérica (<i>Bovine serum albumine</i>)
BCB	Azul de cresil brilhante (<i>Brilliant cresyl blue</i>)

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<i>Casp7</i>	gene da enzima caspase 7 (<i>Caspase 7 enzyme gene</i>)
CCOs	Complexo <i>cumulus-oophuros</i>
CIV	Maturação <i>in vitro</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de carbono gasoso
COCs	Complexo <i>cumulus-oophuros</i> (<i>Cumulus-oophuros complex</i>)
CPA	Agentes crioprotetores (<i>Cryoprotectants agents</i>)
CSP	Proteínas de choque frio (<i>Cold shock proteins</i>)
<i>Dido1</i>	Gene do indutor-obliterador de morte 1 (<i>Death inducer-obliterator 1 gene</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
G6PDH	Enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme</i>)
eCG	Gonadotrofina coriônica equina (<i>Equine chorionic gonadotropin</i>)
EG	Étileoglicol
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
<i>et al.</i>	E colaboradores
FAVET	Faculdade de Medicina Veterinária
FCS	Soro fetal bovino (<i>Fetal calf serum</i>)
FIV	Maturação <i>in vitro</i>

FSH	Hormônio folículo estimulante (<i>Follicle stimulating hormone</i>)
g	Gramas
<i>Gadd45</i>	Gene da proteína de controle de crescimento e danos do DNA 45 (<i>Growth arrest and DNA damage 45 protein gene</i>)
h	Hora
hCG	Gonadotrofina coriônica humana (<i>Human chorionic gonadotropin</i>)
HGP	Alta pressão gasosa (<i>High gaseous pressure</i>)
HHP	Alta pressão hidrostática (<i>High hydrostatic pressure</i>)
HSP	Proteínas de choque térmico (<i>Heat shock proteins</i>)
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kda (<i>Heat shock protein 70 kda</i>)
<i>Hsp70</i>	Gene da proteína de choque térmico de 70 kda (<i>Heat shock protein 70 kda gene</i>)
<i>Hspb8</i>	Gene da proteína de choque térmico pequena beta-8 (<i>Small heat shock protein beta-8 gene</i>)
<i>Hsph1</i>	Gene da proteína de choque térmico humana de 105 kda (<i>Human heat shock protein 105 kda gene</i>)
HSR	Resposta ao choque térmico (<i>Heat shock response</i>)
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embrião (<i>International Embryo Technology Society</i>)
<i>Igf1</i>	Gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>Insuline-like growth factor 1 gene</i>)
IGF1	Proteína do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>Insuline-like growth factor 1 protein</i>)

<i>Igf2</i>	Gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (<i>Insuline-like growth factor 2 gene</i>)
IGF2	Proteína do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (<i>Insuline-like growth factor 2 protein</i>)
<i>Igf2r</i>	Gene do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (<i>Insuline-like growth factor 2 receptor gene</i>)
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IVC	Cultivo <i>in vitro</i> (<i>in vitro culture</i>)
IVD	Produzido <i>in vivo</i> (<i>In vivo derived</i>)
IVF	Fecundação <i>in vitro</i> (<i>in vitro fertilization</i>)
IVM	Maturação <i>in vitro</i> (<i>in vitro maturation</i>)
IVP	Produção <i>in vitro</i> (<i>in vitro production</i>)
kDa	Quilo Dalton
kgf/cm ²	Quilograma-força por centímetro quadrado
LH	Hormônio luteinizante (<i>Luteinizing hormone</i>)
M	Concentração molar
MA	Massachusetts
MII	Metáfase II
min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mKSOM	Meio simplex otimizado modificado suplementado de potássio (<i>Modified potassium-supplemented simplex optimised media</i>)

mL	Mililitro
mM	Concentração milimolar
MO	Misouri
MPa	Megapascal
mPBS	Tampão fosfato salino modificado (<i>Modified phosphate buffered saline</i>)
mSOFaaci	Fluido sintético de oviduto modificado com aminoácidos, citrato de sódio e mioinositol (<i>Modified synthetic oviduct fluid added aminoacids, sodium citrate and myo-inositol</i>),
N ₂	Nitrogênio gasoso
NC	Carolina do Norte (<i>North Caroline</i>)
<i>Net1</i>	Gene da proteína neuroepitelial celular transformadora tipo 1 (<i>Neuroepithelial Cell Transforming 1 gene</i>)
O ₂	Oxigênio gasoso
°C	Graus Celsius
OPU	Aspiração folicular ovariana (<i>Ovum pick-up</i>)
p	p valor
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (<i>Penicilamine, hypotaurine and epinefrine solution</i>)
PIV	Produzido <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PSI	Libra por polegada quadrada (<i>Pounds per square inch</i>)

PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
RT	Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
RT-qPCR	Reação quantitativa em cadeia da polimerase transcriptase reversa (<i>Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>)
s	Segundo
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embrião
SiRNA	Ácido ribonucleico interferente pequeno (<i>Small interfering ribonucleic acid</i>)
<i>Slc2a1</i>	Gene do transportador de glicose 1 (<i>Solute carrier family 2 member 1</i>)
<i>Slc2a3</i>	Gene do transportador de glicose 3 (<i>Solute carrier family 2 member 3</i>)
<i>Sod1</i>	Gene da enzima cobre zinco superóxido dismutase 1 (<i>Superoxide dismutase 1 gene</i>)
SOD1	Enzima cobre zinco superóxido dismutase 1 (<i>Superoxide dismutase 1 enzyme</i>)
<i>Sod2</i>	Gene da enzima cobre zinco superóxido dismutase 2 (<i>Superoxide dismutase 2 gene</i>)
SOD2	Enzima cobre zinco superóxido dismutase 2 (<i>Superoxide dismutase 2 enzyme</i>)
SOF	Fluido sintético de oviduto (<i>Synthetic oviduct fluid</i>)
SP	São Paulo
TCM199	Meio de cultivo tecidual 199 (<i>Tissue culture medium 199</i>)

TCM199-air	Meio de cultivo tecidual 199 com 0,2mM de bicarbonato de sódio <i>(Tissue culture medium 199 added 0.2mM sodium bicarbonate)</i>
TE	Transferência de embriões
TRA	Tecnologia de reprodução assistida
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidades internacionais
USA	Estados Unidos da América <i>(United States of America)</i>
vs.	<i>Versus</i>
X	Vezes

SUMÁRIO

FOLHA DE APROVAÇÃO.....	3
DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	11
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.1. Introdução.....	26
1.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	28
1.3 Recuperação e qualidade oocitária.....	30
1.4 Maturação oocitária.....	32
1.4.1 Maturação nuclear.....	33
1.4.2 Maturação citoplasmática.....	34
1.4.3 Maturação molecular.....	35
1.5 Maturação <i>in vitro</i>.....	35

1.6 Fecundação <i>in vitro</i>	36
1.7 Cultivo <i>in vitro</i>	38
1.8 Criopreservação.....	39
1.9 Princípios da criopreservação.....	40
1.10 Danos da criopreservação.....	41
1.11 Métodos de criopreservação.....	42
1.11.1 Criopreservação com equilíbrio ou quase-equilíbrio.....	42
1.11.2 Criopreservação sem equilíbrio.....	43
1.12 Estresse subletal.....	44
1.13 Pressão ambiental.....	46
1.14 Alta pressão hidrostática.....	47
1.15 Alta pressão gasosa.....	49
1.16. Referências bibliográficas.....	51
2 REVIEW MANUSCRIPT - CELLULAR SUBLETHAL STRESS INDUCED BY HIGH PRESSURE AND TRANSCRIPTIONAL RESPONSE RELATED TO MAMMALIAN EMBRYO CRYOPRESERVATION	68
2.1 Abstract.....	69
2.2 Introduction.....	71
2.3 Shock proteins.....	72

2.4 Embryonic stress and cryopreservation.....	73
2.5 Sublethal stress induced by high pressure in cryopreservation.....	75
2.6 Transcriptional modifications.....	77
2.7 Conclusion.....	80
2.8 References.....	81
3 ARTIGO DE REVISÃO – USO DE AGENTES CRIOPROTETORES NAS TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	89
3.1 Resumo.....	90
3.2 Introdução.....	90
3.3 Anatomia da criopreservação.....	91
3.4 Congelação convencional.....	92
3.5 Vitrificação.....	93
3.6 Danos da criopreservação.....	94
3.7 Crioprotetores.....	96
3.8 Danos dos CPA.....	99
3.9 Considerações finais.....	’100
3.10 Bibliografia.....	101

4 NUCLEAR MATURATION AND EMBRYO DEVELOPMENT OF BOVINE GERMINAL VESICLE OOCYTES EXPOSED TO SUBLETHAL HIGH GASEOUS PRESSURE.....	108
4.1 Abstract.....	109
4.2 Introduction.....	110
4.3 Material and methods.....	112
4.3.1 Oocyte collection.....	113
4.3.2 Groups segregation and HGP treatment.....	113
4.3.3 IVM.....	114
4.3.4 IVF.....	114
4.3.5 IVC.....	115
4.3.6 Statistical Analysis.....	116
4.4 Results.....	116
4.4.1 In vitro nuclear maturation rates.....	116
4.4.2 Cleavage rates and developmental kinect.....	117
4.5 Discussion.....	119
4.6 Conclusion.....	122
4.7 References.....	122

5 TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF 8-CELLS MURINE EMBRYOS SUBJECTED TO SUBLETHAL STRESS INDUCED BY HIGH GASEOUS PRESSURE (HGP) AND SURVIVAL AT THE BLASTOCYSTS STAGE FOLLOWING CRYOPRESERVATION.....	126
5.1 Abstract.....	127
5.2 Introduction.....	128
5.3 Results.....	129
5.3.1 Embryo production, developmental capacity and cryopreservation survival.....	129
5.3.2 Relative pattern of gene expression in 8-cells embryos and blastocysts.....	130
5.3.3 Sublethal stressed blastocysts differences in relative transcription compared to control blastocysts.....	131
5.3.4 Correlation analyses among and within embryo survival and transcriptional patterns....	131
5.4 Discussion.....	132
5.5 Material and methods.....	138
5.5.1 Experimental animals, embryo production and experimental groups	138
5.5.2 HGP treatment.....	139
5.5.3 Embryo in vitro culture.....	139
5.5.4 Blastocyst cryopreservation.....	139
5.5.5 RT-qPCR.....	140
5.5.6 Statistical Analysis.....	140
5.6 Acknowledgments.....	141
5.7 References.....	141

6 ANEXO A: EMBRYO RESILIENCE TO SUBLETHAL STRESS INDUCED BY HIGH GASEOUS PRESSURE.....	152
6.1 Trabalho apresentado na 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2016 na área de Embriologia, Biologia do Desenvolvimento e Fisiologia da Reprodução.....	153
7 ANEXO B: SURVIVAL RATES OF CRYOPRESERVED MURINE BLASTOCYSTS EXPOSED TO HEAT STRESS AT 8-CELLS STAGE.....	155
7.1 Trabalho apresentado na 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2017 na área de Biotecnologias de suporte: Criopreservação e criobiologia, diagnóstico através de imagem, biologia molecular, e “ômicas”.....	156
8 ANEXO C: EFFECT OF EXPOSURE OF BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES TO HIGH GASEOUS PRESSURE ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT.....	158
8.1 Trabalho apresentado na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2018 na área de Embriologia, Biologia do Desenvolvimento e Fisiologia da Reprodução.....	159
9 ANEXO D: IGF-2 AND IGF-2R MURINE BLASTOCYST TRANSCRIPTIONAL RESPONSE AFTER HIGH GASEOUS PRESSURE EXPOSURE AT 8-CELLS STAGE.....	161
9.1 Trabalho apresentado na 44ª Reunião Anual da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) – 2018.....	162

10 ANEXO E: A FRUCTOSE-BASED EXTENDER PROTECTS COLOSSOMA MACROPOMUM SPERMATOOA AGAINST CHILLING INJURIES	164
10.1 Artigo publicado na Aquaculture Research em parceria com o Departamento de Zootecnia (UFRGS) e com o Programa de Pós-Graduação em Aquacultura (INPA)	165

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é atualmente uma das biotecnologias reprodutivas de maior relevância na pecuária bovina, facilitando a produção em larga escala de embriões geneticamente superiores e permitindo a transferência de embriões a custos reduzidos (KOCYIGIT, 2016). Entretanto, esta tecnologia de reprodução assistida (TRA) expõe gametas e embriões a condições não-fisiológicas, podendo levar a um desenvolvimento anormal (DELL COLLADO, 2017).

As últimas estatísticas publicadas pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS - *International Embryo Technology Society*), referente ao ano de 2016, revelam que foram produzidos no Mundo mais de 666.000 embriões, e, destes, transferidos aproximadamente 450.000 (73% de embriões frescos e 27% congelados), sendo que o Brasil responde por aproximadamente 52% deste total. (PERRY, 2017). Embora haja crescente interesse na PIVE, ela necessita de aprimoramento visto que no Brasil apenas em média 35% dos oócitos utilizados chegam ao estágio de blastocisto para serem transferidos. Em torno de 20% destes embriões produzidos no Brasil não são transferidos em função de não haver um número suficiente de receptoras e, infelizmente, a criopreservação em larga escala ainda não é economicamente viável para a utilização destes embriões em função da reduzida taxa de sobrevivência após o reaquecimento ou descongelamento (BECKER, 2016).

Embriões produzidos *in vivo* (PIV) apresentam consideráveis diferenças se comparados com embriões produzidos *in vivo* (IVD – *in vivo derived*), uma vez que os sistemas de cultivos atuais ainda não conseguem mimetizar perfeitamente o ambiente uterino materno (LONERGAN; FAIR, 2008). Segundo Crosier *et al.* (2001) estas diferenças devem-se a maior quantidade de vacúolos, à reduzida expressão de comunicações intercelulares, à compactação menos pronunciada, à massa celular interna geralmente menor com e menos células, e a menor

quantidade de células totais. O grande acúmulo de lipídeos intracelulares e o decréscimo na quantidade de mitocôndrias também influenciam nessa redução de viabilidade (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004), bem como diferenças na expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (MUNDIM, 2009).

Desta forma, a busca na identificação de mecanismos e estratégias para o aumento da viabilidade de embriões PIV é uma constante entre os pesquisadores da área. Entre as alternativas propostas, está a indução de estresse subletal, visando obter uma resposta ao estímulo que, em teoria, promove uma reação cruzada de proteção aos sistemas de cultivo (DU *et al.*, 2008). Para esta reação positiva frente às situações em tese prejudiciais denominou-se *hormesis* (SAGAN, 1991). Na área da embriologia, acreditava-se que seres vivos em estágios iniciais eram mais suscetíveis às influências externas do que em qualquer outro estágio de sua vida (WILSON, 1973). Sendo assim, a proposta dos laboratórios de produção embrionária sempre visou a menor interferência possível nas células, e a ideia de que procedimentos laboratoriais poderiam melhorar a produção embrionária sempre foi tida como utópica (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). A partir da observação de reposta hormética em microrganismos, embriologistas passaram a utilizar essa ferramenta em embriões e gametas como uma forma de aprimorar as TRA (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

O uso da alta pressão hidrostática (HHP – *high hydrostatic pressure*) tem sido documentado como uma promissora técnica na indução de resposta hormética em gametas e embriões mamíferos. Entre as pesquisas já realizadas, avaliou-se o efeito da HHP na sobrevivência de blastocistos murinos IVD submetidos ao protocolo de criopreservação após o tratamento. Da mesma forma, utilizou-se protocolos de HHP em blastocistos bovinos PIV (PRIBENSZKY *et al.*, 2005b, PRIBENSZKY *et al.*, 2008a), oócitos suínos (DU *et al.*, 2008, PRIBENSZKY *et al.*, 2008b), e espermatozoides de touro (PRIBENSZKY *et al.*, 2007) e javali (PRIBENSZKY *et al.*, 2006). Em comum a todos estes relatos científicos, está a observação de

um aumento significativo na sobrevivência após a criopreservação quando submetidos previamente a um protocolo de HHP.

Paralelo aos trabalhos com a HHP, nosso laboratório desenvolveu um sistema utilizando como agente indutor a alta pressão gasosa (HGP – *high gaseous pressure*). Inicialmente, oócitos caninos foram submetidos ao protocolo e demonstrou-se que a HGP não diminuía a taxa de maturação (RODRIGUES *et al.*, 2012). Experimentos posteriores utilizando embriões murinos IVD apresentaram resultados também demonstrando que a HGP não afetava negativamente a viabilidade e o desenvolvimento embrionários (COLLARES, 2014; BECKER 2016). Além de não se mostrar prejudicial, em alguns protocolos a HGP mostrou ser um fator positivo na capacidade do embrião atingir o estágio de blastocisto (BECKER 2016).

O objetivo deste trabalho foi, no primeiro experimento, determinar as taxas de maturação *in vitro* e desenvolvimento embrionário *in vitro* ao estágio de blastocisto a partir da PIVE bovinos, empregando gametas previamente expostos à HGP. Em conjunto com a análise de gametas bovinos, procuramos, no segundo experimento, avaliar a expressão gênica relativa de diferentes genes de embriões murinos produzidos *in vivo* em estágio de blastocisto expostos previamente à HGP no estágio de 8-células.

1.2 Produção *in vitro* de embriões

A PIVE tem se tornado uma das biotecnologias da reprodução animal de maior importância comercial na difusão de diferentes genomas, pois além de ser uma ferramenta para aceleração dos programas de melhoramento genético, é a base para outras biotecnologias como, por exemplo, a transferência nuclear e a transgenia (SALVIANO, 2014)

Relatos sobre esta biotecnologia existem desde o final do século XIX, descrevendo que a após a adição de sêmen em cultivos de oócitos de coelhos e cobaias, ocorria a divisão celular destas estruturas (SCHENK, 1878 *apud* BIGGERS, 2012). Resultados controversos sobre o primeiro animal nascido após fecundação *in vitro* (FIV) sucederam-se até que, em 1951, Chang relatou o nascimento de coelhos gerados por FIV. Pesquisadores continuaram investigando fenômenos associados a PIVE como a capacitação espermática de espermatozoides humanos (YANAGIMACHI; CHANG, 1963), obtenção de embriões murinos PIV (WHITTINGHAM, 1968), maturação *in vitro* (MIV) e FIV de oócitos bovinos (IRITANI; NIWA, 1977), culminando com o nascimento do primeiro bezerro a partir de um óvulo maturado *in vivo*, fecundado e cultivado *in vitro*, e transferido posteriormente para uma receptora (BRACKETT *et al.*, 1982). Os processos de PIVE continuaram sendo esclarecidos de forma detalhada até que em 1987, Lu *et al.* descreveram o nascimento do primeiro bezerro em que os processos de maturação, fecundação e cultivo foram realizados totalmente *in vitro*. A eficiência da PIVE, representada pelas taxas de fecundação e clivagem aumentaram significativamente desde então, particularmente após a descoberta do efeito da heparina na capacitação espermática (PARRISH; SUSKO-PARRISH; WINER, 1988).

Como consequência, houve uma rápida evolução da técnica e o número de embriões PIV (VIANA; CAMARGO, 2007). Esse crescimento chegou a 42% do total de embriões produzidos no mundo, atingindo a marca de mais de meio milhão de embriões PIV no ano de 2017 (PERRY, 2017).

O Brasil destaca-se na PIVE como principal ferramenta de produção por criadores, pois esta apresenta maior flexibilidade em relação à produção convencional de embriões IVD (VIANA; CAMARGO, 2007). Entre os fatores se destacam a capacidade de uso frequente, a não necessidade de estimulação hormonal, possibilidade de utilização de animais pré-púberes, em idade avançada e em início de gestação, sendo assim também uma técnica de escolha em

animais com problemas reprodutivos adquiridos e que não respondem à superovulação convencional (HANSEN, 2007)

De maneira geral, a PIVE pode ser dividida em duas principais etapas, sendo elas, a obtenção de oócitos pela aspiração folicular ovariana (OPU – *ovum pick-up*) ou aspiração de ovários *post mortem*, normalmente provenientes de abatedouros, e a etapa laboratorial, esta subdividida em maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro* (CIV). Apesar do avanço nas técnicas e volume de PIVE nas últimas décadas, a eficiência da produção ainda está longe de ser considerada ideal, visto que, em bovinos, 90% dos oócitos submetidos à MIV atingem a fase de metáfase II (MII), 80% são fecundados e menos de 40% chegam à fase de blastocisto (LONERGAN; FAIR, 2016).

1.3 Recuperação e qualidade oocitária

A recuperação de oócitos é a base da PIVE (PIETERSE *et al.*, 1988). As principais técnicas utilizadas para a obtenção dos oócitos são a aspiração dos folículos de ovários provenientes de abatedouros ou recuperação através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom.

A aspiração folicular de ovários de abatedouros tem como principal característica a alta heterogeneidade entre os oócitos provenientes de animais de diversos fundos genéticos. A recuperação dos oócitos é baseada na aspiração dos folículos visíveis na superfície do ovário. Estes oócitos apresentam variabilidade na sua competência em maturar e serem fecundados pelo espermatozoide (BILODEAU-GOËSEELS; PANICH, 2002). A grande desvantagem desta tecnologia é a falta de reprodutibilidade, uma vez que a fêmea doadora já foi abatida, impedindo assim novas coletas do mesmo animal.

