

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

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.

Favorino José De Freitas Collares

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2014

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

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.

Autor: Favorino José de Freitas Collares

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas de Reprodução Animal.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Collares, Favorino José De Freitas

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. / Favorino José De Freitas Collares. -- 2014.

63 f.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Embrião. 2. Estresse. 3. Pressão Gasosa. 4. Criopreservação. 5. Expressão Gênica. I. Rodrigues, José Luiz Rigo, orient. II. Título.

Favorino José de Freitas Collares

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.

Aprovado em 2014

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

Profa. Dra. Luisa Maria Gomes de Macedo Braga

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Patrão Velho Celestial por me propiciar uma vida com muito amor e carinho de meus pais, familiares e amigos, e graças a estes estar concluindo mais esta etapa em minha formação acadêmica.

Agradeço ao Mestre Médico Veterinário Oscar Francisco Silveira Collares que, além de meu pai, sempre foi um mestre em minha vida e minha formação. Junto com minha mãe Ana Margareth de Freitas Collares, a qual eu também agradeço. Esses exemplos de pessoas sempre me ensinando lições de ética e moral para que me relacionasse com todos com respeito e alegria.

Aos amigos da UFRGS, por me aguentarem em horas inoportunas e prestigiarem comigo momentos felizes. Agradeço por suas ajudas e experiências trocadas. Em especial ao Maurício Barbosa Salviano e ao Bruno Silveira Becker pela ajuda nas tarefas durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos extra-universidade pelas horas de lazer, como em rodeios, futebol, churrascos e tudo mais. Apesar do convívio não ser por muito tempo, foi sempre de boas conversas e bom ambiente.

Agradeço a UFRGS por ter disposto de vaga e, em especial ao amigo e também professor desta instituição, Dr. José Luiz Rodrigues, por me escolher como orientado e pelos ensinamentos necessários para ser um bom profissional na área de reprodução e embriologia. E, não menos importantes foram os ensinamentos sobre a vida e bons vinhos.

Na pessoa do Dr. Marcelo Bertolini, professor responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da UNIFOR, agradeço a toda sua equipe por me acolher na cidade de Fortaleza, me auxiliar em parte de minha pesquisa e por todos os ensinamentos lá fornecidos.

Para concluir, agradeço imensamente o patrocínio: de meus pais, pois os esforços para manter minhas despesas em Porto Alegre não foram pequenos; do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução por arcar com despesas referentes ao trabalho de pesquisas e viagens necessárias.

A todos meus sinceros agradecimentos. Muito Obrigado

RESUMO

Os objetivos dos experimentos foram primeiro determinar as taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões murinos no estágio de 8-células expostos a 15.7 MPa de N₂ durante 2 ou 4 horas. Segundo, determinar as taxas de sobrevivência embrionária à criopreservação dos blastocistos originados a partir do cultivo dos embriões de 8-células após a indução do estresse subletal celular com o auxílio da pressão gasosa. Terceiro, determinar a expressão dos genes BAX, Bcl2, GLUT1, GLUT3, IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R, SOD2, HSP70.1, AQP3 e PPIA nas seguintes etapas experimentais: no estágio de 8-células imediatamente após a coleta dos embriões; no estágio de blastocisto antes e após o congelamento. Nas seis replicações realizadas foram utilizados 14 machos e 60 fêmeas *Mus musculus domesticus*. Na primeira etapa dos experimentos, das fêmeas superovuladas, 38 produziram 1092 embriões viáveis no estágio de 8-células que foram, de forma aleatória, divididos em quatro grupos experimentais: Grupo P1 – os embriões foram expostos a 15.7 MPa de N₂ gasoso durante 2 horas e após cultivados *in vitro* até alcançar o estágio de blastocisto; Grupo P2 – os embriões foram tratados de maneira idêntica aos do Grupo P1, sendo expostos aos 15.7 MPa de N₂ gasoso durante 4 horas; Grupo controle CE - os embriões foram submetidos ao cultivo *in vitro* imediatamente após a coleta; Grupo controle CB: os embriões foram mantidos em temperatura ambiente (22 °C) durante 4 horas e após colocados na estufa para o cultivo *in vitro*. Na segunda etapa, amostras dos embriões dos quatro grupos experimentais tiveram a expressão gênica determinada com auxílio da amplificação e determinação quantitativa do mRNA (“Real Time PCR”). Os resultados do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto na primeira etapa foram os seguintes: Grupo P1 – 96,4% (245/253); Grupo P2 – 94,0% (253/269); Grupo CE – 95,0% (249/262) e Grupo CB – 95,4 (249/261). Na segunda etapa dos experimentos os resultados de reexpansão dos blastocistos após a criopreservação foram: Grupo P1 – 86,3% (63/73); Grupo P2 – 80,0 (76/95); Grupo CE – 72,8 (67/92); Grupo CB – 83,6 (92/110). A análise da expressão da maioria dos genes não revelou diferenças entre os grupos experimentais, provavelmente devido à 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 de N₂ gasoso não comprometeu a viabilidade *in vitro* para desenvolverem-se ao estágio de blastocisto. As taxas de sobrevivência dos blastocistos à criopreservação diferiram somente entre os grupos de embriões expostos à

HGP durante 2 horas (P1) no estágio de 8-células (86,3%) e o grupo de embriões submetidos ao cultivo *in vitro* (CE) (72,8%). Os resultados dos experimentos revelaram que a HGP pode ser empregada na indução de estresse celular subletal em embriões murinos.

Palavras chaves: embrião; murino; estresse; pressão gasosa; criopreservação; expressão gênica.

ABSTRACT

*The first objective of the experiments was to determine the development rates of mouse embryos exposed to high gaseous pressure (HGP – 15.7 MPa gaseous N₂) at 8-cell stage for 2 or 4 hours. Second, determine the blastocyst re-expansion rates after cryopreservation. Third, determine the relative expression of BAX, Bcl2, GLUT1, GLUT3, IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R, SOD2, HSP70.1, AQP3 and PPIA in the following experimental steps: immediately after collection of 8-cell stage embryos, at the blastocyst stage before and after freezing. Fourteen males and 60 females *Mus musculus domesticus* were used in six experiment replications. Thirty-eight (63%) from the 60 superovulated, females produced 1092 viable embryos. These 8-cell stage embryos were then randomly divided into four experimental groups: P1 group – embryos were first exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 2 hours and after cultured in vitro until the blastocyst stage; P2 group - embryos were treated identically to the P1 group, but were exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 4 hours; CE control group - embryos were submitted to in vitro culture immediately after collection; CB control group - embryos were maintained at room temperature (22°C) for 4 hours and after cultured in vitro. The results of embryo in vitro development to the blastocyst stage were: P1 Group- 96.4% (245/253); P2 group- 94.0% (253/269); CE group- 95.0% (249/262) and CB- 95.4 (249/261). After cryopreservation the blastocyst re-expansion rates were: P1 group- 86.3 % (63/73); P2 group- 80.0 (76/95); CE group – 72.8 (67/92), CB group- 83.6 (92/110). No major differences in gene expression were observed among treatment groups for most genes analyzed in this study, likely due to the biological variability in groups of embryos within each group. Exposure of embryos at 8-cells stage to 15.7 MPa of gaseous N₂ did not compromise in vitro embryo viability to reach the blastocyst stage. The survival rates of blastocysts to cryopreservation differ only among the embryos that were exposed to the HGP during 2 hours at 8-cell stage (86,3 %) and the 8-cell stage embryos that were submitted to the in vitro culture immediately after collection (72,8 %). The experimental results showed that HGP can be used to induce sublethal cell stress in murine embryos.*

Keywords: embryo; stress; pressure; HHP; HGP; cryopreservation; gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

Figure 1: Blastocyst cells relative expression of BAX gene.....	30
Figure 2: Blastocyst cells relative expression of GLUT 1 gene.....	30
Figure 3: Blastocyst cells relative expression of GLUT 3 gene.....	31
Figure 4: Blastocyst cells relative expression of IGF 2-R gene.....	31
Figure 5: Blastocyst cells relative expression of IGF 2 gene.....	31
Figure 6: Blastocyst cells relative expression of SOD 2 gene	32
Figure 7: Blastocyst cells relative expression of AQP 3 gene	32

LISTA DE TABELAS:

Revisão bibliográfica:

Tabela 1. Relação entre tempo, estágio de desenvolvimento e localização do embrião no camundongo após o acasalamento natural (modificado de Rafferty, 1970). 14

Artigo

Table 1. PCR primers and Gene Bank accession numbers for genes analyzed in *Mus musculus*. 28

Table 2. Embryo *in vitro* development to the blastocyst stage after been exposed to sublethal stress. 29

Table 3. Blastocyst survival rate after been exposed to sublethal stress and freezing.... 29

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcento
°C	Graus Celsius
µl	Microlitros
ANOVA	analysis of variance
AQP3	Aquaporin 3
ART	Assisted reproductive Technologies
ATPase1	Sódio/potássio adenosine triphosphatase isoform 1
Azin1	Antizyme inhibitor 1
BAX	B-cell lymphoma 2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine serum albumin
CB	Grupo controle temperatura ambiente
CE	Grupo controle estufa
CO ₂	Dióxido de carbono
CSP	Cold shock protein
D	Dia
DMSO	Dimethyl sulfoxide
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
GLUT	Glucose transporter protein
H2afz	H2A histone family, member Z
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HGP	Alta pressão gasosa
HHP	Alta pressão hidrostática
HM	Holding medium
HSP	Heat shock protein

HSP70.1	Heat shock protein 70.1
IGF1	Insulin-like growth factor
IGF1-R	Insulin-like growth factor receptor 1
IGF2-R	Insulin-like growth factor receptor 2
min.	Minuto
mL	Mililitros
mOsm	Miliosmol
MPa	Mega Pascals
mPBS	Solução salina fosfatada tamponada modificada
N ₂	Nitrogênio
NL ₂	Liquid nitrogen
O ₂	Oxigênio
P	Grupo pressão
P1	Grupo pressão 2 horas
P2	Grupo pressão 4 horas
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A
PVP	Polivinil-pirrolidona
RT	Room temperature
s.	Segundo
sec	Second
Sod	Superoxide dismutase
UI	Unidade internacional
χ^2	chi-square

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Produção de Embriões <i>Mus musculus domesticus</i>	13
2.2. Estresse celular	14
2.2.1. Indução de Estresse Subletal das Células Embrionárias	15
2.2.1.1. Procedimentos de indução de estresse subletal das células embrionárias	16
2.2.1.2. Finalidade da indução do estresse subletal das células embrionárias	16
2.2.2. Mensuração do Estresse	17
2.3. Criopreservação	18
2.3.1. Soluções Crioprotetoras	19
2.3.2. Métodos de Criopreservação Embrionária	20
2.3.2.1. Método lento de congelamento	20
2.3.2.2. Método rápido de congelamento	20
2.3.2.3. Método de vitrificação	20
2.3.3. Reaquecimento dos Embriões	21
3. ARTIGO	22
Abstract	22
Introduction	23
Material and Methods	24
Production of mouse embryos	24
Embryo <i>in vitro</i> culture	25
High gaseous pressure treatments	25
Blastocyst cryopreservation	26
Quantitative real-time PCR analysis	26
RNA extraction	26
cDNA synthesis and qPCR	27
Statistical Analysis	27
Results	27
Discussion	32
References	35
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

5. ANEXOS	42
Anexo A - Número de animais utilizados no experimento.....	42
Anexo B - PROTOCOLO DO MEIO KSOM.....	43
Anexo C - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 21).....	44
Anexo D - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 22).....	47
Anexo E - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 23).....	50
Anexo F - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 24).....	53
Anexo G - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 25).....	56
Anexo H - PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES <i>Mus musculus domesticus</i> (coleta 26).....	59

1. INTRODUÇÃO

Hite (1899 e 1914) ao final do século XIX e início do século XX já realizava experimentos com o emprego de pressão hidrostática no processamento, na preservação e na conservação de alimentos (leite e diferentes frutas). Yayanos *et al.* (1979) revelaram que microorganismos marinhos, na época denominados barófilos, resistiam a pressões hidrostáticas presentes no fundo dos oceanos.

Mais tarde em 1996 um submarino dirigível não tripulado da marinha japonesa coletou organismos procarióticos barófilos (depois denominados piezófilos) que resistiam a pressões hidrostáticas maiores que 100 mega pascais (MPa), nas profundezas do oceano (ABE *et al.* 1999). Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) em um elegante experimento observaram que colônias de *Listeria monocytogenes* previamente submetidas ao choque térmico e posteriormente expostas a altas pressões hidrostáticas (HHPs), apresentavam um aumento significativo das denominadas “cold shock proteins” (CSPs).

A expressão dos genes responsáveis pela produção destas proteínas se caracterizava por uma resposta a uma situação de estresse, conferindo uma maior taxa de sobrevivência às cepas bacterianas. Anteriormente, Walker *et al.* (1990) já haviam demonstrado que a *Listeria monocytogenes* apresentava habilidade para sobreviver à exposição a diferentes fatores de estresse ambiental, como por exemplo, pressão osmótica e baixas temperaturas.

A partir destas observações, embriologistas, preocupados com o aprimoramento da manutenção *in vitro* de embriões de diferentes espécies e estádios de desenvolvimento pré-eclosão, realizaram experimentos com o objetivo de quantificar as taxas de sobrevivência e a expressão gênica de gametas e embriões após a exposição às HHPs (PRIBENSZKY *et al.*, 2005b; BOCK *et al.*, 2010; PRIBENSZKY *et al.*, 2010; PRIBENSZKY e VAJTA, 2011).

A comprovação de que a exposição às HHPs estimula uma melhor resposta embrionária ao estresse nos levou a procurar identificar procedimentos alternativos para estressar embriões em estádios pré-implantação. Um dos aspectos criticáveis nos procedimentos descritos por Pribenszky *et al.* (2005b) são as dimensões e o peso do equipamento que produz as HHPs. A equipe do nosso laboratório adaptou uma câmara de pressão gasosa, ainda não descrita na literatura científica para o emprego com

gametas e embriões mamíferos, adequada à exposição a diferentes altas pressões gasosas (HGPs). Experimentos iniciais já foram realizados com oócitos caninos (RODRIGUES *et al.*, 2012), aonde foram obtidos os primeiros resultados do emprego de HGPs como fator de indução de estresse sobre o gameta feminino.

Os objetivos dos experimentos foram primeiro determinar as taxas de desenvolvimento de embriões murinos no estágio de 8-células expostos a 15.7 MPa de nitrogênio (N₂) durante 2 ou 4 horas. Segundo, determinar as taxas de sobrevivência embrionária à criopreservação dos blastocistos originados a partir do cultivo dos embriões de 8-células após a indução do estresse celular com o auxílio da pressão gasosa. Terceiro, determinar a expressão dos genes BAX, Bcl2, GLUT1, GLUT3, IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R, SOD2, HSP70.1, AQP3 e PPIA nas seguintes etapas experimentais: no estágio de 8-células imediatamente após a coleta dos embriões; no estágio de blastocisto antes e após o congelamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de Embriões *Mus musculus domesticus*

No âmbito da embriologia experimental o *Mus musculus domesticus* é o modelo de preferência entre pesquisadores (CHORILLI *et al.*, 2007). A espécie tem um baixo custo de manutenção, como por exemplo, a exigência de área física por animal confinado e a alimentação (BERTOLINI, 1994). Outro aspecto importante, principalmente no que tange a produção de embriões, é fundamental respeitar-se às condições ambientais em que os animais são mantidos. A temperatura entre 20 e 22 °C, iluminação diária entre 12 e 14 horas (dependendo do biotério), alimentação e água *ad libitum* (NOWSHARI e BREM, 1998; BAPTISTA *et al.*, 2005; PRIBENSZKY *et al.*, 2005b; BOCK *et al.* 2010; CHEUCHE; 2010). Outra característica que justifica o emprego da espécie murina é a puberdade precoce, que ocorre entre 7 e 8 semanas de vida (SUCKOW *et al.*, 2001).

O ciclo estral na camundonga dura de 4 a 5 dias (SUCKOW *et al.* 2001) e a prenhez de 19 a 21 dias, permitindo que os experimentos possam ser realizados em curto período de tempo. Outro aspecto importante da fisiologia reprodutiva murina é a possibilidade da realização do tratamento superovulatório em qualquer fase do ciclo

estral, aumentando a média de embriões produzidos de 12 a 15 para 20 a 40 (RAFFERTY, 1970).

Para a superovulação são utilizados a gonadotrofina coriônica equina (eCG), com função de estimular o crescimento folicular, e gonadotrofina coriônica humana (hCG), com função de desencadear a maturação oocitária e promover a ovulação. O tratamento se inicia com a aplicação de 5 a 10 unidades internacionais (UI) de eCG às 15:00 h e 46 h após se aplica 5 a 10 UI de hCG. Após a aplicação do hCG as fêmeas são colocadas com os machos para a cópula (em geral, uma fêmea para cada macho). Na manhã do dia seguinte ao acasalamento, as fêmeas que foram copuladas são identificadas através da presença do tampão vaginal (RAFFERTY, 1970; BAPTISTA *et al.*, 2005; CHEUICHE, 2010). Os embriões podem ser coletados das fêmeas doadoras em um período que vai desde o momento da observação do tampão vaginal (primeiro dia da prenhez – Dia 1) até o D4 onde serão coletados mórulas e blastocistos (tabela 1). Baptista *et al.* (2005) examinando a variabilidade da produção de embriões em 74 fêmeas superovuladas alcançou uma média de 56,7 estruturas e 36,9 embriões viáveis.

Tabela 1. Relação entre tempo, estágio de desenvolvimento e localização do embrião no camundongo após o acasalamento natural [modificado de Rafferty (1970)].

Tempo da cópula (h)	Nº Células	Localização no útero
D1	1	Ampola
D2	2	Oviduto cranial
D3 manhã	3-4	Oviduto medial
D3 tarde	5-8	Oviduto caudal + útero
D4	Mórula e Blastocisto	Útero

2.2. Estresse Celular

Yamanaka *et al.* (1998) em um elegante experimento observaram que colônias de *Escherichia coli* previamente submetidas ao estresse nutricional apresentavam um aumento significativo das CSPs. Essas proteínas também foram aumentadas na *Listeria monocytogenes* quando Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) provocaram experimentalmente choque térmico e posteriormente exposição à HHP.

A expressão dos genes responsáveis pela produção de proteínas denominadas CSPs caracterizou resposta a uma situação de estresse, conferindo uma maior taxa de sobrevivência às cepas bacterianas (WOUTERS *et al.*, 1999).

Os microorganismos *Lactococcus lactis* quando expostos por determinados período a 10°C, produzem CSPs, o que os tornam mais resistentes à posterior criopreservação (WOUTERS *et al.*, 1999). De acordo com Wouters *et al.* (1999) o nível de resistência ao congelamento não se relaciona diretamente com o nível de expressão gênica.

Pribenszky *et al.* (2010) relataram que submeter previamente embriões mamíferos ao estresse induzido por HHP aumenta a tolerância desses indivíduos a uma nova situação de estresse, como por exemplo, à criopreservação (PRIBENSZKY *et al.*, 2005b).

2.2.1. Indução de Estresse Subletal das Células Embrionárias

Existem vários fatores que provocam estresse, causando alterações do padrão fisiológico celular. Dentre eles estão a modificação de potencial hidrogeniônico (pH), de osmolaridade, de nutrição e de pressão hidrostática (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011).

O diferencial da pressão hidrostática é que esta causa um estresse uniforme e imediato na amostra (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011), com maior confiabilidade, consistência, precisão e segurança (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Além disso, este procedimento afeta o retículo endoplasmático do embrião estressado, podendo-se aumentar a criotolerância (BOCK *et al.* 2010).

Hamdoun e Epel (2007) relataram que embriões jovens, em suas primeiras clivagens possuem apenas sistemas de defesa inata, já com oito células começam o desenvolvimento de sistema de defesa induzida por mudanças ambientais. Conforme avançam o estágio de desenvolvimento, expressam proteínas chamadas “Heat Shock Proteins” (HSPs) como estratégia para responderem a agentes estressores.

2.2.1.1. Procedimentos de indução de estresse subletal às células embrionárias

Pribenszky *et al.* (2005b) comentaram que a magnitude e o tempo de exposição à HHP podem ser letais aos embriões murinos, sendo a sobrevivência dependente deste binômio. Em seus experimentos concluíram que a exposição a 90 MPa durante 30 min. ou 30 MPa durante 300 min. são letais aos embriões murinos.

Bock *et al.* (2010) relataram que embriões murinos de duas células submetidos à pressão hidrostática de 20 ou 40 MPa durante 60 ou 120 min. não apresentaram alterações morfológicas após os tratamentos. Já os embriões submetidos a 60 e 80 MPa durante 60 ou 120 min. foram morfológicamente alterados.

A decompressão após a exposição à HHP também exerce influência nos embriões, pois quando essa é feita de forma gradual, ocorre uma maior resistência ao processo (PRIBENSZKY *et al.*, 2004).

Em 2012, Mezzalira *et al.*, testaram a aplicação de pressão negativa como forma de indução de estresse em oócitos bovinos imaturos e concluíram que a pressão de -0,05 MPa melhora a taxa de eclosão de embriões partenogênicos (34% vs 23,6%).

2.2.1.2. Finalidade da indução do estresse subletal nas células embrionárias

A partir dos procedimentos de indução de estresse pesquisados anteriormente em microorganismos, embriologistas realizaram experimentos de modo que fossem quantificadas as taxas de sobrevivência e a expressão gênica de embriões após a exposição ao estresse subletal. O objetivo destes procedimentos é induzir no embrião uma resposta a estas situações que possibilite uma maior sobrevivência em uma exposição posterior a um cenário de estresse, como por exemplo, durante a criopreservação.

Pribenszky *et al.* (2005a) submeteram blastocistos bovinos produzidos *in vitro* à HHP de 80 MPa por 45 min. Após esse procedimento os blastocistos foram criopreservados com auxílio da curva de congelamento rápido. Após o aquecimento, os autores verificaram que os blastocistos expostos à HHP sobreviveram em maior percentual à criopreservação (81% vs 41%).

Em experimento subsequente, Pribenszky *et al.* (2005b) utilizaram HHP de 60 MPa por 30 min. para expor blastocistos murinos antes da vitrificação. Essa exposição proporcionou maiores taxas de sobrevivência (98% vs 46%) e eclosão (95% vs 0%) quando comparados ao grupo de blastocistos não exposto à HHP. A velocidade de reexpansão também foi maior no grupo que sofreu estresse subletal (4–6 h vs 20 h). Já após a transferência de embriões não criopreservados para fêmeas receptoras, o desenvolvimento *in vivo* não revelou diferença, dos embriões expostos à HHP 85% (145/170) originaram fetos vivos, semelhante aos 83% (30/36) de nascimentos a partir de embriões não estressados.

Ao submeterem embriões murinos no estágio de duas células à HHP de 40, 60 ou 80 MPa por 120 min. e avaliarem a evolução ao estágio de blastocisto, Bock *et al.* (2010) relataram que a exposição a estas pressões causou uma diminuição no volume dos blastômeros, levando inclusive a degeneração celular. Aqueles embriões em que os blastômeros não degeneraram apresentaram capacidade de desenvolvimento *in vitro* semelhante aos embriões não expostos à HHP. Entretanto, quando os embriões foram expostos à HHP em estágio de blastocisto, reagiram de maneira diferente. Os blastocistos revelaram melhor tolerância às diferentes pressões, não diferindo na taxa de eclosão em relação aos grupos não tratados.

Pribenszky e Vajta (2011) realizaram um experimento com embriões murinos, bovinos e ovinos para identificar a intensidade da HHP (10 a 80 MPa) e o tempo (30 a 120 min) de exposição, que produzisse uma resposta embrionária adequada ao estresse subletal. As maiores taxas de sobrevivência embrionária à criopreservação foram alcançadas com HHP de 40 a 60 MPa exercida durante 30 a 70 min.

Trigal *et al.* (2013) relatam que, apesar dos embriões tratados com HHP revelarem melhor qualidade morfológica após a vitrificação, esta observação não se traduziu em maior sobrevivência às 24 h (79,3% HHP versus 73,9 controle) e às 48 h medida pela taxa de eclosão (44,7% HHP versus 51,8% controle).

2.2.2. Mensuração do estresse

Ao serem estressadas, as células se manifestam com alterações em seus padrões fisiológicos. Uma dessas alterações é a mudança na expressão de determinados genes ocasionando a síntese de diferentes proteínas (SIQUEIRA FILHO, 2009). A

quantificação de mRNA utilizando a técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) em tempo real é o procedimento usual para a determinação da expressão gênica (ARYA *et al.*, 2005).

Edashige *et al.* (2007) relataram que a determinação da expressão relativa do gene AQP3 pode ser considerada como a principal referência relacionada à permeabilidade de água e solutos neutros (crioprotetores) em mórulas de camundongos, podendo dar ideia da integridade e função da membrana celular.

Bock *et al.* (2010) mensuraram o mRNA nos tempos zero e 120 min. após a HHP, concluindo que: não houve alteração dos genes H2afz e Ppia; a expressão dos genes Azin1 e Sod2 foi imediatamente aumentada, enquanto os genes Gadd45g Rbm3 tiveram um aumento tardio; o gene Sod1 teve um decréscimo em sua expressão quando comparado ao tempo zero e 120 min.

Camargo *et al.* (2011) quantificaram os genes Aqp3 e ATPase1, sendo sugerido que o gene Aqp3 tem participação limitada na reidratação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após retirados de solução hipertônica de 900 mOsm, e que embriões vitrificados apresentam menores resultados em sua avaliação. Os resultados do gene ATPase1 não diferiram significativamente entre os diferentes grupos.

2.3. Criopreservação

Wilmut (1972) e Whittingham *et al.* (1972) foram os pioneiros na criopreservação de embriões mamíferos com sobrevivência pós reaquecimento da temperatura de armazenamento do N₂ líquido.

Os procedimentos de criopreservação são relativamente simples e compreendem quatro etapas: exposição das células ao agente crioprotetor, curva de resfriamento, curva de reaquecimento e remoção do agente crioprotetor (NOWSHARI e BREM, 1998).

O aperfeiçoamento da criopreservação foi mais um ganho nas biotécnicas reprodutivas, pois possibilitou criopreservar, além de células únicas, como os gametas, também grupos celulares, como os embriões. Genomas de diferentes espécies animais são mantidos por gerações em bancos de germoplasma. Um exemplo prático e simples do emprego desta tecnologia foi a transferência de centenas de linhagens de embriões

murinos criopreservados de um biotério desativado para um novo prédio, onde novas colônias de animais foram produzidas (MAZUR *et al.*, 2008).

2.3.1. Soluções Crioprotetoras

Em 1972, Wilmut já obteve bons resultados com a utilização de Dimetil sulfóxido (DMSO) como agente crioprotetor de embriões murinos chegando a 64,7% de sobrevivência. Este autor também usou a sacarose como crioprotetor, a qual exerceu um significativo efeito de diminuição da pressão osmótica.

Outros crioprotetores utilizados são: etilenoglicol, glicerol, propilenoglicol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, entre outros (VALDEZ *et al.*, 1992; NOWSHARI e BREM, 1998; BERTOLINI *et al.*, 2005).

Nowshari e Brem (1998) avaliaram a utilização de dois crioprotetores em diferentes concentrações para vitrificação de blastocisto murinos. Em que a utilização de etilenoglicol com previa exposição a baixas concentrações de 1,5 mol e posterior a 7 mol apresentou melhores resultados de sobrevivência do que as diferentes concentrações de propilenoglicol.

Valdez *et al.* (1992) expuseram embriões murinos em solução crioprotetora pré-congelamento contendo 20% etilenoglicol, 20% DMSO e 10% 1,3-butanodiol. Essa exposição foi mais eficaz na sobrevivência pós-congelamento, quando por tempos de 30s. e 1 min. (95,4 e 94,1%) comparados com tempos de 3, 5 e 10 min. (29,0, 6,7 e 0%).

Bertolini *et al.* (2005) testaram a pré exposição de blastocistos e mórulas em glicerol a 10 ou 25% por tempos de 2,5, 5 ou 10 min., com posterior exposição à 45% por 1 min. a 20°C e vitrificação. Após o descongelamento a 20°C por 20s, a solução contendo os embriões foi diluída em sacarose 1M por 10 min. Não obtiveram diferenças entre as concentrações e tempos de previa exposição ao glicerol, porém as mórulas foram mais resistentes.

Entretanto, na criopreservação lenta ou rápida, a utilização do etilenoglicol como crioprotetor facilita o manejo, pois os embriões podem ser transferidos para as receptoras sem a necessidade de avaliação e retirada desta substancia (VOELKEL e HU 1992).

2.3.2. Métodos de Criopreservação Embrionária

2.3.2.1. Método lento de congelação

Este método consiste em resfriamento a uma velocidade de 0,1 a 1°C/min. até a temperatura de -6 a -8°C onde é feito a indução de cristalização do meio extracelular (“seeding”). Após o *seeding*, a mesma velocidade de resfriamento é mantida até atingir a temperatura final de aproximadamente -70 °C, onde o recipiente contendo as células é submerso em N₂ líquido (-196°C) e armazenadas. A velocidade de reaquecimento deve ser reduzida, entre 12 e 20°C/min. – Wilmut (1972) concluiu que a curva de resfriamento de maior eficiência é empregando a velocidade de 0,22°C/min., relacionada ao reaquecimento com velocidade de 12°C/min.

2.3.2.2. Método rápido de congelação

O método de congelamento rápido é semelhante ao lento, com diminuição da temperatura com velocidade de 0,1 a 0,5 °C/min. após o “*seeding*” (-6 a -8°C), até alcançar temperaturas ao redor de -35°C, momento em que os embriões são submersos em N₂ líquido (-196°C) e armazenados (Willadsen *et al.*, 1978). Nowshari *et al.* (1994) tratam esse processo de congelamento como protocolo lento, já que consideram a vitrificação como protocolo rápido.

A diferença fundamental em relação ao método lento é que a velocidade de reaquecimento deve ser rápida, sendo este procedimento o que caracteriza as duas técnicas: congelamento lento ou rápido. Usualmente se empregam temperaturas entre os 20 e 37°C, alcançando velocidades próximas de 300°C/min. (NOWSHARI *et al.*, 1994).

2.3.2.3. Método de vitrificação

Mazur *et al.* (2008) relatam que a vitrificação é um processo de criopreservação altamente rápido e também viável, desde que associado com altas concentrações de crioprotetores e reaquecimento rápido. Após a exposição ao crioprotetor, as células são colocadas imediatamente em N₂ líquido (-196°C).

Na vitrificação não ocorre formação de cristais de gelo nos meios intra e extracelular, passando de líquido para um estado vítrio (amorfo), diferentemente das

outras formas de congelamento em que ocorre a cristalização do meio (REICHENBACH *et al.* 2002).

É sabido que para vitrificação é exigido altas concentrações de crioprotetores, porém, isso pode gerar toxicidade embrionária se a concentração e o tempo de exposição forem exagerados (BERTOLINI *et al.* 2005).

2.3.3. Reaquecimento dos Embriões

A viabilidade embrionária pós-criopreservação depende diretamente do reaquecimento a que os embriões são submetidos. Os procedimentos de reaquecimento são dependentes das curvas utilizadas para resfriar o sistema. Nos congelamentos a sobrevivência é determinada pela relação resfriamento/aquecimento (CHEUICHE *et al.* 2011). Como o já anteriormente mencionado, no congelamento rápido a temperatura de aquecimento deve situar-se entre 20 e 37°C, como nos resfriamentos sem a formação de cristais de gelo (vitrificação).

3. ARTIGO

Transcriptional response and cryopreservation survival of murine blastocysts exposed to sublethal stress induced by high gaseous pressure at 8-cell stage.

F.J.F. Collares; M.B. Salviano; B.A. Rodrigues; K.C.S. Tavares; C.R. Lazzarotto; B.S. Becker; L.R. Bertolini, M Bertolini and J.R. Rodrigues

Laboratory of Embryology and Biotechniques of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract

The first objective of the experiments was to determine the development rates of mouse embryos exposed to high gaseous pressure (HGP – 15.7 MPa N₂) at 8-cell stage for 2 or 4 hours. Second, determine the blastocyst re-expansion rates after cryopreservation. Third, determine the relative expression of BAX, Bcl2, GLUT1, GLUT3, IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R, SOD2, HSP70.1, AQP3 and PPIA in the following experimental steps: immediately after embryo collection at 8-cell stage, at the blastocyst stage before and after freezing. Fourteen males and 60 females *Mus musculus domesticus* were used in six experiment replications. Thirty-eight (63%) from the 60 superovulated, females produced 1092 viable embryos. These 8-cell stage embryos were then randomly divided into four experimental groups: P1 group – embryos were first exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 2 hours and after cultured *in vitro* until the blastocyst stage; P2 group - embryos were treated identically to the P1 group, but were exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 4 hours; CE control group - embryos were submitted to *in vitro* culture immediately after collection; CB control group - embryos were maintained at room temperature (22°C) for 4 hours and after cultured *in vitro*. The results of embryo *in vitro* development to the blastocyst stage were: P1 Group- 96,4% (245/253); P2 group- 94,0% (253/269); CE group- 95,0% (249/262) and CB- 95,4 (249/261). After cryopreservation the blastocyst re-expansion rates were: P1 group- 86,3 % (63/73); P2 group- 80,0 % (76/95); CE group – 72,8 % (67/92), CB group- 83,6 % (92/110). No major differences in gene expression were observed among treatment groups for most genes analyzed in this study, likely due to the biological variability in

groups of embryos within each group. Exposure of embryos at 8-cells stage to 15.7 MPa of gaseous N₂ did not compromise *in vitro* embryo viability to reach the blastocyst stage. The survival rates of blastocysts to cryopreservation differ only among the embryos that were exposed to the HGP during 2 hours at 8-cell stage (86,3 %) and the 8-cell stage embryos that were submitted to the *in vitro* culture immediately after collection (72,8 %). The experimental results showed that HGP can be used to induce sublethal cell stress in murine embryos, without negative impact on development viability. However, improvement of the blastocyst freezing survival efficiency could not definitely been confirmed by the experiment results.

Introduction

During the last years different experiments showed the efficiency of the high hydrostatic pressure (HHP) to induce embryonic cell sublethal stress and enhance freezing survival rates (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Many aspects are involved with this novel approach to prepare the cell machinery response to sublethal stress like cryopreservation. The amount of pressure, the time of exposure, the specie, the embryo development stage are examples of variables that need to be take into account (BLOCK *et al.*, 2010). Looking at the devices developed for this purpose using hydrostatic pressure to induce cellular sublethal stress, almost all have a great size, are heavy and usually are not easy to transport (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). The background that has permitted to conduct these experiments is based on early publications about food preparation for conservation, as the data published by Hite (1899 and 1914) during the late nineteenth century and early twentieth century. The author has performed experiments with the use of hydrostatic pressure to process, preserve and store foods (milk and different fruits). More recently Yayanos *et al.* (1979) showed that marine microorganisms, at the time called *barophiles*, resisting hydrostatic pressures present on the seabed. Later in 1996 a dirigible submarine, from the Japanese navy, has collected prokaryotic, *barophiles* organisms (named after *piezofilos*) who resisted higher hydrostatic pressures than 100 MPa at ocean depths (ABE *et al.*, 1999). Wemekamp - Kamphuis *et al.* (2002) in an elegant experiment observed that colonies of *Listeria monocytogenes* previously subjected to thermal shock and subsequently exposed to HHP, showed a significant increase of so-called "cold shock proteins" (CSPs). The

expression of the genes responsible for the production of these proteins was characterized by a response to a stressful situation, giving a higher rate of survival to bacterial strains. Previously Walker *et al.* (1990) have already demonstrated that *Listeria monocytogenes* had the ability to survive exposure to different environmental stress factors, such as osmotic pressure and low temperatures. Embryologists looking at this phenomenon have designed experiments to observe the embryonic cells compartment after been exposed to different HHPs. They quantify the rates of survival and gene expression of gametes and embryos after exposure to HHPs (PRIBENSZKY *et al.*, 2005; PRIBENSZKY *et al.*, 2010; BOCK *et al.*, 2010; PRIBENSZKY e VAJTA, 2011).

The evidence that exposure to HHP stimulates better embryonic stress response, led us to identify an alternative approach to induce sublethal cell stress in preimplantation murine embryos. A pressure gas chamber was adapted to expose mammalian embryos to HGP, and initial experiment has been conducted with canine oocytes (RODRIGUES *et al.*, 2012). The objectives of the experiments were to determine the development rates of mouse embryos exposed to HGP (15.7 MPa N₂) at 8-cell stage for 2 or 4 hours; second the survival rates after freezing of blastocysts, developed from 8-cell embryos that were exposed to HGP; and third quantify transcriptional response of blastocysts before and after the exposition to HGP.

Material and Methods

Unless otherwise indicated, all plastic ware, i.e., culture dishes, used in our experiments were obtained from Nunc[®] (Roskild, Denmark). All chemicals and media were purchased from Sigma[®] (St. Louis, MO, USA). The fetal calf serum was purchased from Nutricell[®] (Campinas, SP, Brazil).

Production of mouse embryos

Six- to 8-weeks old Swiss CF1 mouse females on a 14 h daily light cycle were superovulated with the intraperitoneal injection of 10 IU eCG (Folligon[®]) and 10 IU hCG (Pregnyl[®]), 46 h apart. Following the hCG injection, donors females were mated overnight with fertile males (1 donor/male). The presence of a vaginal plug was checked

early next morning, and positive donor females (pregnancy day 1 – D1) were separated and sacrificed on D3 (66 to 68 h after the hCG injection) by cervical dislocation. Uterine horns were individually flushed with 0.5 mL holding medium (HM), composed of modified Dulbecco's phosphate buffer solution (mPBS) supplemented with 0,4% bovine serum albumin (BSA). Structures obtained upon collection were washed and selected under a stereomicroscope. Embryos were morphologically evaluated based on developmental stage and quality (grades 1, 2, 3, and 4), according to procedures described elsewhere (BAPTISTA *et al.*,2005). Grade 1 (excellent) 8-cell stage embryos were randomly allocated to the following experimental groups: P1 group – embryos were first exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 2 hours and after cultured *in vitro* until the blastocyst stage; P2 group – embryos were treated identically to the P1 group, but were exposed to 15.7 MPa of gaseous N₂ for 4 hours; CE control group – embryos were submitted to *in vitro* culture immediately after collection; CB control group – embryos were maintained at room temperature (22°C) for 4 hours and then cultured *in vitro*.

Embryo *in vitro* culture

The 8-cell stage embryos were cultured *in vitro* into 100 µl drops mKSOM during 48 h at 37.5 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. The embryos that have reached the blastocyst stage were freezing (see below) and after thawing they were cultured for 24h under the same environment conditions as the 8-cell stage embryos were maintained.

High gaseous pressure treatments

Groups of 20 selected 8-cell stage embryos from experimental groups P1 and P2 were loaded into a cryovial (2.0 mL) containing 1,0 mL of HM and then transferred to the adapted pressure chamber, that finally was filled with gaseous N₂ until the amount of 15.7 MPa was reached. The chamber initial temperature was 37°C and the final (after 4 h) 33°C. After 2 hours of HGP exposure the medium containing the group P1 embryos was transferred to a Petry dish (Ø 3 cm) where the embryos were identified. After that they were washed 3 times into mKSOM and cultured *in vitro* during 48 hours,

until reach the blastocyst stage. After 4 hours of HGP exposure the embryos of experimental group P2 were handled similarly as the group P1 embryos.

Blastocyst cryopreservation

After *in vitro* culture the blastocysts of all experimental groups were submitted to the cryopreservation using freezing control equipment (TK- 2000[®], TK Equipamentos para Reprodução, Uberaba, Brazil), under the following protocol: first the embryos were exposed to mPBS + 04%BSA containing 10% ethylene-glycol during 5 min. After that groups of 6 embryos were loaded into 0.25 mL straws and transferred to the TK- 2000[®] at room temperature (RT). From RT to -6 °C the straws were cooled at 2 °C / min. At -6 °C the temperature was holding and the seeding induced. After 10 min. the straws were submitted to 0,3 °C / min. until the temperature of -35 °C was reached. After 5 min. the straws were plunged and maintained into liquid nitrogen (NL₂) at -196 °C.

All the frozen blastocysts were thawed by the exposure of each straw to air for 8 sec, followed by their immersion in a water bath at 26°C for 30 sec. After that the embryos were exposed directly to HM for remove the cryoprotectant. Then the blastocysts were rinsed three times in mKSOM and *in vitro* cultured for 24 h at 37.5 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

Quantitative real-time PCR analysis

RNA extraction

Murine embryos of four replicates were collected, transferred into mPBS +0.1 % polivinil-pirrolidona (PVP) solution, loaded in DNase / RNase -Free cryotubes (EasyPath , Brazil) and maintained at -196 ° C (LN). The extraction was carried out following the procedures recommended by the RNeasy Micro Kit [®] (50) (Qiagen, USA). The total mRNA was quantified using a NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington).

cDNA synthesis and qPCR

The cDNA was synthesized from total mRNA from each sample with the kit SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Specific primers for the mouse genes BAX, Bcl2, GLUT1, GLUT3, IGF1, IGF2, IGF1-R, IGF2-R, SOD2, HSP70.1, AQP3 e PPIA were designed using the Primer-BLAST software package from the National Center for Biotechnology Information (Table 1).

Statistical Analysis

Data analyses were done using Minitab software (State College, PA). Survival and developmental rates (development to blastocyst stage, and rates of expansion after freezing) were compared by the χ^2 test or the Exact Fisher test, for $P < 0.05$. Data regarding relative gene expression were analyzed by analysis of variance (ANOVA), for a level of significance of 5%, considering treatment groups (P1, P2, incubator, bench) and sub-groups (pre- and post-freezing) as main effects. Pairwise comparisons between treatment groups and sub-groups were performed using the Tukey test. A simple Pearson's correlation test was used for the analysis of relationships between traits.

Results

Thirty-eight (63%) from the 60 superovulated, females produced 1092 viable 8-cell stage embryos. The developmental capacity of the 8-cell embryos after been submitted to sublethal stress (P1 and P2) are presented in table 2, and they were similar to the control groups (CE and CB).

Table 1. PCR primers and Gene Bank accession numbers for genes analyzed in *Mus musculus*.

Transcripts	Primer sequences (5' - 3')	Gen Bank Accession
BAX	F- CCAGGATGCGTCCACCAAGAAG	NM_007527
	R- GGAGTCCGTGTCCACGTCAGC	
BCL2	F- GATGACTTCTCTCGTCGCTACC	NM_009741.3
	R- CATCCCTGAAGAGTTCCTCCAC	
GLUT1	F- CCAGCTGGGAATCGTCGTT	M23384
	R- CAAGTCTGCATTGCCCATGAT	
GLUT3	F- CTCTTCAGGTCACCCAACACTACGT	X61093
	R- CCGCGTCCTTGAAGATTCC	
IGF1	F- TCA TGT CGT CTT CAC ACC TCT TCT	NM_001111276.1
	R- CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCA T	
IGF2	F- GGGAGCTTGTTGACACGCTT	NM_001122736.1
	R- GCACTCTTCCACGATGCCA	
IGF1-R	F- GCTTCTGTGAACCCCGAGTATTT	BC138869.1
	R- TGGTGATCTTCTCTCGAGCTACCT	
IGF2-R	F- GGG AAG CTG TTG ACT CCA AAA	NM_010515.2
	R- GCA GCC CAT AGT GGT GTT GAA	
SOD2	F- ACA CAT TAA CGC GCA GAT CA	NM_013671.3
	R- AAT ATG TCC CCC ACC ATT GA	
HSP70.1	F- TTGTCCATGTTAAGGTTTTGTGGTATA	M35021.1
	R- GTTTTTTTCATTAGTTTGTAGTGATGCAA	
AQP3	F- TGGTGGCTTCCTCACCATCAA	AF104417.1
	R- AGCCCAAAAACAATCCCAGC	
PPIA	F- CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	NM_008907
	R- TGTAAGTCACCACCCTGGCACAT	

Table 2. Embryo *in vitro* development to the blastocyst stage after been exposed to sublethal stress.

Experimental Groups	8-cell	Blastocyst	
	N	N	%
P1	253	245	96.4
P2	269	253	94.0
CE	262	249	95.0
CB	261	249	95.4

Blastocyst re-expanded rates after freezing/thawing are showed at the table 3. The blastocysts of the group P1 re-expanded more efficiently than the blastocysts of the control group CE. The blastocysts of the 3 others groups showed similar survival rates characterized by re-expansion.

Table 3. Blastocyst survival rate after been exposed to sublethal stress and freezing.

Experimental Groups	Blastocysts	Expanded blastocysts	
	N	N	%
P1	73	63 ^a	86.3
P2	95	76 ^{ab}	80.0
CE	92	67 ^b	72.8
CB	110	92 ^{ab}	83.6

a:b = P<0.05

Taking into account the gene up-regulation, no major differences in gene expression were observed among treatment groups for most genes analyzed in this study, likely due to the biological variability in groups of embryos within each group.

The figure 1 shows that BAX relative expression on the blastocysts before freezing was similar to the 8-cell stage, characterizing a basal profile, without sublethal stress influence. On the other hand the BAX expression on the blastocyst who are

derived from the 8-cell stage exposed to HGP reveal a modified relative gene expression profile.

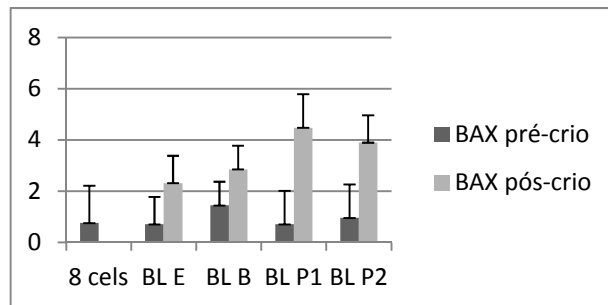


Figure 1: Blastocyst cells relative expression of BAX gene

A similar BAX gene relative expression (figure 1) could be observed with GLUT 1 gene relative expression (figure 2). At the 8-cell stage it seems to be down-regulated, and after *in vitro* culture during 48 h the blastocysts of all experimental groups showed an up-regulation. And when we looked after freezing this up-regulation seems to be stronger.

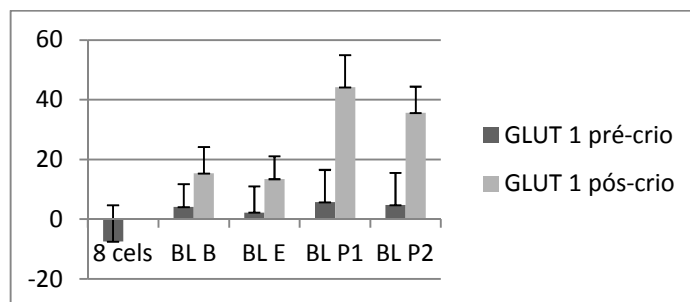


Figure 2: Blastocyst cells relative expression of GLUT 1 gene

The relative GLUT-3 gene expression (figure 3) also showed similar pattern as the BAX gene (figure 1) and GLUT-1 gene (figure 2) At the 8-cell stage it seems to be down-regulated, and after *in vitro* culture during 48 h the blastocysts of all experimental groups showed an up-regulation. And when we looked after freezing this up-regulation was even stronger.

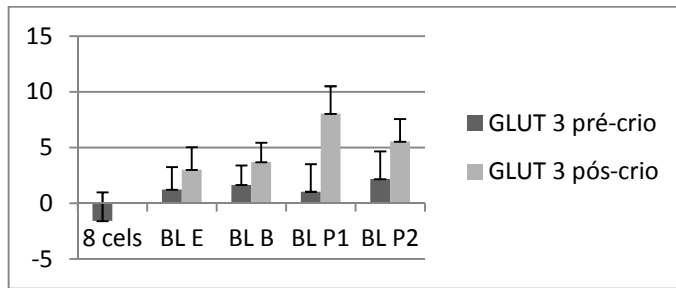


Figure 3: Blastocyst cells relative expression of GLUT 3 gene

When we looked at the IGF 2-R gene relative expression at the 8-cell stage (figure 4) it was up-regulated, on the other hand looking at the blastocysts of control and exposed to sublethal stress these gene expressions were down-regulated.

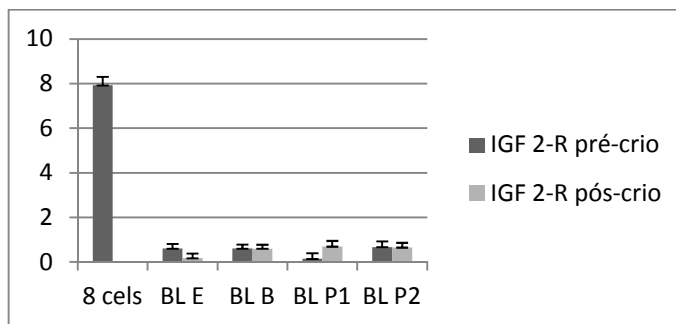


Figure 4: Blastocyst cells relative expression of IGF 2-R gene

The data of IGF 2 gene relative expression (figure 5) shows at 8-cell stage embryos a basal level, and after *in vitro* culture during 48 h the blastocysts of all experimental groups showed an up-regulation. And when we looked after freezing this up-regulation was even stronger.

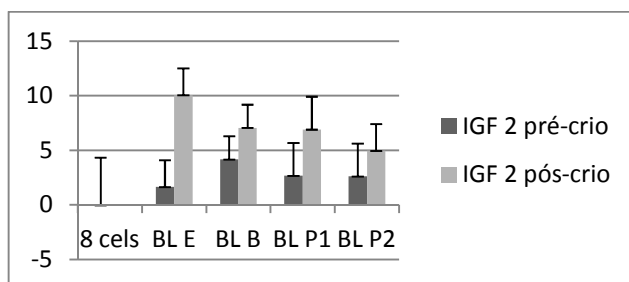


Figure 5: Blastocyst cells relative expression of IGF 2 gene

The figure 6 shows that the relative expression of SOD 2 gene was down-regulated after blastocyst freezing, stronger on the blastocysts derived from 8-cell embryos exposed to HGP.

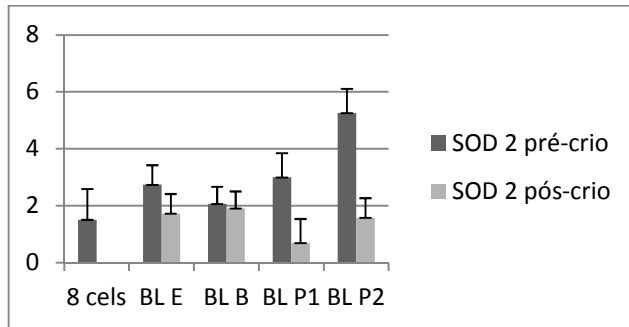


Figure 6: Blastocyst cells relative expression of SOD 2 gene

The AQP 3 gene relative expression (figure 7) appears up-regulated on 8-cell embryos and shows a down-regulation on the blastocysts after 48 h *in vitro* culture and also after freezing.

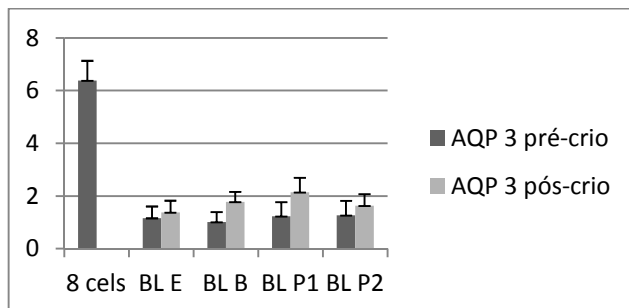


Figure 7: Blastocyst cells relative expression of AQP 3 gene

Discussion

Over the last 40 years basic research has sought to identify the most appropriate and efficient approach for the cryopreservation of mammalian embryos produced *in vivo* or *in vitro*. Experiments were conducted looking at techniques that could minimize cell ultra structural damage due to the cooling and heating processes. The researchers' aims are to achieve embryo survival rates, which could support economic and commercial use of cryopreservation. At the same time different assisted reproductive technologies (ART) were developed with the goal to better understand

mammalian reproductive physiology. Preserve gametes and embryos as genome resource still a challenge, and among them maintain *in vivo* and *in vitro* produced embryos successfully out of the female reproductive tract. Another important point is to adjust environment to minimize the harmful effects of *in vitro* conditions on gametes and embryos metabolism and physiology.

Based on the principles already described by food preparation for conservation, as the data published by Hite (1899 and 1914) during the late nineteenth century and early twentieth century, Wemekamp - Kamphuis *et al.* (2002) in an elegant experiment observed that colonies of *Listeria monocytogenes* previously subjected to thermal shock and subsequently exposed to HHP, showed a significant increase of so-called CSPs. The expression of the genes responsible for the production of these proteins was characterized by a response to a stressful situation, giving a higher rate of survival to bacterial strains. Previously Walker *et al.* (1990) have already demonstrated that *Listeria monocytogenes* had the ability to survive exposure to different environmental stress factors, such as osmotic pressure and low temperatures.

During the last years different experiments showed the efficiency of the HHP to induce embryonic cell sublethal stress and enhance freezing survival rates (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Many aspects are involved with this novel approach to prepare the cell machinery response to sublethal stress like cryopreservation. The amount of pressure, the time of exposure, the specie, the embryo development stage are examples of variables that need to be take into account (BLOCK *et al.*, 2010). Looking at the devices developed for this purpose using hydrostatic pressure to induce cellular sublethal stress, almost all have a great size, are heavy and usually are not easy to transport (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Our research group has adapted a pressure gas chamber to expose mammalian embryos to HGP, and initial experiment has been conducted with canine oocytes (RODRIGUES *et al.*, 2012). The first experiment was designed to look at the 8-cell embryo survival and development capacity after been exposed to HGP (15,7 MPa) during 2 or 4 h (table 2). The data showed similar results among the experimental groups, around 95% of the 8-cell embryos could achieve the blastocyst stage after 48 h *in vitro* culture. These results obtained with the embryo exposition to HGP (15.7 MPa) are close to the data published by Bock *et al.* (2010), who have exposed 2-cell mice embryos to HHP range from 20 to 80 MPa, during 60 or

120 min. The 2-cell embryos exposed to 20 MPa during 120 min. have achieved the following percentages of development to the blastocyst stage: CE (93%), CB (85%), P (20MPa/120 min) (70%). Take into account the *in vitro* development rates observed in our experiment, we can point out the harmfulness of HGP (15 MPa - N₂ gaseous pressure) to induce sublethal cell stress on 8-cell stage murine embryos.

The embryos that achieved the blastocyst stage were then submitted to cryopreservation to verify if the sublethal cell stress was effective to promote one later stress response, after 48 h of *in vitro* culture. The embryos exposed to 15.7 MPa during 120 min. (P1) (table 3) have showed a better survival rate (86,3%) than the embryos *in vitro* cultured directly after collection (CE) (72.8%). Interestingly is the observation that the embryos maintained as control at room temperature (CB) could achieve a similar survival rate (83.6) as the groups of embryos exposed to the HGP (P1 = 86.3% and P2 = 80.0%), however this percentage was also similar to survival rate of the CE embryos (72.8%). One explanation for this embryo comportment, measured by the blastocyst cryopreservation survival rate, is the stress situation to stay at room temperature during 4 h, that these embryos at the 8-cell (48 h before) were submitted. Taking into account the blastocyst survival rates we can highlight that the previous embryo exposition to 15,7 MPa during 120 min. at 8-cell stage was effective to promote a sublethal embryo cell stress. One major barrier that we need to overcome is the N₂ gaseous maximal cylinder pressure (22 MPa) that provides the gas to fill the pressure chamber. For the forthcoming experiments we will try to achieve different N₂ gaseous pressures, that allows to obtain new data about embryo *in vitro* and *in vivo* survival rates

Looking at the relative gene expression we have measured the basal level at 8-cell stage aiming to evaluate this observation together with the data obtained from the blastocysts before and after cryopreservation. No major differences in gene expression were observed between treatment groups for most genes analyzed in this study, likely due to the biological variability in groups of embryos within each group. BAX relative expression on the blastocysts (figure 1) not exposed to the HGP was similar to the 8-cell stage, characterizing a basal profile, without sublethal stress influence. On the other hand the HGP exposed blastocysts reveal a modified relative gene expression profile. This gene profile alteration could be produced by the sublethal cell stress effect induced by the HGP at 8-cell stage. When we looked at the IGF 2-R gene relative expression

(figure 4), at the 8-cell stage it is up-regulated, however looking at the blastocysts of control and exposed to sublethal stress this increase in gene expression could not be observed. Probably caused by a stop in growing as response to the cellular stress. The relative gene expression profiles of GLUT- 1 and GLUT-3 measured at the 8-cell stage it seems to be down-regulated, and after *in vitro* culture during 48 h the blastocysts of all experimental groups showed an up-regulation. And when we looked after freezing this up-regulation was even stronger. The experimental results showed that HGP can be used to induce sublethal cell stress in murine embryos, without negative impact on development viability. However, the relative gene expression measured in this experiment could not detect one direct influence of the sublethal cell induced stress by HGP on the transcriptional response. And also improvement of the blastocyst freezing survival efficiency could not definitely be confirmed by the experimental results.

References

- ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. **Pressure-regulated metabolism in microorganisms**. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 7, p. 447-453, 1999.
- BAPTISTA, L. P. C.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J. L. **Variabilidade na produção de embriões de *Mus domesticus domesticus***. Ars Veterinaria, Jaboticabal, vol. 21, p. 101-108, 2005.
- BOCK, I.; LOSONCZI, E.; MAMO, S.; POLGAR, Z.; HARNOS, A.; DINNYES, A.; PRIBENSZKY, C. **Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance**. Cryo-letters, Cambridge, v. 31, p. 401–412, 2010.
- 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, 1899.
- HITE, B.; 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
- 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, p. 143–150, 2005.
doi:10.1016/j.anireprosci.2004.09.007

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, p. 690-697, 2010. doi:10.1095/biolreprod.110.083386

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, p. 48–55, 2011. doi:10.1071/RD10231

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, C.A.; SALVIANO, M.B.; WILLHELM, B.R.; COLLARES, F.J.F.; RODRIGUES, J.L. **High Gaseous Pressure Pretreatment in *in vitro* Maturacion of Canine Oocytes.** In: INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2013, Hannover. Reproduction, Fertility and Development. Melbourne, v. 25, p. 282-283, 2012. doi:10.1071/RDv25n1Ab270

WALKER, S.J.; ARCHER, P.; BANKS, J.G. **Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures.** Journal of Applied Microbiology, Oxford, v. 68, p. 157–162, 1990. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x

WEMEKAMP-KAMPHUIS, H.H.; KARATZAS, A.K.; WOUTERS, J.A.; ABEE, T. **Enhanced levels of cold-shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, p. 456–463, 2002.

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, 1979.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, F.; KATO, C.; HORIKOSHI, K. **Pressure-regulated metabolism in microorganisms**. Trends in Microbiology, Cambridge, v. 7, p. 447-453, 1999.
- ARYA, A.; SHERGILL, I.S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H.R.H. **Basic principles of real-time quantitative PCR**. