

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

**CONGELAÇÃO OU VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* PREVIAMENTE EXPOSTOS A ESTRESSE
SUBLETAL**

Autor: Andressa Varella Gonsioroski

**PORTO ALEGRE
2018**

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

CONGELAÇÃO OU VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* PREVIAMENTE EXPOSTOS A ESTRESSE
SUBLETAL

Autor: Andressa Varella Gonsioroski
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Biotécnicas da
Reprodução.
Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE
2018

Gonsioroski, Andressa Varella

Congelamento ou vitrificação de blastocistos bovinos produzidos in vitro previamente expostos a estresse subletal / Andressa Varella Gonsioroski. -- 2018. 50 f.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Coorientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. embriões. 2. blastocistos. 3. alta pressão gasosa. 4. estresse subletal. 5. criopreservação. I. Rigo Rodrigues, José Luiz, orient. II. Bertolini, Marcelo, coorient. III. Título.

Andressa Varella Gonsioroski

Congelação ou vitrificação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* previamente expostos a estresse subletal.

Aprovado em 2018

APROVADO POR:

Prof.Dr. José Luiz Rigo Rodrigues

Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Adriana Bos-Mikich

Membro da Comissão

Dra. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Membro da Comissão

Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira

Membro da Comissão

Dedico este trabalho à minha Mãe pelo apoio incondicional não só neste, mas em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela grande oportunidade de ser sua aluna de mestrado no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução. Agradeço pela paciência, pelos valiosos ensinamentos e conselhos que foram de suma importância para o desenvolvimento do meu trabalho e também para a minha evolução profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, pela paciência, pelo apoio, pelas sugestões e ensinamentos;

À Universidade Federal Do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Veterinária por me oportunizar formação e aperfeiçoamento de excelência;

À equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, que além de colegas se tornaram meus amigos: Bruno Becker, Favorino Collares, Camila de Freitas, Daiane Mentz, Karine Campagnolo, Felipe Ongaratto, Bruna Wilhelm, João Roberto, incluindo os estagiários e bolsistas que por aqui cruzaram durante esse período;

E à minha mãe Cristiane pelo apoio incondicional sempre, pela paciência, pelo amor, pela companhia, pelos conselhos, pela compreensão. Porque a vida não vem com manual, vem com mãe.

A gratidão é o tesouro dos humildes.

"I've made the most important discovery of my life. It's only in the mysterious equation of love that any logical reasons can be found."

John Forbes Nash

RESUMO

Embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) apresentam diferenças quando comparados aos produzidos *in vivo*. Esta particularidade reduz as taxas de viabilidade *in vitro* e *in vivo* após a criopreservação, limitando o emprego comercial da preservação dos embriões PIV. Várias estratégias vêm sendo propostas para aumentar a viabilidade e desenvolvimento desses embriões criopreservados. Alguns estudos utilizam a exposição dos embriões a um estresse subletal, como a alta pressão hidrostática (HHP), previamente a procedimentos que reduzem a viabilidade embrionária, o que aumenta a tolerância desses indivíduos à criopreservação. Os objetivos deste experimento foram determinar as taxas de viabilidade de blastocistos bovinos PIV previamente expostos à alta pressão gasosa (HGP) de 27,5 MPa por 120 min e após submetidos à congelação ou vitrificação. A avaliação da viabilidade foi mediante determinação das taxas de re-expansão e eclosão após criopreservação. Oócitos morfologicamente viáveis obtidos a partir de ovários de frigorífico foram maturados *in vitro* durante 24 h a 38,5 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ com umidade relativa do ar saturada e fecundados (dia 0) com sêmen criopreservado capacitado *in vitro*. Após 20 h, os presuntivos zigotos foram submetidos a cultivo *in vitro* em meio SOF condicionado a 38,5 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂, com umidade relativa do ar saturada. Os blastocistos (dia 7) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: expostos à HGP e congelados, PC; controle congelação, CC; expostos à HGP e vitrificados, PV; controle vitrificação, CV. Os embriões foram expostos ou não à HGP de 27,5 MPa por 120 min e em seguida colocados em cultivo por 120 min. Após esse período os blastocistos foram submetidos à congelação ou à vitrificação. A taxa de re-expansão dos blastocistos avaliada em 24 h do grupo CV (59,6%) foi maior que a dos embriões dos grupos CC (45,2%) e PC (46,3%) (P<0,05), mas não diferiu da taxa de re-expansão dos embriões do grupo PV (48,1%). As taxas de eclosão foram: PC, 21,5%; CC, 24,6%; PV, 35,3%; CV, 30,8%. Os blastocistos do grupo PV apresentaram maiores taxas de eclosão do que os embriões do grupo PC. Em conclusão, o tratamento com HGP não interferiu no desenvolvimento *in vitro* dos blastocistos que foram submetidos à congelação ou à vitrificação. Levando em consideração os blastocistos eclodidos sobre o total de re-expandidos, o tratamento com HGP incrementou a taxa de eclosão *in vitro* dos embriões que foram submetidos à vitrificação.

Palavras-Chave: alta pressão gasosa, criopreservação, produção *in vitro* de embriões, criotolerância.

ABSTRACT

In vitro bovine embryos (IVP) present differences when compared to those produced *in vivo*. This particularity reduces *in vitro* and *in vivo* survival rates after cryopreservation, limiting the commercial use of IVP embryos preservation. Several strategies have been proposed to increase viability and development of these cryopreserved embryos. Some studies use embryo exposure to sublethal stress prior to *in vitro* procedures, such as high hydrostatic pressure (HHP), which increases tolerance of these individuals to a new stressor, such as cryopreservation. Objectives of this experiment were to determine viability rates of bovine blastocysts produced *in vitro* previously exposed to high gaseous pressure (HGP) of 27.5 MPa for 120 minutes and after subjected to freezing or vitrification. Morphologically viable oocytes obtained from bovine ovaries were matured *in vitro* for 24 hours at 38.5°C in 5% CO₂ atmosphere with saturated air humidity and *in vitro* fertilized (day 0) with cryopreserved semen (inseminating dose 1x10⁶ / ml). After 20 hours, presumptive zygotes were cultured *in vitro* at 38.5°C in an atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ with saturated air humidity. Blastocysts obtained on day 7 were divided into 4 groups: exposed to HGP and frozen (FP); freezing control (FC); exposed to HGP and vitrified (VP); vitrification control (VC). These groups were exposed or not to 27.5 MPa HGP for 120 minutes then *in vitro* cultured for more 120 min. After this period, blastocysts were subjected to freezing or vitrification. Re-expansion rate was higher (P<0.05) for CV (59,6%) compared to CC (45,2%) and CV (46,3%), not differing from PV (48,1%). Blastocysts from group VP presented higher hatching rates than embryos from group FP (P<0.05) (35,3% vs. 21,5%, respectively). In conclusion, exposure of blastocysts to HGP before vitrification or conventional freezing did not interfered on *in vitro* embryo survival rates. However, considering hatched blastocysts over the total re-expanded, HGP increased hatching rates of vitrified embryos.

Keywords: high gaseous pressure, cryopreservation, sublethal stress, bovine blastocyst, *in vitro* embryo production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dados mundiais da produção <i>in vivo</i> e <i>in vitro de embriões</i> entre 1997 e 2014.....	17
Figura 2 -	Esquema dos eventos físicos observados nas células durante resfriamento.....	20
Figura 3 -	Complexos <i>Cumulus oophorus</i> selecionados para maturação <i>in vitro</i> (A) e Complexos <i>Cumulus oophorus</i> expandidos após maturação <i>in vitro</i> (B).....	28
Figura 4 -	Esquema do delineamento experimental.....	30
Figura 5 -	Blastocistos dos grupos PV (A) e CV (B) 72 h após vitrificação e aquecimento.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rotinas de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos realizadas durante o período do experimento.....	33
Tabela 2 -	Efeito da HGP sobre a viabilidade de blastocistos bovinos após criopreservação.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
mL	Mililitros
MPa	Megapascal
CC	Controle Congelação
PC	Pressão Congelação
CF	Controle Fresco
PV	Pressão Vitrificação
CV	Controle Vitrificação
FAVET	Faculdade de Medicina Veterinária
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
PIV	Produtos <i>in vitro</i> ou Produção <i>in vitro</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
g	Gramas
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
HGP	Alta pressão Gasosa (<i>High Gaseous Pressure</i>)
HHP	Alta pressão hidrostática (<i>High Hydrostatic Pressure</i>)
M	Molar
PBS	Tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
ROS	Agentes oxidantes
CO ₂	Dióxido de carbono gasoso
N ₂	Nitrogênio gasoso
O ₂	Oxigênio gasoso
vs.	<i>Versus</i>
X	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
	2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	15
	2.2 Criopreservação.....	17
	2.2.1 Histórico da criopreservação.....	18
	2.2.2 Congelação convencional.....	19
	2.2.3 Vitrificação.....	21
	2.3 Estresse celular e proteínas de estresse.....	23
	2.4 Alta pressão hidrostática (HHP) e alta pressão gasosa (HGP).....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
	3.1 Local de realização do experimento.....	27
	3.2 Meios e reagentes.....	27
	3.3 Obtenção dos complexos <i>cumulus oócitos</i> (COCs).....	27
	3.4 Maturação <i>in vitro</i>	27
	3.5 Fecundação e cultivo <i>in vitro</i>	28
	3.6 Delineamento experimental.....	29
	3.7 Tratamento com HGP e cultivo <i>in vitro</i>	30
	3.8 Vitricificação e aquecimento dos embriões.....	30
	3.9 Congelação e descongelação dos embriões.....	31
	3.10 Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS.....	32

4.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões	32
4.2	Efeito da HGP sobre a viabilidade de blastocistos descongelados ou aquecidos e cultivados <i>in vitro</i> por 72 h.....	33
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÃO.....	38
7	PERSPECTIVAS.....	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, inovações em biotecnologias reprodutivas têm disponibilizado novas ferramentas para tornar a produção animal mais eficiente. A produção *in vitro* (PIV) de embriões acelerou os processos de obtenção de novas gerações de animais, procurando maximizar o potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos. No Brasil, a PIV de embriões bovinos cresceu significativamente com um aumento histórico na produção, alcançando em 2016 o total de 346.817 unidades produzidas, representando 53% do total de embriões produzidos no mundo (656.931 embriões PIV) (BLONDIN, 2017).

Embriões PIV, no entanto, apresentam diferenças quando comparados aos produzidos *in vivo*, uma vez que as condições de PIV não podem simular perfeitamente o ambiente natural, o útero materno (LONERGAN e FAIR, 2008). O soro fetal bovino (SFB), entre outros constituintes, é um dos principais responsáveis para essas diferenças, resultando em alterações morfológicas (ABE *et al.*, 1999) e fisiológicas (KRISHER *et al.*, 1999) nesses embriões, como o aumento no número e tamanho de grânulos lipídicos (ABE *et al.*, 2004). Este aumento nos grânulos lipídicos modifica a qualidade do embrião (SATA *et al.*, 1999) e reduz as taxas de sobrevivência após a criopreservação (ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006). No âmbito da atividade comercial, esta complexidade na criopreservação e a subsequente redução da taxa de viabilidade após a descongelação impedem o aproveitamento de embriões produzidos em excesso, no momento em que não houver receptoras suficientes disponíveis para transferência embrionária (RUFINO *et al.*, 2006).

Várias estratégias vêm sendo propostas para aumentar a viabilidade de gametas e embriões criopreservados. Dentre elas, destacam-se estudos que utilizam a exposição dos embriões ao estresse subletal previamente aos procedimentos de criopreservação. Pribenszky *et al.* (2010) relataram que submeter previamente embriões mamíferos ao estresse induzido por alta pressão hidrostática (HHP, do inglês *high hydrostatic pressure*) aumenta a tolerância desses indivíduos a um novo fator estressante, no caso a criopreservação. Segundo Du *et al.* (2008a), as respostas celulares frente a diferentes estresses são similares, possibilitando um efeito protetor cruzado, permitindo a utilização desta propriedade na criopreservação. A HHP foi empregada previamente em células espermáticas bovinas (PRIBENSZKY *et al.*, 2007), em blastocistos murinos (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a) e blastocistos bovinos PIV (PRIBENSZKY *et al.*, 2005b;

PRIBENSZKY *et al.*, 2008), os quais apresentaram maior tolerância à criopreservação quando comparados aos grupos controle.

Baseada nessas observações, como uma alternativa à HHP, nossa equipe empregou a alta pressão gasosa (HGP, do inglês *high gaseous pressure*) em gametas e embriões mamíferos. Experimentos foram realizados com oócitos caninos (RODRIGUES *et al.*, 2012) em que foram obtidos os primeiros resultados do emprego de HGP como fator de indução de estresse sobre o gameta feminino. Collares (2014), trabalhando com embriões murinos, comprovou que a técnica é viável para a indução do estresse subletal sem impactos negativos no desenvolvimento e viabilidade dos embriões. Aplicada previamente à criopreservação, a HGP modificou positivamente a taxa de sobrevivência *in vitro* de blastocistos murinos criopreservados (BECKER, 2016).

Pelo fato de ainda não existirem informações do uso da HGP em embriões bovinos PIV, os objetivos do experimento aqui proposto são determinar as taxas de sobrevivência de blastocistos bovinos PIV expostos previamente à HGP e após submetidos à congelação convencional ou à vitrificação. A avaliação da viabilidade *in vitro* destes embriões será avaliada através da determinação das taxas de re-expansão e eclosão após descongelação ou aquecimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção *in vitro* de embriões

Desde o início do século, a PIV de embriões é uma biotecnologia da reprodução bem estabelecida e com propósitos variados em ciências básicas e aplicadas (BAVISTER, 2002). Uma dessas aplicações consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético e daquelas que não estão mais aptas a produzir descendentes pelas técnicas convencionais (BRACKETT e ZUELKE, 1993). Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos; não há a necessidade da utilização de hormônios para a obtenção dos oócitos, aumentando a vida reprodutiva das doadoras e diminuindo o intervalo de produção dos embriões (SANTL *et al.*, 1998). Esta tecnologia permite a utilização de diferentes touros para cada doadora, assim como viabiliza o emprego de sêmen sexado (BUENO e BELTRAN, 2008). Na pesquisa científica, a PIV de embriões está associada ao melhor entendimento do que acontece durante o desenvolvimento fisiológico de embriões *in vivo*, além de ser um ponto de partida para a execução de outras biotecnologias, como a transferência nuclear. Além disso, uma vez aplicada em uma espécie, pode servir como modelo para extrapolar as descobertas a outras espécies (LONERGAN e FAIR, 2008).

Biggers (2012) relata que as primeiras tentativas de produzir embriões fora do organismo da fêmea foram realizadas pelo embriologista vienense Samuel Leopold Schenk, em 1878. Trabalhando com oócitos de coelha e cobaia, Schenk observou que após a adição de sêmen no cultivo, ocorria a divisão celular das estruturas. Em 1934, Gregory Pincus e Ernst Vinzenz Enzmann também tentaram realizar a fecundação *in vitro* (FIV) em coelhos. Estes pesquisadores alegaram ter produzido a primeira prenhez bem sucedida através da FIV, mas análises posteriores sugeriram que a fecundação tecnicamente havia ocorrido *in vivo*, ou "no corpo", em vez de *in vitro*, "em vidro".

Em 1951, dois cientistas trabalhando de forma independente, Colin Russell Austin na Austrália e Min Chueh Chang nos Estados Unidos, demonstraram que os espermatozoides precisavam passar por transformações antes de desenvolverem a capacidade de fecundar o oócito (AUSTIN, 1951). Chang (1959) conseguiu aplicar a técnica de FIV em coelhas, com o nascimento de láparos vivos. Yanagimachi e Chang (1963) realizaram FIV com indução da capacitação espermática realizada *in vitro*,

fornecendo as informações necessárias para a execução da primeira FIV de oócito humano. No final dos anos 60, foi relatada a obtenção de embriões PIV de camundongos (WHITTINGHAM, 1968).

Iritani e Niwa (1977) reportaram a maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos, e alguns anos depois nasceu o primeiro terneiro produzido por FIV nos Estados Unidos, resultado este alcançado pelo trabalho desenvolvido na Faculdade de Veterinária da Universidade da Pennsylvania (BRACKETT *et al.*, 1982). No Canadá, pesquisadores coletaram, através de laparoscopia, oócitos bovinos ovulados *in vivo* (LAMBERT *et al.*, 1986). Os oócitos foram fecundados *in vitro* e cultivados em tubas uterinas de coelhas, método anteriormente demonstrado ser eficaz por pesquisadores irlandeses (SREENAN e SCANLON, 1968). Deste trabalho foram produzidos seis terneiros FIV. No Japão, pesquisadores reportaram o nascimento dos primeiros terneiros PIV obtidos de oócitos maturados *in vitro*, e estes embriões também foram cultivados em tubas uterinas de coelhas (HANADA *et al.*, 1986).

A PIV de embriões, pouco aplicada comercialmente na década de 90, apresentou um crescimento significativo ano após ano a partir da virada do século, alcançando mais de meio milhão de embriões PIV produzidos em 2014, o que representou 42% do total de embriões produzidos no mundo (Fig. 1). A razão para este crescimento se deve principalmente à melhora nos sistemas de cultivo (BLONDIN, 2017).

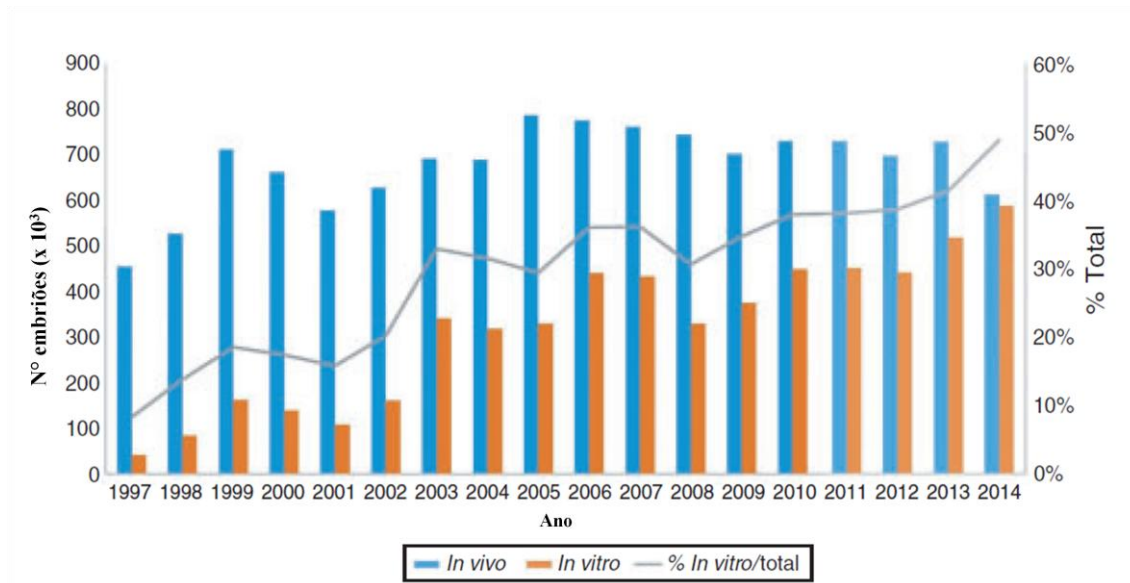


Figura 1. Dados da produção mundial de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* entre 1997 e 2014. Fonte: Blondin (2017), p. 33.

Em 2016, o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 346.817 unidades produzidas, 53% do total mundial (656.931 embriões PIV) (PERRY, 2016). Este destaque na PIV de embriões bovinos se deve, em grande parte, ao tamanho do rebanho (aproximadamente 218 milhões de bovinos segundo dados do IBGE em 2016) e às características do rebanho nacional, predominando a criação de raças zebuínas que apresentam em média um maior número de folículos puncionáveis e consequentemente maior número de oócitos quando comparados às fêmeas de raças taurinas (PONTES *et al.*, 2011; SEGERSON *et al.*, 1984).

2.2. Criopreservação

Criopreservação é o emprego de baixas temperaturas para preservar células e tecidos vivos estruturalmente intactos (PEGG, 2007), resultando na diminuição drástica dos processos metabólicos e tornando possível o armazenamento em longo prazo (ARMITAGE, 1987). As técnicas de criopreservação são rotineiramente usadas na preservação de oócitos, espermatozoides e embriões, tanto na produção animal quanto nas tecnologias de reprodução assistida em humanos (MANDAWALA *et al.*, 2016).

2.2.1 Histórico da criopreservação

De acordo com LUYET e GEHENIO (1940), os processos de criopreservação vêm sendo estudados e aprimorados há aproximadamente duzentos anos. Em 1938, Luyet e Hodapp obtiveram sucesso na vitrificação de espermatozoides de sapo, utilizando 2 Mol/L de sacarose em pequenas gotas. Para tanto, Luyet se fundamentou nas descobertas de Joseph Louis Gay-Lussac, que em 1804, enquanto subia em um balão de ar quente até 4.000 metros de altura, observou que as gotículas de água das nuvens não congelavam, apesar das temperaturas abaixo de zero, encontrando ali a essência da vitrificação. O volume não foi o único fator que ele observou ser importante, mas também a velocidade de resfriamento e a concentração das soluções. Para se evitar o congelamento, a temperatura deveria diminuir algumas centenas de graus por segundo, fazendo a substância transpor as temperaturas da zona de cristalização.

As propriedades crioprotetoras do glicerol foram descobertas por acaso por Polge *et al.* (1949), marcando o início da congelação convencional de sêmen de diferentes espécies.

No início dos anos 70, dois grupos de pesquisadores competiam para ver quem seria o primeiro a congelar embriões com sucesso. Um grupo incluía os cientistas Whittingham, Leibo e Mazur, e o outro grupo era composto por Wilmut e Polge. Whittingham já tinha conseguido parcialmente congelar embriões de camundongo a -70°C por 30 min usando polivinilpirrolidona, porém, não foi possível replicar esses experimentos (WHITTINGHAM, 1971 e WHITTINGHAM *et al.*, 1972). Em 1972, os dois grupos publicaram resultados que relataram a sobrevivência dos primeiros embriões murinos à congelação com uma técnica que incluía a adição de 1 Mol/L de DMSO. A presença do crioprotetor foi decisiva no sucesso do experimento. Os autores empregaram uma taxa de resfriamento de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até a temperatura de -70°C , o que ficou conhecido como curva lenta, pois exigia um aquecimento lento ($20^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Em 1973, nasceu o primeiro terneiro de embrião que foi congelado, descongelado e transferido para fêmea receptora (WILMUT e ROWSON, 1973). Alguns anos mais tarde, Willadsen *et al.* (1976) congelaram embriões ovinos, usando 1,5 Mol/L de DMSO em uma curva de resfriamento de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até a temperatura de -35°C , o que permitiu um descongelamento rápido ($300^{\circ}\text{C}/\text{min}$) dos embriões, que ficou conhecido

como a curva rápida de congelação. Desde então, gametas e embriões de diferentes espécies foram congelados com sucesso (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

2.2.2 Congelamento convencional

O verdadeiro desafio para as células durante o congelamento é a letalidade na transição da zona de temperatura entre -15 e -60°C, pelas quais as células passam em duas oportunidades: durante o resfriamento e durante o aquecimento. À temperatura de -196°C não há energia térmica suficiente, e conseqüentemente, não há reações químicas (McGEE e MARTIN, 1962).

Mazur (1984) explica que resfriando os embriões após serem expostos a um crioprotetor, o meio congelará espontaneamente quando atingir temperaturas entre -15°C e -20°C, levando à morte das células embrionárias. Para que este fenômeno não ocorra, é necessário realizar a indução da cristalização (*seeding*) da solução crioprotetora em temperaturas entre -5°C e -8°C. Este procedimento cria um diferencial entre o potencial químico dos espaços intra e extracelular, permitindo que a água seja atraída para fora das células embrionárias, formando cristais de gelo no espaço extracelular. O fenômeno permite uma adequada desidratação celular durante o resfriamento, proporcionando taxas eficientes de sobrevivência embrionária à criopreservação.

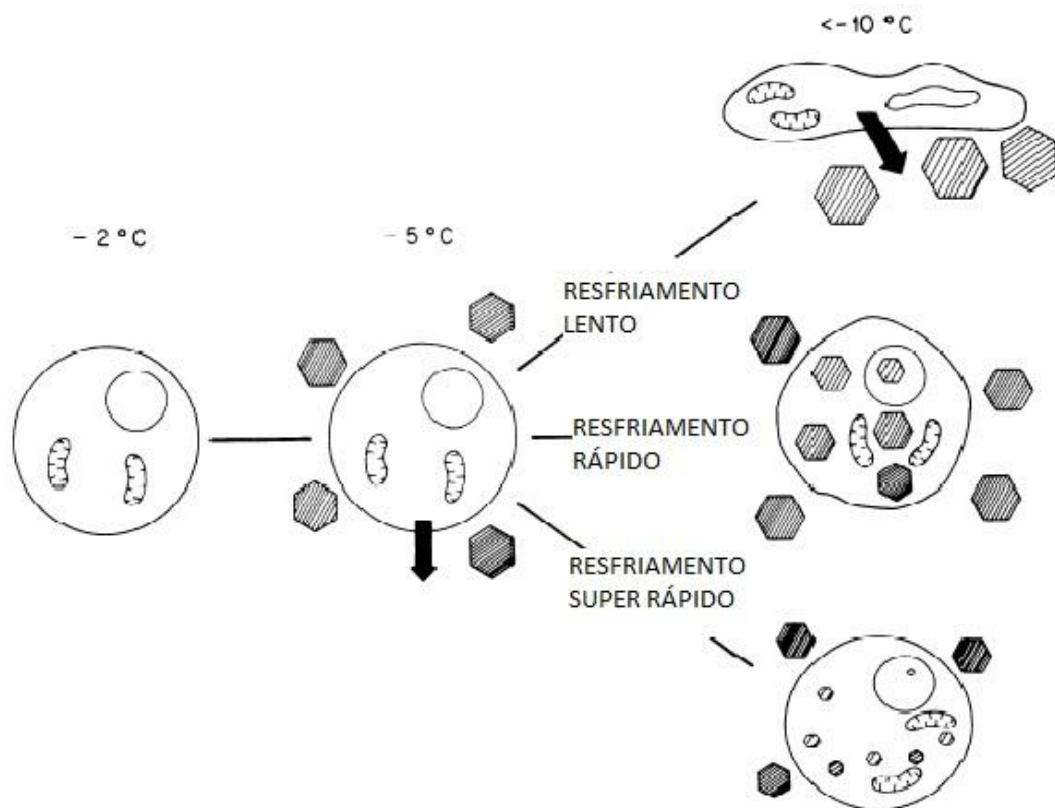


Figura 2. Esquema dos eventos físicos observados nas células durante o resfriamento. Hexágonos, cristais de gelo. Fonte: Mazur, 1984, p.126.

A técnica de congelamento consiste em expor gradualmente os gametas ou embriões a uma concentração relativamente baixa de crioprotetores, acondicioná-los em palhetas e resfriá-los até -5°C a -7°C , onde são mantidos por alguns minutos para equilibrar. Após o equilíbrio, é realizado a indução da cristalização mediante realização do "seeding", que consiste em tocar as palhetas com o auxílio de um objeto previamente resfriado a -196°C (usualmente uma pinça metálica ou um cotonete), desencadeando o congelamento extracelular, e depois resfriar lentamente, a aproximadamente 0,3 a $0,5^\circ\text{C}$ por minuto, até alcançar entre -30°C e -40°C . Ao final do resfriamento as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido para armazenamento (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

As lesões causadas por cristais de gelo podem ser evitadas através de uma congelamento muito rápida, com o uso de concentrações adequadas de crioprotetores (PEGG, 2007), os quais substituem a água intracelular e promovem uma redução na formação dos cristais de gelo (RALL e FAHY, 1985). Os crioprotetores são divididos em intracelulares ou permeáveis, como o DMSO, metanol, etanol, glicerol, etilenoglicol, propanodiol; e extracelulares ou não permeáveis como açúcares e

macromoléculas (sacarose, lactose, glicose, polivinilpirrolidona, rafinose, manitol, sorbitol, trealose) (NIEMANN, 1991). A eficiência dos crioprotetores pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, do tipo, da concentração e do tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação (FULLER e PAYNTER, 2004).

Desde meados dos anos oitenta do século passado, a equipe do laboratório conduz experimentos de criopreservação (congelamento e vitrificação) de embriões murinos e bovinos, que proporcionaram, além do avanço do conhecimento, a formação de recursos humanos com competência nesta área (REICHENBACH e RODRIGUES, 1988; LOPES, 1989; CHRISTMANN, 1989; HOETZEL, 1991; BERTOLINI, 1994; AGUIAR, 1996; SCHNEIDER, 1997; CORTÊS e RODRIGUES, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1998; BRAGA, 2000; KUMMER *et al.*, 1999; ASSAF e RODRIGUES, 2003; VIEIRA *et al.*, 2007; COSTA, 2007; LANGE, 2008; OSUNA, 2008, VILLAMIL, 2009; CHEUICHE, 2011; COLLARES, 2014 e BECKER, 2016).

2.2.3 Vitrificação

Vitrificação (do latim “*vitreum*”, do francês “*vitrier*”) é a transformação de uma solução líquida em um sólido amorfo vítreo (ARAV, 1992), devido a um significativo aumento na viscosidade da solução (FAHY *et al.*, 1984).

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 em que ocorrem as lesões da congelamento, mas, por outro lado, complica os efeitos osmóticos e introduz um maior risco de embriotoxicidade pela adição e remoção de crioprotetores mais concentrados (FAHY e WOWK, 2015).

Três são os fatores que devem ser levados em consideração em relação à vitrificação:

- a) Taxa de resfriamento e aquecimento: quando se utiliza nitrogênio líquido, as amostras são mergulhadas diretamente nesta solução, resultando em taxas de resfriamento que alcançam centenas a milhares de graus Celsius por segundo, dependendo do recipiente, do volume, da condutividade térmica, da composição da solução, entre outros fatores (YAVIN e ARAV, 2007). A

taxa de aquecimento também é uma importante variável, que afeta a sobrevivência (SEKI e MAZUR, 2012);

- b) Viscosidade: a viscosidade do meio no qual os embriões estão suspensos é definida pela concentração e comportamento do crioprotetor. A mistura de crioprotetores é comumente utilizada para aumentar a viscosidade, diminuir a chance de cristalização e diminuir a toxicidade individual (ARAV, 2014);
- c) Volume da amostra: quanto menor o volume, maior a probabilidade de vitrificação, pois permitem melhor troca de calor e maiores taxas de resfriamento (SHERMAN e PING, 1958; ARAV e ZERON, 1997).

Atualmente existem dois tipos de sistemas de vitrificação: sistemas abertos e fechados. Sistemas abertos permitem e sistemas fechados eliminam o contato direto entre o meio contendo a amostra e o nitrogênio líquido. Como o nitrogênio líquido pode conter agentes infecciosos, o contato direto poderia, teoricamente, significar uma possibilidade de infecção e transferência de patógenos. Consequentemente, do ponto de vista da transmissão de agentes infecciosos, os sistemas abertos são inseguros e os sistemas fechados são seguros (VAJTA *et al.*, 2015). Arav (2014) denomina os sistemas abertos como métodos de superfície, quando o tamanho da gota pode ser controlado, o que proporciona uma veloz taxa de resfriamento. Por outro lado, taxas rápidas de aquecimento são alcançadas pela exposição direta à solução de retirada dos crioprotetores, minimizando o risco de ocorrer lesão celular pela formação de cristais de gelo. Em sistemas fechados, a principal característica é que usualmente a velocidade de resfriamento é menor, o que aumenta o risco de citotoxicidade pela presença de altas concentrações de crioprotetores.

Experimentos relatam que embriões bovinos PIV vitrificados apresentaram melhores taxas de sobrevivência após o reaquecimento do que aqueles submetidos à congelação convencional (MUCCI *et al.*, 2006; CAAMANO *et al.*, 2016). Apesar desses relatos bem sucedidos, a aplicabilidade comercial da vitrificação ainda depende de técnicas com características de replicabilidade. A infinidade de protocolos de vitrificação existentes, utilizando tempos, temperaturas e crioprotetores diferentes, a ausência de padronização e a inconsistência de resultados entre os laboratórios dificulta a adoção generalizada da vitrificação como técnica de criopreservação para a aplicação comercial (DO *et al.*, 2016).

2.3. Estresse celular e proteínas de estresse

Ritossa (1962) descreveu que a exposição de células de glândula salivar de *Drosophila busckii* ao calor determinava uma alteração no padrão de espessamento cromossomal deste inseto. A alteração na temperatura ativou um conjunto de genes que desencadearam a síntese de um grupo específico de proteínas, as proteínas de choque térmico, do inglês *heat shock protein* (HSP) ou proteínas de estresse (RITOSSA, 1962).

De Maio (2011) esclareceu que em condições fisiológicas, as células de um organismo interagem uma com as outras para sincronizar a sua atividade metabólica, a expressão gênica e outros processos celulares básicos, mantendo a homeostase. Quando as células são expostas às mudanças ambientais, como falta de nutrientes ou algum agente estressor externo, elas se comunicam para ajustar seu metabolismo para a nova condição. Portanto, as células estressadas liberam sinais para alertar o resto do organismo de uma situação potencialmente prejudicial. Alguns dos sinais de estresse liberados pelas células correspondem às HSP, que são expressas em resposta ao agente estressor. E, de acordo com De Maio, o mecanismo envolvido na liberação das HSP ainda não é totalmente esclarecido.

De acordo com KULTZ (2003) os genes que expressam as proteínas HSP são conservados em todas as células; as proteínas HSP participam de funções celulares como estabilização e reparo de outras proteínas, DNA, cromatina e citoesqueleto, controle do ciclo celular, regulação redox, metabolismo energético, metabolismo de lipídeos e eliminação de proteínas danificadas. Elas são divididas em diferentes famílias de acordo com peso molecular (hsp100, hsp90, hsp70, hsp60, hsp40, e pequenas HSP – SANTORO, 2000). A grande maioria das HSP incluem proteínas normalmente presentes e, em grande parte, essenciais para a função celular (SCHLESINGER, 1990).

Os agentes estressores são efeitos do conjunto de fatores que pode alterar o ambiente onde a célula se encontra, como pH, balanço hidro-eletrolítico, presença de agentes oxidativos, irradiação, luz ou inapropriada nutrição (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). Quando a ação do agente estressor melhora a função celular, o estresse pode ser considerado um impacto positivo (SELYE, 1975). Por outro lado, se o nível de estresse está acima do limite de tolerância, a morte celular programada ou necrose podem ocorrer (HANSEN, 2007). Segundo Mattson (2008), um estresse subletal ativa uma moderada resposta celular, a qual confere resistência ou tolerância a um outro estresse mais severo que poderia causar disfunção celular, patologias e morte. Esta teoria se

ajusta ao conceito geral conhecido como “*hormesis*”, que é caracterizado por uma resposta bifásica ao estresse. Embora as fontes estressoras sejam diferentes, as respostas frente ao estresse podem ser similares, sugerindo uma possibilidade de proteção cruzada (DU *et al.*, 2008). Wouters *et al.* (1999) sugeriram que essas proteínas de estresse apresentam um papel de proteção na criopreservação. Estressores ambientais do desenvolvimento embrionário podem induzir a ativação das HSP nas células embrionárias, as quais protegem o embrião de danos celulares e aumentam a taxa de sobrevivência durante um estresse subsequente (LUFT e DIX, 1999; DRIVER e KHATIB, 2013).

A complexidade da evolução dos seres vivos exigiu que as células desenvolvessem uma vasta gama de mecanismos para regular a concentração de proteínas e outros constituintes celulares. O mecanismo proteostático é caracterizado pela presença das chaperonas que auxiliam outras proteínas na sua conformação e as proteases que removem as proteínas que não se moldaram corretamente (HARTL *et al.*, 2011). Quando há um aumento nas concentrações de proteínas mal formadas, a resposta ao choque térmico (do inglês “*heat shock response*” HSR) é ativada, aumentando a expressão dos genes das proteínas de estresse, que estão presentes em todos compartimentos subcelulares das células eucarióticas (TRINKLEIN *et al.*, 2004; HOOGENRAAD, 2017). Esta alteração na expressão gênica pode ser mensurada através da quantificação de mRNA, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR), procedimento usual para determinação da expressão gênica (ARYA *et al.*, 2005).

Em espermatozoides de javali, a exposição à HHP aumentou a produção de proteínas que possuem papel importante no processo de fecundação. Foram identificados o complexo redutase ubiquinol-citocromo C, perilipina e o precursor carboidrato-proteína ligante AWN em concentrações maiores que as amostras não tratadas com a pressão (HUANG *et al.*, 2009).

A HHP induziu alterações transcricionais em blastocistos de camundongos, incluindo a supra-regulação dos genes *Azin1*, *Gas5*, *Gadd45g* e *Sod2* logo após o tratamento e do gene *Gadd45g* após 120 min. Neste estudo a HHP ativou genes de crescimento de curto e longo prazo e genes relacionados ao estresse oxidativo (BOCK *et al.*, 2010). Bock *et al.* (2016) observaram um efeito significativo em embriões de 4 células de camundongo derivados de oócitos tratados com HHP, revelando inúmeros genes envolvidos na síntese de proteínas que foram infra-regulados, sugerindo que a

regulação da tradução tem um papel importante na tolerância ao estresse induzida pela HHP.

Em blastocistos bovinos, Siqueira *et al.* (2011) observaram a supra-regulação de genes relacionados a mecanismos antioxidantes (*Sod2* e *GPX4*), síntese de lipídios (*Erg25*) e genes relacionados à tolerância ao estresse (*Hsp70*). Ainda com blastocistos bovinos, a HHP de 40 e 60 MPa promoveu a competência embrionária através da infra-regulação de genes associados à morte celular e apoptose. A alteração na expressão de genes também foi influenciada pela duração do período pós tratamento, sendo que em 1 hora pós HHP houve mudança na expressão dos genes relacionados a apoptose e morte celular e nos embriões com 2 h de repouso após HHP houve mudança na expressão dos genes relacionados a conformação de proteínas e ciclo celular (JIANG *et al.*, 2016).

2.4. Alta pressão hidrostática (HHP) e alta pressão gasosa (HGP)

A tecnologia da alta pressão hidrostática (HHP, do inglês "*high hydrostatic pressure*") para preservar a qualidade de produtos alimentícios remonta ao início de 1900, com observações sobre a vida útil estendida e a qualidade do leite e esterilização de frutos (HITE, 1899; HITE *et al.*, 1914). Estudos recentes indicam que o estresse provocado por HHP pode induzir uma adaptação e aumento na tolerância em procedimentos *in vitro* envolvendo gametas e embriões mamíferos (PRIBENSZKY e Vajta, 2011).

De acordo com observações realizadas, a sobrevivência após descongelação (desenvolvimento contínuo *in vitro*) de blastocistos de camundongos congelados (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a), blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (PRIBENSZKY *et al.* 2005b, 2008a), oócitos de suínos (DU *et al.* 2008, PRIBENSZKY *et al.* 2008b) e espermatozóides de touro e javali (PRIBENSZKY *et al.* 2007 e PRIBENSZKY *et al.* 2006) foi significativamente maior quando um protocolo otimizado de HHP foi aplicado antes do processo de congelamento ou vitrificação. O estresse subletal de HHP mostrou induzir mudanças no perfil protéico de espermatozoides ou oócitos (HUANG *et al.* 2009 e PRIBENSZKY *et al.* 2008b). Jiang *et al.* (2016) analisaram os efeitos da HHP no perfil transcricional de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, sugerindo que o tratamento com a HHP promoveu a competência de desenvolvimento dos embriões através de uma modesta reprogramação transcricional.

Romek *et al.* (2016) avaliaram os níveis de agentes oxidantes (ROS) em embriões suínos em diferentes estágios de desenvolvimento, concluindo que blastocistos tratados previamente com HHP apresentaram menores níveis de ROS. De forma modificada, Gu *et al.* (2017) aplicaram HHP em oócitos humanos antes da vitrificação, o que aumentou a competência de desenvolvimento destes gametas maturados *in vitro*, não prejudicando o fuso meiótico, zona pelúcida e DNA. A HHP também foi utilizada em embriões de peixe zebra antes de serem resfriados a 0°C, os quais obtiveram maior taxa de sobrevivência, melhor taxa de desenvolvimento e maior proporção de morfologia normal no desenvolvimento (FARAGÓ *et al.*, 2017).

A alta pressão gasosa, do inglês *high gaseous pressure* (HGP), de maneira análoga à HHP, é um agente estressor ambiental e induz a adaptação das células, tornando-as mais resistentes, sendo aplicável em embriões mamíferos. Nossa equipe adaptou uma câmara gasosa capaz de suportar 6000 PSI (41,37 MPa) empregando argônio gasoso. Utilizando esse equipamento, oócitos caninos foram expostos à HGP de 7,7 MPa por 1 hora, como um indutor de estresse antes de serem maturados *in vitro*. Os resultados revelaram não haver alteração nas taxas de maturação dos oócitos tratados com HGP quando comparados ao grupo não tratado (RODRIGUES *et al.*, 2012). Collares (2014) submeteu embriões murinos no estágio de 8 células por 2 e 4 h à HGP de 15,7 MPa, o que não afetou o desenvolvimento *in vitro* e incrementou as taxas de re-expansão após o descongelamento. Em experimento posterior, Becker (2016) expôs blastocistos murinos a distintas pressões e tempos de exposição, em quatro grupos experimentais: (a) 20,7 MPa por 2 h (P20.T2); (b) 20,7 MPa por 4 h (P20.T4); (c) 27,6 MPa por 2 h (P27.T2); e (d) 34,5 MPa por 2 h (P34.T2), pareando todos os grupos com controles não expostos à HGP. A taxa de eclosão do Grupo P34.T2 foi significativamente maior do que a dos controles criopreservados não expostos à HGP (70,2% vs. 58,6%, $p < 0,05$); e neste estudo foi provado que a HGP é aplicável como um agente estressor subletal sem perda da viabilidade embrionária, e que o uso da HGP de 34,5 MPa por 2 h prévio à criopreservação modificou positivamente a taxa de sobrevivência *in vitro* destes embriões.

Os objetivos do experimento aqui proposto são determinar as taxas de sobrevivência de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* expostos previamente à HGP e após submetidos à vitrificação ou congelação convencional. A avaliação da viabilidade *in vitro* destes embriões será avaliada através da determinação das taxas de re-expansão e eclosão após descongelação ou aquecimento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), entre agosto de 2017 até março de 2018.

3.2. Meios e reagentes

Quando não mencionados, foram utilizados reagentes e produtos Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) testados para embriões ou culturas celulares. Todos os meios foram preparados com água purificada pelo sistema Direct-Q3/Milli-Q synthesis (Millipore; Bedford, EUA).

3.3. Obtenção dos complexos cumulus oócitos (COCs)

Ovários bovinos foram coletados no frigorífico FrigoLéo (São Leopoldo-RS) e transportados até o laboratório em recipiente térmico contendo PBS (8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L KH₂PO₄, e 1,15 g/L Na₂HPO₄) aquecido à 30°C. Os COCs foram recuperados mediante punção de folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm, com auxílio de uma agulha de 18G, acoplada a uma seringa descartável de 5 mL. O líquido folicular foi transferido para tubos de 50 mL e decantado. O precipitado foi depositado em placas de Petri de 90 mm onde se realizou a procura dos COCs sob estereomicroscópio. Os COCs que apresentavam *Cumulus oophorus* compacto, com no mínimo 3 camadas de células e citoplasma homogêneo foram transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo meio de maturação onde foram selecionados para maturação.

3.4. Maturação *In Vitro*

Os COCs selecionados foram lavados e maturados em gotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral, meio este constituído pelo TCM-199 (Sigma, EUA),

suplementado com 2,4 mM de NaHCO₃, 2,2 mg/mL de piruvato de sódio, 50 µM de cisteamina, 1% de gentamicina, 5 µg/mL de FSH suíno (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 5 µg/mL de LH (Lutropin; Bioniche Animal Health), 1 µg/ml de Estradiol (Sigma), 100ng/µl de fator epidermal de crescimento (eGF) e 10% de SFB (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e incubados a 38,5°C por 24 h em estufa com atmosfera de 5% CO₂ e umidade relativa do ar saturada.

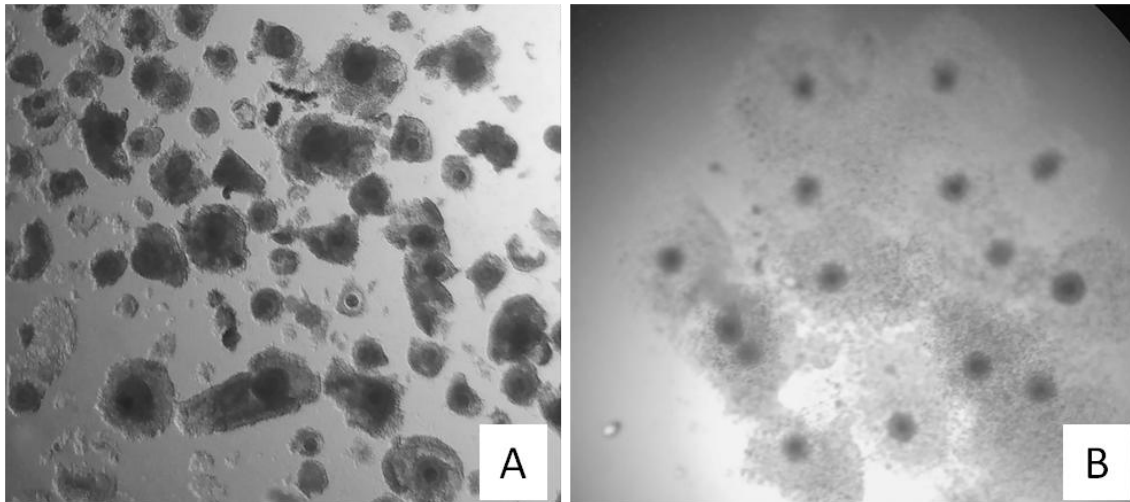


Figura 3. A, complexos cumulus oócitos selecionados para maturação *in vitro*; B, complexos cumulus oócitos expandidos após maturação *in vitro*.

3.5. Fecundação e Cultivo *in vitro*

Após a MIV, os CCOs foram lavados em três gotas de meio FERT-TALP (PARRISH *et al.*, 1988). Uma hora antes do final do período de maturação, uma palheta de sêmen (de touro de reconhecida fertilidade *in vitro* e sanidade) foi descongelada em banho-maria a 37°C por 50 s. O procedimento de segregação dos espermatozoides utilizado foi o gradiente Percoll a 45 e 90% (v/v) que, juntamente com o sêmen, foi centrifugado a 1400G durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, o pellet obtido em 0,5 mL de FERT-TALP e centrifugado a 700G durante 2 min. O pellet final foi então ressuspenso em FERT-TALP e determinou-se a concentração de espermatozoides, calculando-se uma dose inseminante de 1×10^6 espermatozoides/mL para cada gota de FERT-TALP contendo 15 CCOs. Após a FIV, as estruturas foram mantidas em incubadora entre 18 e 20 h nas mesmas condições atmosféricas da MIV. O dia da FIV

foi considerado dia 0 (D0) para determinação dos estádios de desenvolvimento embrionário.

Ao final do período de FIV, foi realizada a remoção das células do *Cumulus oophorus*, mediante pipetagem sucessiva em pipetador automático. As estruturas recuperadas foram lavadas em três gotas de meio SOF (suplementado com 0,72 mM de Piruvato de Na, 0,2mM de glutamina, aminoácidos e 1% de SFB) e transferidas para gotas de 100µL do mesmo meio sob óleo mineral e mantidas a 38,5°C em atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ em estufa especial. Ao final de 96 h (D5) e de 144 h (D7) de cultivo, realizou-se a avaliação da clivagem e do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto, respectivamente.

3.6. Delineamento experimental

Os embriões em estágio de blastocisto de graus 1 e 2 foram selecionados no D7 e divididos aleatoriamente em 3 grupos:

1) Controle da PIV de embriões - Controle Fresco (CF): 166 blastocistos foram mantidos em cultivo *in vitro* em meio SOF à 38,5°C em atmosfera com umidade do ar saturada contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. Após 72 h de cultivo foi avaliada a taxa de eclosão;

2) Controles da criopreservação: os blastocistos foram subdivididos em grupos controle: controle da Vitriificação (CV) (n=104) e controle da Congelação (CC) (n=126), os quais foram submetidos às técnicas de vitrificação ou de congelação convencional respectivamente sem o tratamento prévio com HGP;

3) Tratamento com HGP: primeiramente, os blastocistos, foram expostos à HGP de 27,5 MPa durante 2 h, após, cultivados *in vitro*, por outras 2 h em meio SOF à 38,5°C em atmosfera com umidade do ar saturada contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. Por fim, os blastocistos foram subdivididos de forma aleatória em 2 grupos: vitrificação (PV) (n=133) ou congelação (PC) (n=121). Os embriões foram aquecidos ou descongelados após um mínimo de 48 h de armazenagem em nitrogênio líquido. As taxas de re-expansão e de eclosão foram determinadas às 24 e às 72 h de cultivo suplementar em meio SOF, respectivamente.

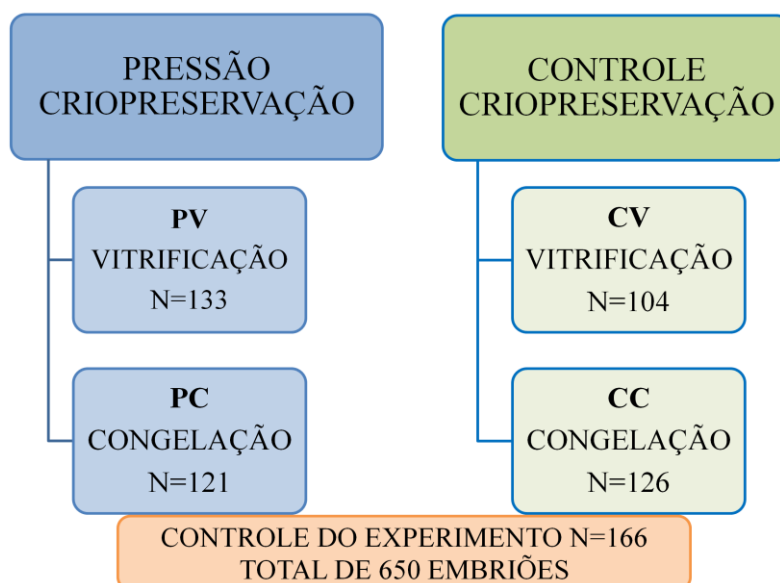


Figura 4. Esquema do delineamento experimental.

3.7. Tratamento com HGP e cultivo *in vitro*

Os embriões dos grupos experimentais PV e PC foram dispostos em criotubos contendo 750 μ L de PBS + 0,1% PVP. Em seguida, os criotubos foram transferidos para a câmara de pressão e submetidos à 27,5 MPa (pressão gasosa) por 2 h. Após o tempo de exposição à HGP, a despressurização da câmara foi realizada lentamente com redução de aproximadamente 2,5 MPa por minuto, com intervalos de aproximadamente 2 min a cada 5,5 MPa.

Após a despressurização, os criotubos foram retirados da câmara de pressão, o meio contendo os embriões foi transferido para placas de Petri, onde foi realizada a identificação dos embriões. Em seguida, os blastocistos foram transferidos para placas de Petri que continham gotas de meio SOF sob óleo mineral e mantidos em cultivo (38,5°C em atmosfera com umidade do ar saturada contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂) por 2 h. Após esse período, os embriões foram vitrificados ou submetidos à curva de congelamento.

3.8. Vitrificação e reaquecimento dos embriões

O procedimento de vitrificação foi baseado na tecnologia OPS (do inglês "*open pulled straw*") originalmente descrita por Vajta *et al.* (1999a) e posteriormente

modificado por Vieira *et al.* (2007). Foram utilizadas capilares de vidro aquecidos e estirados manualmente para confecção de micropipetas de vidro (GMP). Os blastocistos PV e CV, em grupos de até três embriões, foram expostos durante 1 minuto à solução de vitrificação 1 aquecida (PBS + 0,4% BSA + 3,2 M etileno glicol), depois expostos por até 5 segundos à solução de vitrificação 2 (PBS + 0,4% BSA + 9,6 M etileno glicol + 0,1% PVA + 0,5 M sacarose), imediatamente aspirados por capilaridade nas GMP, imersos em nitrogênio líquido e armazenados por pelo menos 48 h até o aquecimento.

Para o aquecimento, as GMP foram retiradas uma a uma do nitrogênio líquido para em seguida seu conteúdo ser depositado em solução de aquecimento (PBS + BSA 0,4% + sacarose 0,25 M) a 37°C com auxílio de uma seringa de 1 mL acoplada à extremidade oposta à localização dos blastocistos. Os embriões permaneceram neste meio por 3 min, após foram lavados em PBS e imediatamente depois transferidos para meio SOF, onde foram cultivados. Após 24 e 72 h em cultivo, foram avaliadas as taxas de re-expansão e de eclosão respectivamente.

3.9. Congelação e descongelção dos embriões

Os blastocistos do grupo PC e CC foram expostos por 5 min à solução crioprotetora (PBS + 0,4% BSA + 1,6M etileno glicol) e após envasados em grupos de até 5 embriões em palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram então dispostas no equipamento TK 2000, para realização da curva rápida de resfriamento de 0,3°C/min até alcançar -35°C, sendo após as palhetas imersas em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas até o momento da descongelção.

A descongelção das palhetas foi realizada em banho-maria a 37°C por 30 s, sendo o seu conteúdo diluído em 3 mL de solução de PBS + 0,4% BSA + 0,25M de sacarose. Após 3 min de exposição nesta solução, os embriões foram lavados em PBS e imediatamente depois transferidos para meio SOF, onde foram cultivados, sob as mesmas condições do item 3.8 (ver acima). Após 24 e 72 h em cultivo, foram avaliadas as taxas de re-expansão e de eclosão respectivamente.

3.10. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada através do programa SPSS 18.0.3 (IBM Analytics, NY). As replicações foram analisadas através de correlação linear de Pearson. As taxas de re-expansão e eclosão foram comparadas pelo teste χ^2 utilizando-se a tabela de contingência com nível de significância de 0,5%.

4 RESULTADOS

4.1. Produção *in vitro* dos embriões bovinos

Durante o experimento foram realizadas 11 replicações para a produção *in vitro* de embriões bovinos. Foram coletados 879 ovários bovinos no abatedouro FrigoLéo, os quais apresentaram peso total de 7.201 gramas. Destes ovários, foram aspirados 7.181 estruturas totais, representando 0,99 estruturas recuperadas por grama de ovário. Das estruturas aspiradas, 3.306 oócitos foram submetidos à maturação *in vitro*.

A análise estatística revelou uma correlação negativa ($p < 0,05$) entre a quantidade de ovários, oócitos totais e oócitos em MIV com a taxa de clivagem (77%, 2.468/3.206). Por outro lado, a taxa de blastocistos não apresentou correlação com a quantidade de ovários de cada replicação (23%, 720/3.206). Os dados das replicações da produção de embriões estão contidos na tabela 1.

O controle da produção *in vitro* de embriões foi avaliado através da taxa de eclosão de blastocistos (controle fresco, CF) que não foram expostos à HGP nem submetidos aos processos de criopreservação. A taxa de eclosão destes embriões foi de 74% (123/166).

Tabela 1. Rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos durante o período do experimento.

REPETIÇÃO	OVÁRIOS	PESO	OÓCITOS	OÓCITOS	ESTRUTURAS	CLIVAGEM	BLASTOCISTOS		
	N	(g)	N	EM MIV	EM CIV	D5	(%)	D7	(%)
1	62	497	455	222	220	191	86.8	56	25.5
2	65	480	421	200	230	180	78.3	77	33.5
3	113	788	590	294	292	211	72.3	35	12.0
4	77	568	635	380	373	328	87.9	41	11.0
5	30	185	335	210	168	147	87.5	39	23.2
6	24	171.5	180	114	160	120	75.0	40	25.0
7	85	642	768	420	406	320	78.8	151	37.2
8	110	874	922	450	402	295	73.4	50	12.4
9	98	1033	955	360	445	352	79.1	123	27.6
10	135	1390	1198	300	300	174	58.0	48	16.0
11	80	573	722	356	210	150	71.4	60	28.6
Total	879	7201	7181	3306	3206	2468	-	720	-
Média	79.9	654.7	652.8	300.5	291.5	224.4	77.1	65.5	23
Mediana	80	573	635	300	292	191	78	50	25
Desvio Padrão	34.0	356.9	300.1	104.3	101.8	83.3	8.8	37.8	8.9

4.2. Efeito da HGP sobre a viabilidade de blastocistos bovinos após descongelamento ou aquecimento e cultivo *in vitro* por 72h

As taxas de viabilidade *in vitro* dos blastocistos criopreservados (submetidos a procedimentos de congelação ou vitrificação) que foram ou não expostos previamente à tratamento com HGP foram avaliadas. Após 24 h de cultivo *in vitro*, os blastocistos do grupo CV (59,6%, 62/104) apresentaram maior taxa de re-expansão ($P < 0,05$) quando comparados aos grupos PC (46,3%, 56/121) e CC (45,2%, 57/126), não diferindo ($P > 0,05$) do grupo PV (48,1%, 64/133) (tabela 2).

Tabela 2. Efeito da HGP sobre a viabilidade de blastocistos bovinos após criopreservação

Grupos Experimentais	N	Re-expansão 24 h (%)	Eclosão 72 h (%)	Taxa de eclosão sobre re-expandidos %
CC (Controle Congelação)	126	57 (45,2) ^a	31 (24,6) ^{a, b}	54,4 ^a
PC (Pressão Congelação)	121	56 (46,3) ^a	26 (21,5) ^a	46,4 ^a
CV (Controle Vitrificação)	104	62 (59,6) ^b	32 (30,8) ^{a, b}	51,6 ^a
PV (Pressão Vitrificação)	133	64 (48,1) ^{a, b}	47 (35,4) ^b	73,4 ^b
CF (Controle Fresco)	166	-	123 (74,0) ^c	-

Letras diferentes nas colunas de cada grupo experimental são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

Após 72 h de cultivo *in vitro*, a taxa de eclosão dos blastocistos do grupo pv (35,4% 47/133) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a dos blastocistos do grupo PC (21,5%, 26/121). Considerando a taxa de eclosão sobre o número total de blastocistos re-expandidos, observou-se uma maior taxa de eclosão ($P < 0,05$) dos blastocistos do grupo PV (73,4%, 47/64) em relação aos grupos CV (51,6%, 32/62), CC (54,4%, 31/57) e PC (46,4%, 31/57) (tabela 2).

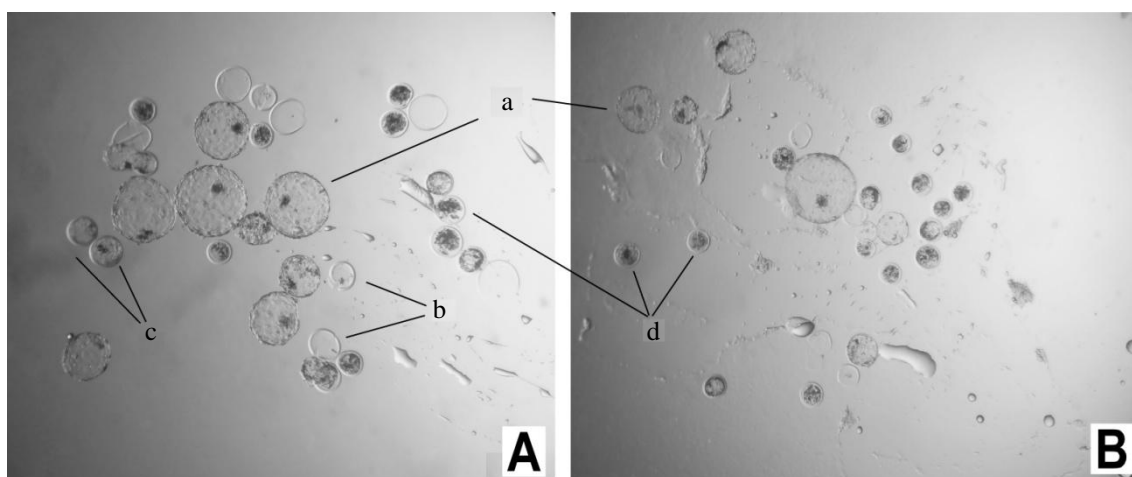


Figura 5. Blastocistos dos grupos PV (A) e CV (B) 72 h após vitrificação e reaquecimento. a, blastocistos eclodidos; b, zonas pelúcidas; c, blastocistos expandidos; d, embriões degenerados.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, a biotécnica de PIV de embriões bovinos é amplamente utilizada e estabelecida em ciências básicas e aplicadas. Em vista disso, há uma vasta variedade de protocolos e procedimentos, o que torna difícil a comparação da eficiência da PIV entre os laboratórios. Em nosso experimento, obtivemos uma taxa média de blastocistos de 23% (720/3.206), resultados que se assemelham a outros estudos que obtiveram taxas de blastocistos no D7 de 28,3% (ENRIGHT *et al.* 2000); 27% (RIZOS *et al.*, 2003), 31% (NEDAMBALE *et al.*, 2004), 22,4% (BOTIGELLI *et al.*, 2018). Não houve correlação entre a produção de blastocistos e as replicações. Entretanto, houve correlação negativa entre a quantidade de ovários, de oócitos totais e de oócitos em MIV em relação à taxa de clivagem. Isso se deve provavelmente ao maior tempo e maior manipulação necessária das estruturas em uma replicação com maior número de ovários, o que poderia prejudicar as taxas de desenvolvimento embrionário. Além disso, é importante a consideração da origem oocitária na efetividade da PIV de embriões bovinos (MERTON *et al.*, 2003). No presente trabalho, os oócitos foram obtidos de ovários de abatedouro, sem conhecimento do status reprodutivo e nutricional dessas fêmeas, fatores que poderiam afetar a qualidade dos oócitos e a efetividade da PIV.

Neste trabalho descrevemos o emprego da HGP como um agente indutor de estresse subletal no possível incremento da viabilidade *in vitro* de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* que foram submetidos à vitrificação ou à congelação convencional. A câmara de alta pressão gasosa revelou ser de simples utilização, sendo facilmente aplicável previamente nas rotinas de criopreservação de embriões. A exposição dos embriões à HGP de 27,5 MPa por 2 h não apresentou efeitos deletérios sobre a taxa de re-expansão e eclosão de blastocistos cultivados *in vitro* após a criopreservação, comparados com os embriões que não foram expostos à HGP. De forma semelhante, em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, foram avaliados os efeitos da HGP sobre a viabilidade *in vitro* de embriões murinos. Os resultados relatados por Collares (2014), Becker (2016) e os obtidos em nosso experimento, quando comparados os grupos tratados com seus respectivos controles, não revelaram diferenças na capacidade dos embriões em eclodirem, indicando que a HGP não exerce efeitos deletérios sobre a continuidade do desenvolvimento *in vitro*. Pribenszky *et al.* (2005a), expondo blastocistos murinos à HHP (90 MPa por 1 s ou 30 MPa por 120 min) previamente à

criopreservação, obtiveram taxas de eclosão dos embriões estressados pela HHP equivalentes às dos controles, resultado similar ao observado em nossos estudos.

Diversamente, Pribenszky *et al.* (2005b, 2008a) utilizando a HHP como tratamento prévio à criopreservação de blastocistos bovinos PIV, relataram maiores taxas de re-expansão e eclosão após o aquecimento ou descongelamento. Uma vez que as taxas de re-expansão e eclosão de blastocistos bovinos criopreservados são parâmetros utilizados como critério de sobrevivência e estimativa do potencial de desenvolvimento do embrião (Aksu *et al.*, 2012), optamos por analisar também o parâmetro taxa de eclosão sobre o número total de blastocistos re-expandidos de cada grupo. A partir desta análise, os blastocistos do grupo PV revelaram taxa de eclosão significativamente maior ($P < 0,05$) que a observada nos grupos CV, PC e CC, sugerindo que os blastocistos que sobrevivem à HGP e ao processo de vitrificação apresentam maior resistência no desenvolvimento do que os blastocistos somente vitrificados.

Comparando-se somente o tipo de criopreservação utilizado, independentemente da exposição à HGP, os embriões do grupo CV revelaram maior taxa de re-expansão em relação aos embriões dos grupos PC e CC. Os blastocistos do grupo PV apresentaram maior taxa de eclosão em relação aos do grupo PC. Dessa maneira, nosso estudo sugere que a vitrificação induz melhores resultados de viabilidade embrionária *in vitro* após o aquecimento quando comparada com a congelamento convencional. No entanto, a técnica de vitrificação ainda carece de aprimoramento para que seja possível sua aplicabilidade comercial. Diferentes trabalhos debatem a eficiência dos métodos de criopreservação de embriões PIV. O congelamento convencional é caracterizado por formar cristais de gelo no interior da célula (MAZUR, 1970; VAJTA e NAGY, 2006), o que eventualmente leva a danos celulares e à morte embrionária. A vitrificação envolve a eliminação da formação de gelo intracelular e a formação de uma fase vítrea a -196°C , utilizando altas concentrações de crioprotetores e ultra-rápida velocidade de resfriamento, como demonstrado em embriões bovinos por Anzar *et al.* (2014). Os dados obtidos por Nedambale *et al.*, (2004) e Mucci *et al.*, (2006) cancelam os nossos resultados, pois a vitrificação resultou em maior sobrevivência do que o congelamento convencional de embriões bovinos, mesmo quando aplicadas diferentes técnicas de vitrificação, abertas ou fechadas (Yu *et al.*, 2010). Por outro lado, Stinshoff *et al.* (2011) não observaram diferenças na taxa de eclosão de blastocistos vitrificados ou congelados. Em outro estudo, as taxas de prenhez de embriões bovinos criopreservados através de vitrificação ou congelamento convencional foram semelhantes (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*,

1997). Nossos dados sinalizam uma superioridade da técnica de vitrificação em preservar a viabilidade de embriões PIV, assim como a vantagem da indução de estresse subletal através da exposição à HGP, proporcionando uma maior resistência aos processos de criopreservação.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o tratamento com HGP não interferiu na competência de desenvolvimento *in vitro* dos blastocistos tratados que foram submetidos à vitrificação ou à congelação. Levando em consideração os blastocistos eclodidos sobre o total de re-expandidos, o tratamento com HGP incrementou a competência de desenvolvimento *in vitro* dos embriões que foram submetidos à vitrificação. São necessários mais estudos para melhorar os parâmetros de tratamento, bem como para estudar os fundamentos biofísicos e biológicos moleculares que podem esclarecer o comportamento das células embrionárias face à criopreservação.

7 PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se testar diferentes medidas de pressão, a fim de identificar o melhor nível de estresse subletal que levaria à uma taxa de sobrevivência similar ou maior à dos grupos não tratados com HGP.

Análises de expressão gênica dos grupos tratados com HGP devem ser realizadas com o intuito de compreender os mecanismos que estão envolvidos na resistência embrionária aos estresses subsequentes. Inicialmente os genes a serem avaliados serão CASP7, NET1, HSPH1, HSPB8, BAX, BCL-2, pela importância no processo apoptótico e proliferação celular.

Além disso, espera-se empregar a HGP em diferentes estádios de desenvolvimento de embriões bovinos PIV, a fim de encontrar o mais conveniente para aplicar este tratamento em um sistema comercial, como uma alternativa de tornar estes embriões mais resistentes à criopreservação.

A contagem do número total de células deve também ser realizada após a exposição à HGP e após criopreservação, uma vez que o desenvolvimento embrionário e fetal normal é dependente do número total de células.

Embora a vitrificação resulte em melhores resultados de viabilidade embrionária *in vitro* após o aquecimento quando comparada com a congelação convencional; a adoção da vitrificação como método de criopreservação a nível comercial é prejudicada pelas diferenças de eficiência entre os protocolos existentes e pela inconsistência dos resultados entre os laboratórios. Por isso, a técnica de vitrificação ainda carece de aprimoração para que seja possível sua aplicação comercial.

A melhoria zootécnica dos animais de produção é um objetivo constante para os criadores e pesquisadores, que visam incrementar o número de descendentes de fêmeas selecionadas, reduzindo o intervalo entre as gerações. Além das alternativas para melhorar a sobrevivência de embriões após a criopreservação, como o conteúdo citado no presente trabalho, diversas tecnologias têm sido empregadas para alcançar uma maior eficiência reprodutiva, tais como a inseminação artificial, a FIV, a transferência de embriões, a criopreservação de embriões, a clonagem, a transgenia, a sexagem de sêmen e embriões, a tecnologia de células tronco, a genômica de embriões, a micro e a nanotecnologia, que foram e estão sendo introduzidas nos diferentes sistemas de produção e melhoramento animal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Hiroyuki *et al.* Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 325-335, 1999.

ABE, Hiroyuki *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.

ABE, Hiroyuki *et al.* *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 21, n. 1, p. 22-30, 2004.

AGUIAR, Paulo Ricardo Loss. Vitriificação de Embriões Mus Musculus Em Diferentes Soluções Crioprotetoras. 1996. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AKSU, Digdem Aktoprakligil *et al.* Gene expression profiles of vitrified *in vitro*-and *in vivo*-derived bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 9, p. 613-625, 2012.

ANZAR, Muhammad *et al.* Synchrotron X-ray diffraction to detect glass or ice formation in the vitrified bovine cumulus-oocyte complexes and morulae. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e114801, 2014.

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

ARAV, A.; ZERON, Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**, Bet Dagan, v. 1, n. 47, p. 341, 1997.

ARAV, A.; NATAN, Y. Vitrification of oocytes: from basic science to clinical application. In: **Oocyte Biology in Fertility Preservation**. Springer New York, p. 69-83, 2013.

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

ARMITAGE, W. J. Cryopreservation of animal cells. In: Symposia of the Society for **Experimental Biology**, p.379-393, 1987.

ARYA, A. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 5, p. 209-219, 2005.

ASSAF, S. S.; RODRIGUES, Jose Luiz. Vitrificação de embriões *Mus domesticus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 m de etileno glicol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 49-53, 2003.

AUSTIN, C. R. Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. **Nature**, v. 168, n. 4274, p. 558, 1951.

BAVISTER, B. D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 181-196, 2002.

BECKER, B. S. Viabilidade de blastocistos de *Mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação. 2016. 51 f. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BERTOLINI, Marcelo. Sobrevivência *In Vitro* e *In Vivo* de Embriões *Mus Musculus* Vitrificados. 1994. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

BLONDIN, P. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 32-36, 2017.

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

BOCK, I. *et al.* Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 6, p. 776-784, 2016.

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

BRACKETT, Benjamin G.; ZUELKE, Kurt A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 43-64, 1993.

BRAGA, Luísa Maria Gomes de Macedo. Sobrevivência *in vitro* de embriões *Mus musculus domesticus* após a vitrificação em diferentes volumes da solução de 9M de etileno glicol. 2000. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**.

BUENO AP, BELTRAN MP. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Eletrônica Medicina Veterinária**, n.11, p.1-7, 2008.

CAAMANO, J. N. *et al.* Survival of vitrified *in vitro*-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 881-890, 2015.

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 697, 1951.

CHEUICHE, Zilah Maria Gervasio. Vitricificação de embriões *mus domesticus domesticus* envasados em microcapilares de quartzo. 2011. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

CHRISTMANN, Leandro. Congelação de Embriões de *Mus Musculus* Pelos Métodos de Vitricificação e Congelação Rápida: Influência da Indução à Cristalização Extracelular (Seeding). 1989. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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 crioconservação no estágio de blastocisto. 2014. 64 f. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CORTES, C. G. P.; RODRIGUES, Jose Luiz. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitricificados em meio contendo 9,0M de etileno glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.3, p. 461-467, 2000.

COSTA, Alexandre Aiquel Vaz. Vitricificação de embriões *Mus domesticus domesticus* envasados em palheta convencional dotada de peça metálica. 2007. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DE MAIO, Antonio. 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.

DO, V. H. *et al.* Requirements for cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos by a standard method of vitricification. **Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry**, 4, 2016.

DOMITROVIC, Tatiana *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 580, n. 26, p. 6033-6038, 2006.

DRIVER, A. M.; KHATIB, H. Physiology and Endocrinology Symposium: heat shock proteins: potentially powerful markers for preimplantation embryonic development and fertility in livestock species. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 3, p. 1154-1161, 2013.

DU, Y., PRIBENSZKY, C. S., MOLNÁR, M., ZHANG, X., YANG, H., KUWAYAMA, M., VAJTA, G. 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, 2008a.

DU, Y., LIN, L., SCHMIDT, M., BOGH, I. B., KRAGH, P. M., SORENSEN, C. B., KUWAYAMA, M. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. **Cloning and Stem Cells**, v. 10, n. 3, p. 325-330, 2008b.

FAHY G.M. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FAHY, Gregory M.; WOWK, Brian. Principles of cryopreservation by vitrification. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p.21-82, 2015.

FARAGÓ, B., KOLLÁR, T., SZABÓ, K., BUDAI, C., LOSONCZI, E., BERNÁTH, G., CSEREPES, J. Stimulus-triggered enhancement of chilling tolerance in zebrafish embryos. **PLoS one**, v.12, n. 2, p. e0171520, 2017.

FULLER B, E PAYNTER S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**. 9: 680-869, 2004.

GU, R. *et al.* Improved cryotolerance and developmental competence of human oocytes matured *in vitro* by transient hydrostatic pressure treatment prior to vitrification. **Cryobiology**, v.75, p.144-150, 2017.

GUIMARÃES, A.C.G. *et al.* Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases *in vitro* fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3, p. 103-110, 2014.

HANADA, A.; SUZUKI, T.; SHIOYA, Y. Birth of calves from non-surgical transfer of blastocysts originated from *in vitro* fertilized oocytes matured *in vitro*. In: **Proc. 78th Ann. Meet. Jpn. Soci. Zootech. Sci.** P. 18, 1986.

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

HARTL, F. Ulrich. Chaperone-assisted protein folding: the path to discovery from a personal perspective. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1206-1210, 2011.

HASLER JF, HENDERSON WB, HURTGEM PJ, JIN ZQ, MCCAULEY AD, MOWERSA, NEELY B, SHUEY LS, STOKES JE, TRIMMER SA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141-152, 1995.

HITE, B.H. The effect of pressure in the preservation of milk. **Bulletin of West Virginia University Agricultural Experiment Station**, Morgantown v. 58, p. 15-35, June 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**, Morgantown v. 46, p.1–67, Oct. 1914.

HOOGENRAAD, Nick. A brief history of the discovery of the mitochondrial unfolded protein response in mammalian cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, p. 1-3, 2017.

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.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Disponível em <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/16992-pecuaria-municipal-2016-centro-oeste-concentra-34-4-do-rebanho-bovino-do-pais.html>. Acesso em 16 de setembro de 2017, v. 6, 2016.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v.32, p. 14-26, 2014.

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, Zongliang *et al.* Effects of high hydrostatic pressure on expression profiles of *in vitro* produced vitrified bovine blastocysts. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-10, Feb. 2016.

KAARNIRANTA, *et al.* Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2319-2324, 1998.

KRISHER, Rebecca L.; LANE, Michelle; BAVISTER, Barry D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1345-1352, 1999.

KÜLTZ, Dietmar. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3119-3124, 2003.

KUMMER, J.; GRATÃO, A. A.; VALE A. C.; RODRIGUES, Jose Luiz . Sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* após a vitrificação em solução de 9 M de etileno glicol. In: XIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999, Campos do Jordão. Porto Alegre: **Arquivos da Fac. de Veterinária da UFRGS**, v. 27. p. 242, 1999.

KUO, You-Hai; PRIBENSZKY, Csaba; HUANG, San-Yuan. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1395-1396, Jun. 2008.

LAMBERT, R. D. et al. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 117-133, 1986.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 153-164, 1997.

LANGE, Mateus da Costa. Vitriificação de diferentes estádios embrionário de *Mus domesticus domesticus* envasados em microvolume e expostos ao nitrogênio a -200 °C. 2008. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 81-94, 1993.

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

LOPES, R. F. F. Congelação ultra-rápida e vitriificação de embriões *Mus musculus* 1989. 134 f. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LUFT, J. Christopher; DIX, David J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress & Chaperones**, v. 4, n. 3, p. 162, Sep. 1999.

LUYET, Basile Joseph; GEHENIO, P. M. Life and death at low temperatures. **Biodynamica.**; Normandy, Missouri, 1940.

MANDAWALA, A. A. *et al.* Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637-1644, 2016.

MATTSON, Mark P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Jan. 2008.

MAZUR, Peter. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970.

MAZUR, Peter. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MCGEE JR, Henry A.; MARTIN, William J. Cryochemistry. **Cryogenics**, v. 2, n. 5, p. 257-267, 1962.

MERTON, J. S. *et al.* Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MUCCI, N. *et al.* Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006.

NEDAMBALE, T. L. *et al.* Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 437-449, 2004.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 109-124, 1991.

OLIVEIRA, A. T. D. ; RODRIGUES, Jose Luiz ; NIEMANN, H. . Vitriificação de Embriões Bovinos Produzidos *In Vitro* Desidratados Com 3,6 M de Etileno Glicol e Sacarose. In: XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1998, Atibaia. **Anais da XII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, v. 26. p. 334-335, 1998.

Osuna, Alexander Nivia. Sobrevivência *in vitro* de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em macro ou microvolume de crioprotetor. 2008. **Dissertação (Mestrado em Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico..

PARRISH, J. J. *et al.* Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. In: **Seminars in Reproductive Medicine**. Thieme Medical Publishers, Inc., New York, p. 005-014, 2002.

PEGG, David E. Principles of cryopreservation. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, p. 39-57, 2007.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2016.

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

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 287, 1993.

PONTES J. H. F, *et al.* Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.

PRIBENSZKY, C., MOLNÁR, M., CSEH, S., & SOLTI, L. Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 4, p. 479-487, 2004.

PRIBENSZKY, C., MOLNÁR, M., CSEH, S., & SOLTI, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 143-150, Jun. 2005a.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. **Reproduction of Domestic Animals**, Berlin, v. 40, 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, 162–163 2006.

PRIBENSZKY C. *et al.* 128 IMPROVED POST-THAW MOTILITY, VIABILITY, AND FERTILITY ARE ACHIEVED BY HYDROSTATIC PRESSURE-TREATED BULL SEMEN. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 181-182, 2007.

PRIBENSZKY, F. E. SIQUEIRA, M. MOLNÁR, A. HARNOS AND R. RUMPF. 89 improved post-warming developmental competence of open pulled straw-vitrified in vitro-produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment. **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., VAJTA, G., MOLNAR, M., DU, Y., LIN, L., BOLUND, L., & YOVICH, J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biology of Reproduction**, Champaign, 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**, Melbourne, v. 23, n. 1, p. 48–55, 2011.

RALL, William F.; FAHY, Gregory M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at–196 C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573-575, 1985.

REICHENBACH, H. D. ; RODRIGUES, Jose Luiz . Survival Of Mouse Morulae And Early Blastocysts After Direct Flunging Into Liquid Nitrogen. in: Theriogenology, 1988, Fort Collins. **Proceedings of International Embryo Transfer Society**. Fort Collins: IETS, v. 29, 1988.

RITOSSA, Ferruccio. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 18, n. 12, p. 571-573, Jul. 1962.

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

ROMEK, *et al.* 79 REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVEL IN CULTURED PORCINE EMBRYOS AFTER HIGH HYDROSTATIC PRESSURE. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 169-169, 2016.

RUFINO, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Determinação do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de métodos com ênfase para a PCR. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, 2006.

SANTL B, WENIGERKIND H, SCHERVNTHANER W, MÖDL J, STOJKOVIC M, PRELLE K, HOLTZ W, BREM G, WOLF E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.

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

SATA, Ryuichi *et al.* Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, n. 1, p. 97-103, 1999.

SCHLESINGER, Milton J. Heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 21, p. 12111-12114, Jul. 1990.

SCHNEIDER, Marlon Roberto. Avaliação de Sistemas de Armazenamento de Oócitos e Embriões Bovinos Produzidos *In Vitro*. 1997. **Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SEGERSON, E. C. *et al.* Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.

SEKI, Shinsuke; MAZUR, Peter. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to– 196 C in dilutions of a standard vitrification solution. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e36058, 2012.

SELYE, Hans. Confusion and controversy in the stress field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 37-44, 1975.

SHERMAN, J. K.; LIN, Teh Ping. Survival of Unfertilized Mouse Eggs During Freezing and Thawing. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 98, n. 4, p. 902-905, 1958.

SIQUEIRA FILHO, *et al.* Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 23, n. 4, p. 585-590, May 2011.

SREENAN, J.; SCANLON, P.; GORDON, I. Culture of fertilized cattle eggs. **The Journal of Agricultural Science**, v. 70, n. 2, p. 183-185, 1968.

STINSHOFF H, WILKENING S, HANSTEDT A, BRÜNING K, WRENZYCKI C. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology** 2011;76(8):1433-41.

TARÍN, Juan J. *et al.* Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects pre-implantation embryo development *in vitro* in the mouse. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 312-319, 2002.

TRINKLEIN, N. D., MURRAY, J. I., HARTMAN, S. J., BOTSTEIN, D., & MYERS, R. M. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. **Molecular Biology of The Cell**, v. 15, n. 3, p. 1254-1261, 2004.

VAJTA, Gabor *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998.

VAJTA, Gábor. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 5, p. 719-727, 2013.

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

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, *et al.* Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1071-1084, 1997.

VIEIRA, Arnaldo Diniz; FORELL, Fabiana; FELTRIN, Cristiano; RODRIGUES, Jose Luiz. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 377-383, 2007.

VILLAMIL, Paula Rodriguez. Vitriificação de blastocistos *Mus domesticus domesticus* expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente. 2009. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

WELCH, William J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. **Physiological reviews**, v. 72, n. 4, p. 1063-1081, Oct. 1992.

WELCH, T. J., FAREWELL, A., NEIDHARDT, F. C., & BARTLETT, D. H. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7170-7177, Nov. 1993.

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**, Washington, v. 68, n. 2, p. 456–463, Feb. 2002.

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

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, n. 5315, p. 125-126, 1971.

WILLADSEN, Steen M. et al. Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, n. 1, p. 151-154, 1976.

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

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

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

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**, Stoneham, v. 67, n. 1, p. 81-89, Jan. 2007.

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

YU, X. L. et al. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*–produced and *in vivo*–produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 474-479, 2010.