O desenvolvimento da técnica de recuperação de oócitos aspiração folicular transvaginal teve grande impulso após o nascimento dos primeiros seres humanos gerados por FIV e transferência de embriões por Steptoe e Edwards em 1978, sendo o maior avanço a mudança do uso do laparoscópio para as técnicas de aspiração transvaginal orientada por ultrassonografia (FEICHTINGER; KEMETER, 1986), eliminando assim a necessidade de abordagem cirúrgica dos ovários. A associação das técnicas de aspiração folicular e PIVE (OPU-PIVE) foi considerada como uma alternativa aos programas clássicos de superovulação (CASTILHO *et al.*, 2009), pois concentrou a sua utilização em animais de alto valor genético e, principalmente, em animais com problemas de fertilidade adquiridos ou com histórico de insucesso na superovulação (SCHERNTHANER *et al.*, 1999).

Vários pontos são considerados chaves no sucesso da PIVE. O fator materno (conteúdo citoplasmático e nuclear do oócito, proteínas e RNAm) é fundamental para que os gametas suportem a FIV e o desenvolvimento embrionário (CAMARGO *et al.*, 2006). O ambiente folicular ao qual estava submetido o oócito ou às condições ambientais em que as doadoras foram mantidas também influenciam na qualidade e competência oocitária (LONERGAN *et al.*, 1994; ARLOTTO *et al.*, 1996, WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000). O diâmetro do oócito consta como um dos fatores mais importantes citados na literatura visto que está relacionado com o acúmulo de RNAm e proteínas (FAIR; HYTTEL; GREVE, 1995, MEIRELLES *et al.*, 2013). Estudos demonstraram que oócitos de menor diâmetro tem maior probabilidade de apresentar anomalias cromossômicas (LECHNIAK; PERS-KAMCZYC; PAWLAK, 2002). Segundo a metodologia proposta por Gonçalves, Visintin e Oliveira (2002), a classificação do oócito é realizada com escala gradativa de qualidade morfológica de 1 a 4, sendo:

- Grau 1: células do *cumulus* compactas presentes, com mais de três camadas, ooplasma com granulações finas e homogêneas preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom;

- Grau 2: células do *cumulus* compactas presentes parcialmente o redor do oócito, com menos de três camadas, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente e preenchendo o espaço interior da zona pelúcida;

- Grau 3: células do *cumulus* presentes, porém expandidas, ooplasma retraído com espaços entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelíneo, degenerado, vacuolizado ou fragmentado;

- Grau 4: oócito desnudo ou sem células do *cumulus*.

A capacidade de oócitos mamíferos em maturarem *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, o crescimento folicular e a presença ou ausência de células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus-oophuros* (CCOs), sendo esse último, necessário para o transporte de energia e a promoção da maturação do oócito bovino de modo que a sua presença circundando os oócitos parece ser mais importante para a MIV que a atividade ovariana ou o tamanho folicular (SATO; IRITANI; NISHIKAWA, 1977; FUKUI; SAKUMA, 1980).

1.4 Maturação oocitária

Em geral, as duas formas pelos quais os meios de cultivo são confeccionados são baseadas no princípio de escolha do próprio embrião (“*Let the embryo choose*”; BIGGERS; MCGINNIS, 2001) ou na tentativa de mimetizar o ambiente no qual as estruturas se encontram no organismo (“*Back to nature*”; LEESE, 1998). Nesta última abordagem, os meios de cultivo de oócitos para MIV mimetizam o ambiente folicular, os meios de FIV mimetizam o ambiente interno à ampola da tuba uterina, e meios de CIV, as secreções encontradas na tuba uterina (SUMMERS; BIGGERS, 2003).

Em mamíferos, a maturação oocitária é definida como a sequência de eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica com a formação do segundo corpúsculo polar (BLANCO *et al.*, 2011). Esta maturação envolve complexos eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares que ocorrem de maneira sincrônica antes da ovulação (FERREIRA *et al.*, 2009). *In vivo*, essa retomada da meiose é iniciada pela onda pré-ovulatória de hormônio luteinizante (LH – *luteinizing hormone*), ocorrendo somente em oócitos competentes provenientes de folículos dominantes. Até este momento, o oócito ainda é circundado pelas células compactas do *cumulus*, e as junções gap existentes entre as células do *cumulus* e o oócito são desfeitas ao longo deste processo (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Os sinais que desencadeiam a maturação oocitária são provenientes das células foliculares que circundam o oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), uma vez que estes últimos não possuem nenhum receptor de LH (PENG *et al.*, 1991). Os folículos respondem à onda de LH mudando a produção de esteroides pelas células da granulosa e produzindo ácido hialurônico pelas células do *cumulus*. O ambiente de predominância estrogênica passa a ter predominância progesterônica; e o ácido hialurônico produzido leva à mucificação e expansão das células do *cumulus*, bem como ao rompimento das junções comunicantes existentes entre estas células e o oócito (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998).

1.4.1 Maturação nuclear

A maturação nuclear é caracterizada pela habilidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de MII, podendo ser observada pela extrusão do segundo corpúsculo polar e pelo aparecimento da segunda placa metafásica (WATSON, 2007). Os oócitos são mantidos em MII até a fecundação, quando a ativação do estímulo realizado pela penetração do espermatozoide

desencadeia o término do ciclo da meiose e inicia o desenvolvimento embrionário (VAN DEN HURK; BEVERS; DIELEMAN, 1999).

A base molecular que rege o processo de maturação do oócito em resposta ao pico de LH envolve várias vias regulatórias, tais como a alteração da fosforilação de proteínas, o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e os níveis de cálcio (BORNSLAEGER; MATTEI; SCHULTZ, 1986; HOMA, 1995; GORDO *et al.*, 2001).

1.4.2 Maturação citoplasmática

A maturação citoplasmática é adquirida após o oócito se tornar meioticamente competente e está relacionada com a capacidade do oócito em ser fecundado e formar um embrião viável (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), caracterizando-se pela reorganização de organelas citoplasmáticas (MAO, 2014). No contexto das organelas, a falha no deslocamento das mitocôndrias presentes na periferia do oócito na fase de vesícula germinativa para a região central do citoplasma na fase de MII está relacionado com baixas taxas de desenvolvimento embrionário (BAVISTER; SQUIRRELL, 2000).

A formação dos grânulos corticais está relacionada com a hipertrofia e proliferação dos complexos de Golgi durante o desenvolvimento do oócito (LIU, 2011). Quando imaturos, os oócitos apresentam distribuição aleatória dos grânulos corticais no citoplasma, porém durante a maturação, ocorre migração destes grânulos para a periferia onde ficarão dispostos até o momento da fecundação (MAO, 2014). Esta organela está envolvida com o impedimento da poliespermia através da exocitose cálcio-dependente após o contato do primeiro espermatozoide junto ao oócito (LIU 2011), este e outros processos relacionados à maturação citoplasmática ainda não estão completamente esclarecidos (MAO, 2014).

1.4.3 Maturação molecular

Para dar continuidade ao desenvolvimento embrionário, o oócito passa por gradativas mudanças que incluem um remodelamento físico e molecular do seu conteúdo genético (FAIR *et al.*, 1996). A ativação do genoma embrionário ou transição materno-zigótica é um fenômeno complexo caracterizado pela iniciação da transcrição no embrião e a substituição do RNAm materno pelo RNAm embrionário através de eventos nucleares e citoplasmáticos (ADJAYE *et al.*, 2007). Em bovinos, esta etapa ocorre essencialmente no estágio de oito a dezesseis células, quando há um aumento na duração do ciclo celular provavelmente devido ao início da atividade transcrricional embrionária, entretanto, há ocorrência de atividades menores de transcrição embrionária no estágio de uma a duas células, sugerindo que a iniciação da transcrição não está vinculada a determinado estágio de desenvolvimento embrionário (BADR *et al.*, 2007).

Mamo *et al.* (2011) reportaram um estudo transcritoômico no qual 75% dos transcritos encontrados no oócitos estão mais expressos na fase imatura, reforçando a ideia de que a maioria dos transcritos acumulados na fase de vesícula germinativa é que irão coordenar o subsequente desenvolvimento oocitário até a ativação do genoma embrionário.

1.5 Maturação *in vitro*

A reprodução da maturação oocitária *in vitro* tem sido realizada com sucesso nos protocolos de PIVE, visto que dos oócitos bovinos submetidos à MIV, 90% atingem a etapa correspondente à ovulação (LONERGAN; FAIR, 2014). Esse sucesso deve-se pelo uso de meios complexos ricos em aminoácidos, vitaminas, dentre outros componentes (abordados

posteriormente), suplementados com meios indefinidos, como soro fetal bovino (abordados posteriormente), bem como a presença de hormônios e fatores de crescimento.

Uma melhor expansão das células do *cumulus* é observada quando os hormônios LH e folículo estimulante (FSH – *follicle stimulating hormone*) são adicionados aos meios de maturação (YOUNIS; BRACKETT, 1992). O FSH induz a retomada da meiose, o estímulo à expansão e ao aumento de receptores de LH pelas células do *cumulus*, e o consequente favorecimento à fecundação (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A adição de fator de crescimento epidermal (EGF – *epidermal growth factor*) tem por finalidade o desenvolvimento de um papel sinérgico no desenvolvimento oocitário, pois previne alterações desfavoráveis na estrutura da zona pelúcida e favorece a manutenção da aderência das células do *cumulus* ao oócito (HEWITT; WATSON; ENGLAND, 1998). O EGF estimula a síntese de glutatona intracelular no oócito e, como efeito, protege o DNA, auxiliando na síntese de proteínas e transporte de aminoácidos, bem como regula a maturação oocitária, promovendo a quebra da vesícula germinativa e expansão das células do *cumulus* (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990), ao atuar como mediador parácrino de LH (HSIEH *et al.*, 2007). O estradiol, por sua vez, exerce ação no desenvolvimento folicular, sensibilizando células do *cumulus* para resposta às gonadotrofinas (GORDON, 2003)

1.6 Fecundação *in vitro*

Segundo Gordon (2003), a fecundação é um processo complexo que resulta na união de dois gametas, com a restauração do número de cromossomos somáticos e, conseqüentemente, início do desenvolvimento de um novo indivíduo. Em mamíferos, os espermatozoides não possuem a habilidade de fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando

morfologicamente normais e com movimentos progressivos. A capacidade de do espermatozoide adquirir competência para a fecundação foi denominada capacitação espermática (CHANG, 1951; AUSTIN 1951).

Um dos trabalhos mais importantes no campo da FIV demonstrou que a incubação de oócitos com espermatozoides selecionados após o descongelamento do sêmen, na presença de heparina para a sua capacitação, aumentou a taxa de fecundação (PARRISH *et al.*, 1986). Independentemente do método utilizado para seleção dos espermatozoides viáveis (usualmente *Swim-up* ou gradiente de densidade descontínuo), o cultivo na presença de heparina resultou na melhora da taxa de fecundação (MENDES *et al.*, 2003). Hoje este protocolo é amplamente utilizado na PIVE devido a sua grande reprodutibilidade técnica (PARRISH *et al.*, 2014).

A separação de células espermáticas viáveis tem como dois principais objetivos a remoção do plasma seminal e, conseqüentemente, a remoção de agentes decapitantes associados à superfície dos espermatozoides, bem como a seleção de células espermáticas com propriedades de alta densidade, relacionada com células maduras (HENKEL; SCHILL, 2003).

A capacitação espermática visa mimetizar os efeitos das secreções da tuba uterina sobre as células espermáticas, ainda que no procedimento *in vitro* sejam utilizados fatores capacitantes que atuam de forma sinérgica como a adição de bicarbonato de sódio, albumina bovina sérica (BSA – *bovine serum albumin*) livre de ácidos graxos e, até mesmo, o próprio método de seleção das células viáveis (GADELLA; LUNA, 2014).

Os principais efeitos da capacitação espermática ocorrem na modificação estrutural da membrana do espermatozoide após a reação acrossomal. O bicarbonato de sódio, no interior da célula, ativa a produção de AMPc, hiperativando, em última instância, o batimento do flagelo (VISCONTI *et al.*, 2002). A adição de albumina está relacionada com a liberação de colesterol na superfície espermática, desestabilizando a membrana e facilitando a reação acrossômica (GADELLA E LUNA, 2014).

1.7 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* corresponde a etapa do desenvolvimento do oócito fecundado até o estágio de blastocisto (GARCIA; AVELINO; VANTINI, 2004). É o último evento da PIVE e concentra o maior impacto pós-fecundação na qualidade dos blastocistos produzidos (RIZOS *et al.*, 2002). Neste período pré-implantação ocorre o início da diferenciação celular embrionária que levará a formação das células do trofoectoderma, dando origem à placenta e anexos embrionários, e das células do embrioblasto, que dará origem ao feto (BAVISTER, 2000).

As condições de cultivo dos embriões possuem um papel chave na clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação, diferenciação, assim como desenvolvimento e viabilidade fetal (MOORE *et al.*, 2007). O suporte energético com fornecimento de glicose na fase após a compactação levou a um aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP – *adenosine triphosphate*) por embriões competentes (LOPES *et al.*, 2007), ao passo que também permitiu o avanço no desenvolvimento de embriões retardatários que sem esse suporte não completariam seu desenvolvimento (ABSALÓN-MEDINA; BUTLER; GILBERT, 2014). A tensão de oxigênio desempenha fator crucial na expressão de fatores induzíveis por hipóxia necessários para a regulação positiva de genes envolvidos no processo de aumento de metabolismo de glicose e competência no desenvolvimento embrionário (HARVEY, 2007). As condições hipóxicas de cultivo também evitam a formação de espécies reativas de oxigênio que aumentam o dano oxidativo sofrido pelo embrião e levam à elevadas taxas de apoptose (ARIAS; SANCHEZ; FELMER, 2012).

O CIV de embriões pode ser realizado em diferentes meios de cultivo, como SOF, CR1a, CZB, kSOM, entre outros (CHATOT, *et al.*, 1989, DONNAY *et al.*, 1996; LIU; FOOTE, 1995; TAKAHASHI; FIRST, 1992). Embora o CIV de embriões venha acompanhado de grandes dificuldades e desafios, a quantidade de meios utilizados nos diversos protocolos existentes

permite inferir que os embriões mamíferos possuem grande plasticidade na sua adaptação a esses meios (LANE, 2001).

1.8 Criopreservação

A descoberta por Polge *et al.* (1949) de que o glicerol proporcionava proteção às células espermáticas no processo de criopreservação do sêmen iniciou um novo campo de estudo, a criobiologia, que permitiu a manutenção e conservação de materiais genéticos por tempo indeterminado e a comercialização de forma prática e segura.

Já a criopreservação de embriões mamíferos teve sucesso na sua execução no início dos anos setenta, quando Wilmut (1972) conseguiu demonstrar a sobrevivência de embriões submetidos ao processo de congelamento/descongelamento e Whittingham, Leibo e Mazur (1972) obtiveram êxito no nascimento de camundongos após a transferência de embriões descongelados. Desde então, o sucesso foi alcançado com embriões de diferentes espécies, como a bovina (WILMUT; ROWSON, 1973), a ovina (WILLADSEN *et al.*, 1974), a caprina (BILTON; MOORE, 1976), a equina (YAMAMOTO *et al.*, 1982), a humana (TROUNSON; MOHR, 1983) e a suína (KASHIWAZAKI *et al.*, 1991).

Paralelo à criobiologia, desenvolveu-se o avanço em pesquisas relacionadas à produção de embriões, transferência de embriões (TE), PIVE, entre outras, que foram sendo aperfeiçoadas ao longo do tempo ao ponto de serem usadas como rotina (MEZZALIRA; VIEIRA, 2006). A maior parte dos protocolos de produção de embriões IVD permite a sua criopreservação com resultados de taxas de prenhez muito próximas a de embriões transferidos à fresco (HASLER, 2003). Entretanto, estes dados não são observados quando as mesmas biotécnicas são utilizadas com embriões PIV (AGCA *et al.*, 1998; TOMINAGA, 2004).

1.9 Princípios da criopreservação

Segundo Mazur (1980), no processo de solidificação da água por baixas temperaturas podem ser observadas três fases distintas ao longo do processo, sendo as fases líquidas e sólidas, e uma fase de transição entre as duas. A fase líquida não traz maiores prejuízos às células nos processos convencionais de criopreservação. Entretanto, as fases de transição e sólida são críticas, pois os principais danos relacionados à criopreservação ocorrem entre estas duas fases, quando a água é retirada das células pela formação de gelo e ocorre a concentração dos solutos. Entre estas fases, a faixa crítica de temperatura fica entre -15 e -60°C , sendo que as células necessitam cruzar esta faixa em duas oportunidades: durante o processo de resfriamento e durante o aquecimento. (MAZUR, 1984). Segundo o autor, meios contendo crioprotetores congelam espontaneamente quando atingem temperaturas entre -15 e -20°C , podendo levar à morte das células contidas no meio. Para que o fenômeno ocorra no meio extracelular inicialmente, induz-se a cristalização do meio em temperaturas logo acima (entre -5 e -8°C). O processo de congelamento de soluções aquosas inicia com a cristalização de água fora da solução, na forma de cristais de gelo puro. A solução restante extracelular, agora menor volume, fica com maior concentração de solutos (hiperosmolar) em relação ao líquido intracelular. Esta diferença de potencial osmótico leva ao deslocamento da água intracelular para o meio externo por osmose, causando desidratação da célula e, por consequência, redução da formação de cristais de gelo intracelular. Esta propriedade permite a sobrevivência celular à criopreservação.

Para que a célula tenha tempo de ser desidratada, a velocidade de redução da temperatura deve adequada (velocidade ótima). Se esta velocidade for mais que ótima, a célula não terá tempo adequado para sofrer desidratação e conseqüentemente a água irá congelar no compartimento intracelular; se menor, levará a uma severa desidratação por período excessivo na fase de transição e o sofrerá “efeito de solução”, causando redução na sobrevivência celular

(MAZUR, 1980). Sendo assim, a taxa de resfriamento deve ser rápida o suficiente para minimizar o efeito de solução e ao mesmo tempo lenta o suficiente para permitir a desidratação celular e prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares.

1.10 Danos da criopreservação

Independentemente da técnica empregada (velocidade da curva de resfriamento), muito são os fatores associados à criopreservação que levam a danos com comprometimento das funções celulares. As alterações cromossômicas, as modificações da zona pelúcida, as alterações ultraestruturais do citoesqueleto e das membranas mitocondriais, e a fragmentação do material genético são as alterações mais frequentes desencadeadas pelo processo de criopreservação (MOUSSA *et al.*, 2014). A extensão da lesão depende de diferentes propriedades celulares, que incluem, por exemplo, o tamanho, a forma, e a permeabilidade da membrana (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Dependendo do tipo celular, as temperaturas abaixo da fisiológica, porém acima de 0°C, são definidas como zona de perigo e acarretam injúrias na refrigeração, consideradas irreversíveis (YAVIN *et al.*, 2009). As membranas celulares são danificadas devido à fase de transição da porção lipídica, período durante a refrigeração em que ocorrem alterações estruturais e funcionais (YAVIN; ARAV, 2007). A exposição de oócitos e embriões a temperaturas entre 15°C e -5°C estão relacionadas a danos às gotas lipídicas citoplasmáticas e a microtúbulos, os quais comprometerão a fecundação e as divisões celulares subsequentes. Lesões em microtúbulos são consideradas reversíveis, enquanto prejuízos às gotas lipídicas contribuem para a morte dos embriões criopreservados (VAJTA; NAGY, 2006). Ainda segundo os autores, temperaturas entre -5°C e -80°C correspondem à principal fase de injúrias causadas

por cristais de gelo, enquanto temperaturas entre -50 e -150°C podem ocasionar fraturas da zona pelúcida e danos em organelas citoplasmáticas. Temperaturas abaixo de -150°C correspondem à fase de menor injúria, sendo o aquecimento acidental a causa mais provável de ocorrência de danos.

1.11 Métodos de criopreservação

Basicamente existem duas formas de criopreservação de células, ambas sendo utilizadas com relativo sucesso para preservar uma variedade de diferentes tipos celulares (MAZUR, 1990):

- Criopreservação com equilíbrio ou quase-equilíbrio – células são expostas à baixas concentrações de crioprotetores (aproximadamente $1,5\text{M}$) e a taxas de resfriamento entre $0,3$ e $2^{\circ}\text{C} / \text{min}$.

- Criopreservação sem equilíbrio ou quase-equilíbrio – células são expostas à elevadas concentrações de crioprotetores (comumente entre 6 e 8M) e a taxas de resfriamento maiores que $500^{\circ}\text{C} / \text{min}$.

1.11.1 Criopreservação com equilíbrio ou quase-equilíbrio

A técnica criopreservação com equilíbrio ou quase-equilíbrio, também chamada de congelamento lento ou rápida, respectivamente, consiste em expor gradualmente as células a uma concentração relativamente baixa de crioprotetores, acomodá-los em palhetas e resfriá-los até -5°C a -7°C , onde são mantidos por alguns minutos para equilibrar o potencial osmótico. Após este equilíbrio, a indução da cristalização extracelular é realizada, seguindo pelo resfriamento

lento e gradual a taxas entre 0,3 a 2°C por minuto, até alcançar entre -30°C e -89°C (WILLADSEN, 1977). Ao final do resfriamento, as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido para armazenamento (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Os embriões com curva de resfriamento com equilíbrio (mais longa), chegando aos -60°C, desidratam mais do que os embriões submetidos à curva de quase-equilíbrio (mais rápida), sendo que nesta última ainda permanecem resíduos de água, de forma que para evitar a formação de cristais de gelo no descongelamento, a taxa de aquecimento deve ser superior a 300 °C/min enquanto que no descongelamento da curva longa, a taxa de aquecimento deve ser gradual, em torno de 20°C / min (WILLADSEN, 1977).

1.11.2 Criopreservação sem equilíbrio

A criopreservação sem equilíbrio, também chamada de vitrificação, é a transformação de uma solução líquida em um sólido amorfo vítreo (ARAV, 1992). A técnica consiste em submeter embriões a altas concentrações de crioprotetores associado a uma alta velocidade de resfriamento, passando do estado líquido para um estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo (KASAI *et al.*, 1990). A técnica elimina os danos físicos causados pela formação de cristais de gelo e permite ultrapassar zonas perigosas de temperatura subzero onde ocorrem os maiores danos às células, entretanto, apresenta riscos relativos aos efeitos osmóticos

A vitrificação simplifica e, muitas vezes, aumenta a eficiência da criopreservação porque elimina os danos físicos causados pelo gelo e permite que o resfriamento seja rápido o suficiente para ultrapassar as temperaturas subzero onde ocorrem as lesões da congelação, mas, por outro lado, complica os efeitos osmóticos e introduz um maior risco de embriotoxicidade pela adição e remoção de crioprotetores (FAHY; WOWK, 2015).

Basicamente existem os sistemas abertos e fechados de vitrificação. Nos sistemas abertos, ocorre o contato das células com o azoto líquido, enquanto os sistemas fechados esta situação não ocorre. Uma vez que este o nitrogênio líquido pode conter agentes infecciosos, o contato direto das amostras pode acarretar contaminação das células. Desta forma, do ponto de vista de biossegurança, sistemas fechados são tidos como mais seguros que abertos (VAJTA; RIENZI; UBALDI, 2015). Entretanto, sistemas abertos permitem uma maior modificação de propriedades físicas, permitindo que taxas maiores de resfriamento sejam alcançadas e, conseqüentemente, reduzindo o risco de lesões celulares e de citotoxicidade das células expostas aos crioprotetores em temperaturas mais elevadas. (ARAV, 2014).

1.12 Estresse subletal

Observações iniciais que determinados agentes estressores causavam modificações no padrão de espessamento da cromatina em glândulas salivares de *Drosophila busckii*, representando sítios específicos de transcrição para a síntese proteica (RITOSA, 1962), levaram pesquisadores a teorias de que o estresse poderia estimular uma resposta celular positiva frente a este processo lesivo e desencadear uma série de eventos que culminam no favorecimento do desenvolvimento celular (PUROHIT *et al.*, 2014).

Quando as células são expostas a esses agentes, desde a falta de nutrientes até a ação de agentes estressores externos, elas se comunicam para ajustar seu metabolismo para a nova condição, sinalizando para o resto do organismo uma situação potencialmente prejudicial. (DE MAIO, 2011). Ao passar por um estresse subletal, a resposta celular ativada confere resistência ou tolerância a um outro estresse mais severo que poderia causar outro dano celular posteriormente, inclusive morte celular (MATTSON, 2008). Esta teoria encaixa-se no conceito

denominado “*hormesis*” (SOUTHAM; EHRLICH, 1943), caracterizado por uma resposta de proteção similar cruzada frente a dois agentes estressores diferentes (DU *et al.*, 2008).

Com a observação de que a indução de estresse subletal provia esta resistência cruzada em microrganismos, pesquisadores passaram a utilizar este princípio em gametas e embriões visando aprimorar as técnicas da reprodução (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011). Pribenszky *et al.* (2005a) relataram que submeter previamente embriões mamíferos ao estresse aumentaria a sua tolerância frente a uma nova situação de estresse como, por exemplo, à criopreservação.

Existem vários fatores que poderiam provocar este estresse, causando alterações no padrão fisiológico celular que poderiam ser utilizados sob forma de proteção cruzada, dentre esses, modificação do pH e da osmolaridade do meio de cultura, a privação no fornecimento de suprimentos nutritivos e a alteração da pressão ambiental (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011). Frente a um estresse subletal, as células se adaptam a esta realidade. Níveis toleráveis de estresse podem causar adaptação transitória ou uma resposta adaptativa, acompanhada por mudanças fisiológicas temporais que muitas vezes resultam em uma maior tolerância a subsequentes estresses (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Entretanto, se a intensidade deste estresse ultrapassar o limite crítico de tolerância, o mesmo irá desencadear o processo de apoptose ou necrose celular (FULDA *et al.*, 2010).

De acordo com Fulda *et al.* (2010), células submetidas ao estresse podem sobreviver ou morrer, dependendo do tipo celular, da intensidade e do tipo de estresse, entre outros fatores. Segundo os autores, a exposição prévia das células a estresses subletais pode estimular as respostas ao choque (HSR – *heat shock response*), com a síntese de proteínas do choque térmico (HSPs – *heat shock proteins*) entre outras respostas fisiológicas. Em uma nova exposição das células ao estresse, este teoricamente vai produzir um dano menor. As células que exibem este tipo de resposta ficam protegidas contra novas exposições, o que se reflete em redução da extensão das lesões também no organismo ou em partes dele.

Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) observaram que colônias de *Listeria monocytogenes* previamente submetidas a um choque térmico e posteriormente expostas à alta pressão hidrostática (HHP), apresentavam um aumento significativo de HSPs. A expressão dos genes responsáveis pela tradução destas proteínas se caracterizava como uma resposta a uma situação de estresse, conferindo à cepa bacteriana uma maior taxa de sobrevivência ao procedimento subsequente. Wouters *et al.* (1999) demonstraram que microrganismos da espécie *Lactococcus lactis*, quando expostos a 10°C produziam proteínas de choque frio (CSPs – *cold shock proteins*), o que os tornavam mais resistentes à criopreservação. Em 1990, Walker, Archer e Banks já haviam relatado que a *Listeria monocytogenes* apresentava habilidade para sobreviver à exposição a diferentes fatores de estresse ambiental, como por exemplo, pressão osmótica e baixas temperaturas.

1.13 Pressão ambiental

A pressão ambiental é uma variável termodinâmica que representa o peso que o espaço livre ao redor dos seres, ocupado por água ou ar, por exemplo, exerce sobre a superfície do mesmo. Ao nível do mar, a pressão ambiental exercida pelo ar atmosférico sobre o solo é designada como 1 atmosfera (1 atm = 1,02 Kgf/cm² = 0,101 megapascal – MPa). Sob a água, aproximadamente cada coluna de 10 metros exerce o equivalente a 1 atm. Em termos de pressão ambiental, a maior parte da superfície da biosfera terrestre é composta por ambientes de alta pressão, visto que os oceanos cobrem 70% da superfície terrestre.

Os efeitos físicos causados pela pressão estão relacionados principalmente com a modificação de volume e temperatura, e estão regulados pelo princípio de Le Chatelier de conservação de energia e pela primeira lei da termodinâmica (princípio de Joule), Segundo os

princípios, uma reação adiabática é acompanhada por um aumento de volume, ela é inibida pela redução da pressão; quando em condições isocóricas, reações acompanhadas por aumento da temperatura são compensadas pelo aumento da pressão do sistema.

Entretanto, os efeitos de uma elevada pressão ambiental em sistemas biológicos são muito complexos e ainda não totalmente definidos, sendo difícil a determinação do impacto em rotas metabólicas e a influência final sobre o organismo (SIQUEIRA-FILHO, 2009). Desde o início do século XIX, existe um interesse por sistemas de alta pressão com o intuito de reduzir a carga de contaminação de alimentos por microrganismos (HITE, 1899; HITE; GIDDINGS; WEAKLY, 1914), uma vez que se acreditava na impossibilidade de manutenção de vida nestas condições. Entretanto, Yayanos, Dietz e Boxtel (1979) observaram a existência de microrganismos marinhos que resistiam às HHP presentes nas grandes profundidades oceânicas. Mais tarde, em 1996, um veículo submersível não tripulado da marinha japonesa coletou organismos procarióticos piezófilos que resistiam a pressões hidrostáticas maiores que 100 MPa nas profundezas do oceano (ABE; KATO; HORIKOSHI, 1999).

1.14 Alta pressão hidrostática

Baseados nas observações das respostas celulares de microrganismo ao estresse causado por HHP, embriologistas realizaram experimentos com o objetivo de quantificar as taxas de sobrevivência e a resposta fisiológica de gametas e embriões criopreservados após a exposição à HHP (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

De acordo com observações realizadas, a sobrevivência após descongelação (calculado pelo desenvolvimento contínuo *in vitro*) de blastocistos de camundongos (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a), blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (PRIBENSZKY *et al.*, 2005b; PRIBENSZKY

et al., 2008a), oócitos de suínos (DU *et al.* 2008,; PRIBENSZKY *et al.*, 2008b) e espermatozoides de touro e javali (PRIBENSZKY *et al.*, 2007; PRIBENSZKY *et al.*, 2006) foi significativamente maior quando utilizado um protocolo otimizado de HHP antes dos processos de criopreservação. A indução de estresse pela HHP induziu alterações no perfil proteico de espermatozoides e oócitos (HUANG *et al.*, 2009; PRIBENSZKY *et al.*, 2008b).

Pribenszky *et al.* (2005b) submeteram blastocistos bovinos produzidos *in vitro* à HHP de 80 MPa por 45 min. Após esse procedimento, os blastocistos foram criopreservados pelo método de congelamento pela curva clássica. Depois do descongelamento, verificou-se que os blastocistos expostos à HHP sobreviveram em maior percentual à criopreservação (81% vs. 41%), medido através da morfologia e da continuidade do desenvolvimento *in vitro*.

Em outro experimento, Pribenszky *et al.* (2005a) utilizaram diferentes HHP para expor os blastocistos murinos antes da vitrificação. A exposição dos embriões à HHP de 60 MPa pelo período de 30 min proporcionou as maiores taxas de sobrevivência dos blastocistos à vitrificação. Os embriões previamente expostos à pressão também apresentaram uma velocidade de reexpansão maior (entre 4 h e 6 h vs. 20 h) e com maior percentual de eclosões em relação aos embriões não expostos (98% vs. 46%). No mesmo experimento foi realizada transferência embrionária para o útero de camundongas receptoras e os resultados de sobrevivência *in vivo* não apresentaram diferença significativa em relação aos controles frescos (85% vs. 83%).

Bock *et al.* (2010) expuseram embriões murinos no estágio de 2-células à HHP entre 20 MPa e 80 MPa (aumentos de 20 MPa para cada grupo experimental) por 60 min e 120 min, e observaram uma redução na viabilidade embrionária em se desenvolver ao estágio de blastocisto. Todavia, quando expostos já no estágio de blastocistos, estes revelaram maior tolerância à pressão. Ainda, segundo os pesquisadores, à medida que a pressão foi elevada, o tamanho dos blastômeros diminuiu, porém, aqueles que sobreviveram à exposição retornaram ao tamanho normal após o CIV.

Embriões bovinos PIV submetidos aos tratamentos de HHP de 40 MPa e de 60 MPa e após, vitrificados, tiveram, depois de reaquescidos, taxas de re-expansão superiores ao grupo controle vitrificados não tratado anteriormente com HHP (90% vs. 87% vs. 63%, respectivamente; JIANG *et al.*, 2016). Neste mesmo estudo, os efeitos HHP no perfil transcricional de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* foram analisados e observou-se uma pequena alteração no padrão que poderia explicar sugerindo que o tratamento com a pressão promoveu a competência de desenvolvimento dos embriões através de uma modesta reprogramação transcricional.

O sêmen bovino submetido à HHP de 30 MPa por 90 min. apresentou melhora na motibilidade e morfologia espermática pós-decongelamento em touros com histórico de baixa congelabilidade, o que proporcionou um aumento de 8% na taxa de não retorno ao cio após IA (PRIBENSZKY *et al.*, 2007). Em suínos, o semen descongelado submetido ao protocolo de HHP de 20 MPa ou 40 MPa por 80 ou 120 min apresentaram também melhora na motilidade quando comparado ao grupo não tratado (PRIBENSZKY *et al.*, 2006).

Ovócitos porcinos ativados partenogeneticamente apresentaram melhora na taxa de clivagem quando submetidos à HHP entre 20 MPa e 40 MPa por 30 ou 60 min, sendo que a vitrificação após 70 ou 130 min. Do término de exposição à HHP retornou uma melhora na taxa de blastocisto em 14% (DU *et al.*, 2008).

1.15 Alta pressão gasosa

A HGP, de maneira análoga à HHP, atua como um agente estressor ambiental e induz a adaptação das células, tornando-as mais resistentes, sendo aplicável em gametas e embriões mamíferos. Em um primeiro experimento, Rodrigues *et al.* (2012) adaptaram uma câmara de

pressão adequada à exposição a elevadas pressões gasosas para a exposição de oócitos caninos à HGP de 7,7 MPa por 60 min. como indutor de estresse sobre o gameta feminino. Os resultados revelaram que a exposição à HGP, a priori, não alterava as taxas de maturação dos oócitos.

Collares (2014) expôs embriões murinos no estágio de 8-células a 15,7 MPa por 2 h e 4 h e após, submeteu-os ao processo de congelamento pelo método de curva clássica no estágio de blastocisto. Após o descongelamento, verificou a viabilidade *in vitro* através das taxas de re-expansão embrionária. Amostras em diferentes momentos do experimento também foram colhidas para a análise da alteração no padrão da expressão de genes relacionados com a exposição a agentes estressantes. Essa análise não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais e os controles. Segundo o autor, uma possível explicação seria a variação biológica dos embriões entre os grupos e dentro de um mesmo grupo. A exposição dos embriões no estágio de 8- células a 15,7 MPa não comprometeu a viabilidade *in vitro* para desenvolverem-se ao estágio de blastocisto. Em seu experimento, houve uma diferença nas taxas de expansão dos blastocistos criopreservados expostos à HGP durante 120 min. quando comparado com o controle, que somente foi exposto ao processo de congelamento (86,3% vs. 72,8% respectivamente). Desta forma, concluiu que a HGP poderia ser empregada na indução de estresse celular subletal em embriões murinos.

Becker (2016) expôs blastocistos murinos a quatro diferentes tratamentos com HGP (20,7 MPa por 2 h e 4 h; 27,6 MPa por 2 h e 34,5 MPa por 2 h) e após cultivou-os *in vitro* por 72 h, comparando sua capacidade de desenvolvimento com blastocistos não expostos à HGP através das taxas de eclosão e alterações morfológicas. Os resultados obtidos não demonstraram diferença nas taxas de eclosão e na morfologia entre os grupos experimentais e os controles, indicando que o comportamento dos embriões à diferentes intensidades e tempos de HGP não pode ser extrapolado pelos resultados obtidos com o emprego da HHP. No experimento subsequente, o pesquisador expôs os blastocistos murinos aos mesmos tratamentos e

posteriormente criopreservou-os por curva de congelamento clássica (rápida). Após o descongelamento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 72 h para a avaliação das taxas de eclosão entre os grupos, revelando que o uso da HGP de 34,5 MPa por 2 h prévio à criopreservação modificava positivamente a taxa de sobrevivência *in vitro* de blastocistos murinos criopreservados (70,2% vs. 58,6%, $p < 0,05$).

1.16 Referências bibliográficas

ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. Pressure-regulated metabolism in microorganisms. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 447-453, 1999.

ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BUTLER, W. R.; GILBERT, R. O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 4, p. 393-409, 2014.

ADJAYE, J. *et al.* Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. **Physiological Genomics**, v. 31, n. 2, p. 315–327 2007.

AGCA, Y. *et al.* Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v. 50, n.1, p. 147-162, 1998.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. In: Lauria, F.; Gondolfi, A. (Coord.). **Embryonic development and manipulation in animal production trends in research and applications**. Cambridge, UK: Portland Press, 1992. p. 255-264.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 96-102, 2014.

ARIAS, M. E.; SANCHEZ, R.; FELMER, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced in vitro. **Zygote**, v. 20, n. 3, p. 209-217, 2012.

ARLOTTO, T. *et al.* Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 943-956, 1996.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, v. 4, n.1, p. 581 – 596, 1951.

BADR, H. *et al.* Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v.15, n. 1, p.355–367, 2007.

BAVISTER, B. D.; SQUIRREL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. **Human Reproduction**, v.15, n. 1, p. 189–98, 2000.

BAVISTER, B. D. Interactions between embryos and culture milieu. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 619-626, 2000.

BECKER, B. S. **Viabilidade de blastocistos de *Mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação**. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BIGGERS, J. D.; MCGINNIS, L. K. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 16, p. 153–163, 2001.

BIGGERS, J. D. IVF and embryo transfer: historical origin and development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 2, p. 118-127, 2012.

BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 71, n. 3-4, p.143-155, 2002.

BILTON, R. J.; MOORE, N. W. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 125-129, 1976.

BLANCO, M. R. *et al.* Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 6, n. 7, p. 155-165, 2011.

BOCK, I. *et al.* Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. **Cryo-letters**, v. 31, n. 5, p. 401–412, 2010.

BORNSLAEGER, E. A., MATTEI, P. M., SCHULTZ, R. M.; Involvement of cAMP dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. **Developmental Biology**, v.114, n. 1, p. 453-462, 1986.

BRACKETT, B. G. *et al.* Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.; EPPIG, J. Interactions between somatics cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 4, p. 543-547, 1990.

CAMARGO, L. S. *et al.* Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, n.1, p. 19-28, 2006.

- CASTILHO, C. *et al.* Associação da MOET e OPU-PIV na produção de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p. 231-237, 2009.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 697, 1951.
- CHATOT, C. L. *et al.* An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, n. 1, p. 679-688, 1989.
- COLLARES, F. J. F. **Expressão gênica e taxas de desenvolvimento de embriões *Mus musculus domesticus* expostos à pressão gasosa no estágio de 8-células e submetidos à criopreservação no estágio de blastocisto.** 2014. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CROSIER A. E. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375-1385, 2001.
- DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. **Cell Stress and Chaperones**, v. 16, n. 3, p. 235-249, 2011
- DEL COLLADO, M. *et al.* Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 2645, 2017.
- DONNAY, I. *et al.* A new phosphate-free simple medium for culture and co-culture of cattle embryos (Abstract). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, n. 1, p. 97, 1996.

DU, Y. *et al.* High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction**, v. 135, n. 1, p. 13-17, 2008.

FAHY, G. M.; WOWK, B. Principles of cryopreservation by vitrification. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, v. 2015, n.1257, p. 21-82, 2015.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 437–442, 1995.

FAIR, T. *et al.* Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, n. 4, p. 503-512, 1996.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. E13, p. 53-62, 2004

FEICHTINGER, W.; KEMETER, P. Transvaginal sector scansonography for needle guidedtransvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. **Fertility and Sterility**, v. 45, n. 5, p. 722-725, 1986.

FERREIRA, E. M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848. 2009.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of *cumulus* cell. **Biology of Reproduction**, v.22, n. 1, p. 669-673, 1980.

FULDA, S. *et al.* Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, n. 214074, 2010.

GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 74-84, 2014.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fecundação *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 223-230, 2004.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D. (Coord). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002, cap.10, p.195-226.

GORDO, A. C. *et al.* Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, n. 1, p.106-114, 2001.

GORDON, I. Maturing the bovine oocyte. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2003, p. 112-157.

GOTTARDI, F. P., MINGOTI, G. Z.; Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.33, n.2, p. 82-94, 2009.

HANSEN, P. J. To be or not to be - Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v. 68, n. S1, p. S40-S48, 2007.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1-2, p. 113–128, 2007.

HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, n. 3-4, p. 245-264, 2003.

HENKEL, R. R.; SCHILL W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 108, p. 1-22, 2003.

HEWITT, D. A.; WATSON, P. F.; ENGLAND, G. C. W. Nuclear staining and culture requirements for *in vitro* maturation of domestic bitch oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 6, p. 1083-1101, 1998.

HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. **Bulletin of West Virginia University Agricultural Experiment Station**, v. 58, p. 15-35, 1899.

HITE, B. H.; GIDDINGS, N. J.; WEAKLY, C. E. The effect of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. **Bulletin of West Virginia University Agricultural Experiment Station**, v. 46, p.1–67, 1914.

HOMA, S. T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, n. 1, p.122-134, 1995.

HSIEH, M. *et al.* Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Molecular Cellular Biology**, v. 27, n. 5, p. 1914-1924, 2007.

HUANG, *et al.* Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing–thawing. **Animal reproduction science**, v. 112, n. 1, p. 136-149, 2009.

IRITANI A, NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p. 119-121, 1977.

JIANG, Z. *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on expression profiles of *in vitro* produced vitrified bovine blastocysts. **Scientific reports**, London, v. 6, n. 21215, p. 1-10, 2016.

KASAI, M. *et al.* A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, n. 1, p. 91-97, 1990.

KASHIWAZAKI, N. *et al.* Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. **Veterinary Record**, v. 128, n. 11, p. 256-257, 1991.

KOCYIGIT, A. *et al.* A Review of In Vitro Culture Systems in Bovine Reproductive Biotechnologies. **Journal of Veterinary Research and Animal Husbandry**, v.1, n. 1, p. 1-4, 2013.

LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 225–236, 2001.

LECHNIAK, D.; PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 1, p. 23-42, 2008.

LEESE, H. J. Human embryo culture: back to nature. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 15, p. 466-468, 1998.

LIU, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. 149, p. 1-17, 2011.

LIU, Z.; FOOTE, R.H. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. **Biology Reproduction**, v. 53, n. 4, p. 786–790, 1995.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 49-55, 2014.

LONERGAN, P. *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48–53. 1994

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 255-268, 2016

LOPES; A. S. *et al.* Respiration rates correlate with mRNA expression. of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitroproduced blastocysts. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 223–236, 2007.

LU, K. H. *et al.* Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. **Veterinary Record**, v.121, n. 1, p. 159 – 260, 1987.

MAMO, S. *et al.* Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, n.151, p.1- 14, 2011.

MAO, J. *et al.* Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biology of Reproduction**, v.67, n. 4, p.1197-1203, 2002.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. **Proceedings of the 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. p. 99-114, 1980.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. c125-c142, 1984.

MAZUR, P. Equilibrium quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cellular Biophysics**, v. 17, n. 1, p. 53–92, 1990.

MEIRELLES, F. V. *et al.* Strategies to increase in vitro embryo yield: lessons from cell and molecular research. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 302-310, 2013.

MENDES, J. O. B *et al.* Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 331-340, 2003.

MEZZALIRA A.; VIEIRA A. D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. S1, p. 191-196, 2006.

MOORE, K. *et al.* In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, n. 9, p.1316-1325, 2007.

MOUSSA, M. *et al.* Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. **Science China Life Science**, v. 57, n. 9, p. 903-914, 2014.

MUNDIM, T.C. *et al.* Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1398-1407, 2009.

PARRISH, J.J. *et al.* Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171 – 1188, 1988.

PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67–73, 2014.

PENG, X. R., HSUEH, A. J., LAPOLT, P. S., BJERSING, L. N. Y. T. Localization of luteinizing hormone receptor Messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, p.3200-3207,1991.

PERRY, G. 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. 2017.

Disponível em:

<https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf> Acesso

em: 26 jun. 2018.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R.; The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.

PIETERSE M. C. *et al.* Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 4, p. 751-762, 1988.

POLGE, C. *et al.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, n. 4172, p. 666, 1949.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1-2, p. 143–150, 2005a.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation (Abstract). **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, n. 4 p. 338, 2005b.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Hydrostatic pressure-induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 162–163, 2006.

PRIBENSZKY C. *et al.* Improved post-thaw motility, viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen (Abstract). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 181-182, 2007.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Improved post-warming developmental competence of open pulled straw-vitrified in vitro-produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment (Abstract). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 1, p. 125-125, 2008a.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. **Animal reproduction science**, v. 106, n. 1, p. 200-207, 2008b.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 690-697, 2010.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes and embryos performance. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, n. 1, p. 48–55, 2011.

PUROHIT, G. K. *et al.* Investigating *hsp* gene expression in liver of *Channa striatus* under heat stress for understanding the upper thermal acclimation. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 381719, p. 1-10, 2014.

RITOSSA, F. A. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962.

RIZOS, D. *et al.* Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002

RODRIGUES, B. A. *et al.* High gaseous pressure pretreatment in *in vitro* maturation of canine oocytes (Abstract). **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 25, n. 1, p. 282-283, Jan. 2012.

SAGAN, L. A. Radiation hormesis: evidence for radiation stimulation and speculation regarding mechanisms. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 313-317, 1991.

SALVIANO, M. B. Estratégias para indução de competência de oócitos bovinos com atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase. 2014. 67 f. **Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1812, n.12, p.1896-1912, 2012.

SARAGUSTY, J; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1-19, 2011.

SATO, E.; IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. Factors involving *in vitro* maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 12-18, 1977.

SCHERNTHANER, W. *et al.* Pregnancy rate after ultrasound guided follicle aspiration in non lactating cows from different breeds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 46, n.1, p. 33-37, 1999.

SIQUEIRA-FILHO, E. **Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos**. 2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

SOUTHAM, C.M.; EHRLICH, J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. **Phytopathology**. v. 33, n. 1, p.517–524, 1943.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.12, n. 2, p. 366, 1978.

SUMMERS; M.C.; BIGGERS, J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Human Reproduction Update**. v. 9, n. 6, p. 557-582, 2003.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N. L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 963–978. 1992.

TOMINAGA, K. Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro-produced embryos for their practical use. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 29-38, 2004.

TROUNSON, A.; MOHR, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature**, v. 305, n. 1, p. 707-709, 1983.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, n.6, p.779-796, 2006.

VAJTA G., RIENZI L., UBALDI F. M. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 4, p. 325–333, 2015.

VAN DEN HURK, R., BEVERS, M. M., DIELEMAN, S. J. Folliculogenesis and oocyte development in mammals (livestock animals). In: JOY, K. P., KRISHNA, A., HALDAR, C. (Coord). **Comparative endocrinology and reproduction**. New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. p. 296–312.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n. 6, p.1717-1751, 2005

VIANA J.H.M.; CAMARGO L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n. S3, p. 915-924. 2007.

VISCONTI P.E. *et al.* Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p.133-150, 2002.

WALKER, S. J.; ARCHER, P.; BANKS, J. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 157–162, 1990.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13, p. E1- E3, 2007.

WEMEKAMP-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**, v. 68, n. 2, p. 456–463, 2002.

WHITTINGHAM, D. G. Fertilization of mouse eggs *in vitro*. **Nature**, v. 220, n. 5167, p. 592-593, 1968.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 411-414, 1972.

WILLADSEN, S. M. *et al.* Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 11, n.6, p. 560,1974.

WILLADSEN, S.M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deepfreezing and thawing. In: Ciba Foundation Symposium 52. **The Freezing of Mammalian Embryos**, Elsevier; Amsterdam, 1977, p.175-201.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Sciences**, v. 11, p. 1071-1079, 1972.

WILMUT, I.; ROWSON, L. E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v. 92, p. 686-690, 1973.

WILSON, J.G. **Environment and Birth Defects**. New York: Academic Press, 1973. 303p.

WOLFENSON, D., ROTH, Z., AND MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 60–61, p. 535–547, 2000.

WOUTERS, J. A. *et al.* Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG1363 in cryoprotection. **Microbiology**, v. 145, n. 11, p. 3185–3194, 1999.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 32, p. 399-403, 1982.

YANAGIMACHI, R.; CHANG, M. C. Fertilization of hamster eggs in vitro. **Nature**, v. 200, n. 4903, p. 281-282, 1963.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 81-89, 2007.

YAVIN, S. *et al.* Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, v. 24, n. 4, p. 797–804, 2009.

YAYANOS, A. A.; DIETZ, S. A.; BOXTEL, R. V. Isolation of a Deep-Sea Barophilic Bacterium and Some of Its Growth Characteristics. **Science**, v. 205, p. 808-810, 1979.

YOUNIS, A. I., BRACKETT, B. G. Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 2, p. 44-51, 1992.

REVIEW MANUSCRIPT

**CELLULAR SUBLETHAL STRESS INDUCED BY HIGH PRESSURE AND
TRANSCRIPTIONAL RESPONSE RELATED TO MAMMALIAN EMBRYO
CRYOPRESERVATION**

ARTIGO DE REVISÃO

**USO DE AGENTES CRIOPROTETORES NAS TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

**NUCLEAR MATURATION AND EMBRYO DEVELOPMENT OF BOVINE
GERMINAL VESICLE OOCYTES EXPOSED TO SUBLETHAL HIGH GASEOUS
PRESSURE**

**TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF 8-CELLS MURINE EMBRYOS SUBJECTED
TO SUBLETHAL STRESS INDUCED BY HIGH GASEOUS PRESSURE (HGP) AND
SURVIVAL AT THE BLASTOCYSTS STAGE FOLLOWING
CRYOPRESERVATION.**

6 ANEXO A

**BECKER, B.S.; COLLARES, F.J.F.; MENDONCA, D. D.; BERTOLINI, M.;
Rodrigues, J. L. Embryo resilience to sublethal stress induced by high gaseous pressure.
In: 30st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2018, Foz
do Iguaçu. Proceedings of the 30st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology
Society (SBTE). Animal Reproduction, v. 13, n 3, p. 583-583, 2016.**

6.1 Trabalho apresentado na 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2016 na área de Embriologia, Biologia do Desenvolvimento e Fisiologia da Reprodução

Embryo Resilience to Sublethal Stress Induced by High Gaseous Pressure

B.S. Becker¹, F.J.F. Collares¹, D.D. Mendonça², M. Bertolini¹, J.L. Rodrigues¹

¹UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Many studies have reported high pressure as a stressor that can be used to induce sublethal shock response on embryos, providing cell protection to a subsequent stress, such cryopreservation (Pribenszky *et al.*, Biol Reprod (83) 690-697, 2010; Rodrigues *et al.*, Reprod Fertil Dev (25) 282-283, 2012). The aim of this experiment was to investigate the use of high gaseous pressure (HGP) as an alternative to high hydrostatic pressure to induce murine blastocyst resilience. From 68 superovulated *Mus musculus domesticus* females, 47 (69.1 %) produced 518 blastocysts that were segregated in three experimental groups: (a) 20.7 MPa for 2 h (P20.T2); (b) 20.7 MPa for 4 h (P20.T4); and (c) 34.5 MPa for 2 h (P34.T2). All groups were paired with control blastocysts non-exposed to HGP. Statistical Analysis were performed using Chi-square test ($P < 0.05$) to compare hatching rates among control and experimental groups. Embryos were exposed to HGP and after submitted to *in vitro* culture in mKSOM media + 0.4% BSA. There was no difference in hatching rates in experimental and control groups: (a) P20.T2 - 84.5% (60/71) vs. control 86.2% (81/94); (b) P20.T4 - 93.5% (131/140) vs. control 88.2% (75/85); and (c) P34.T2 - 74/78 (94.9%) vs. control 92.0% (46/50). Therefore, we concluded that HGP can be used as sublethal stressor without loss of *in vitro* embryo viability.

Gene expression analysis will be carried out trying to identify embryo molecular modifications induced by HGP.

Keywords: high gaseous pressure, sublethal stress, murine embryo

7 ANEXO B

BECKER, B. S.; COLLARES, F.J.F.; MARCHIORETTO, P. V.; FREITAS, C. R.; MENTZ, D. A.; MULLER, T. B.; LUIZ, D. S. V.; BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; RODRIGUES, J. L. Survival rates of cryopreserved murine blastocysts exposed to heat stress at 8-cells stage. In: 31 st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2017, Cabo de Santo Agostinho. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). *Animal Reproduction*, v. 14, n. 3, p. 899, 2017.

7.1 Trabalho apresentado na 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2017 na área de Biotecnologias de suporte: Criopreservação e criobiologia, diagnóstico através de imagem, biologia molecular, e “ômicas”

Survival rates of cryopreserved murine blastocysts exposed to heat stress at 8-cells stage

B.S. Becker¹, F.J.F. Collares¹, P.V. Marchioretto¹, C.R. de Freitas¹, D.A. Mentz¹, T.B. Müller¹, D.S.V. Luiz¹, L.R. Bertolini², M. Bertolini¹, J.L. Rodrigues¹

¹UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil; ²PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Sublethal stress has been reported as inducer of gametes and embryos response, providing cell protection to a subsequent stress. Experiments showed that different treatments using pH modifications, heat and cold shock, osmotic challenge, high environmental pressure, and nutrients starvation lead embryos and gametes to produce different proteins than normally synthesized in homeostatic conditions in order to keep favorable conditions facing a next stressful situation. Within this observation, many researchers started to experiment sublethal stress as protector treatment for cryopreservation. The aim of this experiment was to investigate the use of heat stress of environmental temperature as 8-cells embryos stressor to improve cryopreservation rates at blastocyst stage. Embryos at 8-cells stage were recovered from six weeks old superovulated *Mus musculus domesticus* females at day 3 pregnancy. Two hundred and twelve embryos were randomly segregated in control (C) and experimental (B) groups. Eight-cells embryos from B group were maintained during 4 hours at 21°C while control

embryos were immediately after recovery *in vitro* cultured in mKSOM media + 0.4% BSA at 37°C under atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ and saturated humidity. After been exposed to environmental temperature, group B embryos were transferred to the same *in vitro* conditions as the control group embryos for 48h. Then, embryos from both experimental groups that reached blastocyst stage were cryopreserved in 0.25 mL straws using a classical frozen curve: first, blastocysts were exposed to 1.6 mol of ethylene glycol + mPBS + 0.4% BSA, then cooled at 2°C/min to reach seeding (-6°C) temperature and then they were cooled at -3°C/min until reach -35°C, when they were transferred to liquid azote. Embryo development and expansion rates were compared using Chi-square test ($P < 0.05$). Eight-cell embryo developmental rates to blastocyst stage showed no difference among control (95.0% - 92/97) and experimental (95.4% - 110/115) group. Cryopreserved blastocyst expansion rate of stressed embryos was significantly higher (84.5% - 93/110) than cryopreserved control embryos (72.8% - 67/92; $P < 0.05$). We concluded that a simple stress condition like maintaining embryos at environmental temperature (21°C) can induce a heat stress response that could be usefull to enhance embryo survival after cryopreservation.

Keywords: heat stress, cryopreservation, sublethal stress, embryo.

8 ANEXO C

B.S. Becker, C.R. Freitas, A.V. Gonsiorosky, J.M.V. Klafke, L.R. Bertolini, M. Bertolini, J.L. Rodrigues. Effect of exposure of bovine cumulus-oocyte complexes to high gaseous pressure on in vitro embryo development. 32st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2018, Florianópolis. In: Proceedings of the 32st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). Animal Reproduction, v. 15, n. 3, p. 506, 2018.

8.1 Trabalho apresentado na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) – 2018 na área de Embriologia, Biologia do Desenvolvimento e Fisiologia da Reprodução

Effect of exposure of bovine cumulus-oocyte complexes to high gaseous pressure on in vitro embryo development

B.S. Becker¹, C.R. de Freitas, A.V. Gonsiorosky, J. M. V. Klafke, L.R. Bertolini, M. Bertolini¹, J.L. Rodrigues¹

¹ FAVET/UFRGS - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ²PUCRS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Sublethal stress has been reported as gamete and embryo genomic response inducer, providing cell protection to a subsequent stress. Within such observation, researchers started to experiment sublethal stress as a means to improve bovine in vitro embryo production. This experiment aimed to test the effect of the exposure of immature bovine oocytes to high gaseous pressure (HGP – 4000 PSI during 120 min) on in vitro embryo development to the blastocyst stage after IVP procedures. A total of 510 bovine cumulus-oocyte complexes (COCs), after four replicates, were used in this study. Ovaries were obtained from a slaughterhouse and were transported to the laboratory in saline solution. Selected grades 1 and 2 COCs were randomly distributed in three groups: HGP, with 172 COCs placed in mPBS+ 0.1% polyvinylpyrrolidone, and then exposed to HGP; Control 1, with 157 COCs maintained in mPBS + 0.4% BSA at RT for 120 min; and Control 2, with 181 COCs used immediately for embryo production, according to our established IVP protocol. In all groups, IVM was carried out during 24 h at 38.5°C using TCM-199 supplemented medium (25 mM sodium bicarbonate, 0.22 mM sodium pyruvate, 50

μ M cysteamine, 5 μ g/mL LH, 5 μ g/mL FSH, 1 μ g/mL estradiol, 0.1 μ g/mL EGF) + 10% Fetal Calf Serum (FCS), followed by 20 h IVF into FERT-TALP + 0.6% BSA using frozen-thawed bovine sperm cells segregated by Percoll® gradient, at the 1×10^6 /ml inseminating dose. Then, presumptive zygotes were in vitro-cultured in SOFaaci + 5% FCS at 38.5°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂, in saturated air humidity. Blastocyst rates were observed on D8 after IVC and compared by the Chi-square test ($P < 0.05$). Blastocyst rates were significantly lower ($p = 0.0131$) in the Control 1 Group (11.0%, 16/145) than the Control 2 Group (19.8%, 32/162), with the HGP group being similar to both (18.7%, 25/134). In conclusion, results indicate that exposure of immature COCs to HGP prior to IVM did not affect embryo development to the blastocyst stage but maintaining COCs at RT for the same exposure time decreased embryo development in comparison to COCs subjected to immediate IVP procedures. Studies are ongoing in our laboratory to further understand the effect of exposure of gametes and embryos to HGP.

9 ANEXO D

BECKER, B. S.; COLLARES, F. J. F.; GONSIOROSKI, A. V.; FREITAS, C. R.; MENTZ, D. A.; BERTOLINI, L. R.; BERTOLINI, M.; RODRIGUES, J. L. Insulin-Like Growth Factor (IGF)2 and IGF2 Receptor (IGF2R) Murine Blastocyst Transcriptional Response after High Gaseous Pressure Exposure at 8-Cell Stage. In: 44th IETS Annual Conference, 2017, Bangkok. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018. v. 30. p. 196-197, 2018

9.1 Trabalho apresentado na 44ª Reunião Anual da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) – 2018.

IGF-2 and IGF-2R Murine Blastocyst Transcriptional Response after High Gaseous Pressure Exposure at 8-Cells Stage

B.S. Becker^A, F.J.F. Collares^A, A.V. Gonsiorosky^A, D.A. Mentz^A, C.R. de Freitas^A, L.R. Bertolini^B, M. Bertolini^A, J.L. Rodrigues^A.

^A UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; ^B PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Insulin-like growth factor 2 (IGF2) is a pleiotropic hormone encoded by an imprinted gene expressed in the paternal allele of eutherian mammals, and acts in physiological responses including cell proliferation, differentiation and development. IGF2 is mediated through the IGF1R signaling pathway, whereas the IGF2R, a maternally imprinted gene, acts on lysosomal IGF2 degradation. As imprinted genes, both *Igf2* and *Igf2r* expressions are thought to be more susceptible to dysregulation by environmental factors. This study aimed to evaluate the effect of exposure of 8-cells stage murine embryos to 16 MPa of high gaseous pressure (HGP) on the relative *Igf2* and *Igf2r* mRNA abundance in resulting blastocysts following *in vitro* culture (IVC). Day-3 embryos were recovered from superovulated *Mus musculus domesticus* females. Eight-cells stage embryos were exposed to 16 MPa HGP for either 2 h (P1 Group) or 4 h (P2 Group), with a Control Group not exposed to HGP. Immediately after recovery or after HGP exposure, embryos were *in vitro*-cultured for 48 h in mKSOM medium supplemented with 0.4% BSA, at 37.5°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, and saturated humidity. Resulting blastocysts were collected in pools of 10, rinsed in protein-free PBS and stored at -80°C, pending analysis.

Following total mRNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR were performed according to manufacturers. Values were normalized to the internal control *Ppia* gene. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ approach. Blastocyst rates after IVC were compared by the Chi-square test ($P < 0.05$), with relative *Igf2* and *Igf2r* expression data and *Igf/Igf2r* ratio analyzed by ANOVA, after log transformation when needed, with pairwise comparisons done by the Tukey test ($P < 0.05$). No differences in blastocyst rates after IVC were observed between groups (Control: 94.2%; P1: 95.4%; P2: 94.1%). However, the *Igf2* mRNA relative abundances in blastocysts were 6.3- and 4.2-fold lower in the P1 ($P < 0.01$) and P2 ($P = 0.07$) than the Control Group, respectively. Likewise, the *Igf2r* relative transcription levels were also 6.6- and 2.2-fold down-regulated in blastocysts from the P1 ($P < 0.001$) and P2 ($P < 0.01$) Groups, respectively, when compared to controls. Although the relative expression for both genes followed a down-regulation pattern in blastocysts exposed to HGP at the 8-cells stage, the *Igf2/Igf2r* ratio was 1.9-fold lower in blastocysts in the P2 Group ($P < 0.05$) than controls, which was similar to the P1 Group, indicating a potential stress adaptation response for embryo growth and development after exposure to HGP in the P1 Group. It is known that cells under certain conditions of stress may halt growth and development as a response to initiate cellular events to maintain viability. Results from this study appear to translate such response process to HGP in both experimental groups. However, as embryo development and the *Igf2/Igf2r* ratio in embryos were similar between the Control and the P1 group, exposure to 16 MPa HGP for 2 hours at the 8-cells stage embryo does not seem to affect cell signaling to growth and proliferation up to the blastocyst stage.

Keywords: high gaseous pressure, sublethal stress, IGF2, IGF2R, 8-cells embryo.

10 ANEXO E

**PASTRANA, YUGO MORAES; STREIT, DANILO PEDRO; GARCIA, RAYCON
ROBERTO FREITAS; BECKER, BRUNO SILVEIRA; RODRIGUES, JOSÉ LUIZ;
GODOY, LEANDRO. A fructose-based extender protects *Colossoma macropomum*
spermatozoa against chilling injuries. AQUACULTURE RESEARCH, v. 50, p. 521-528,**

2019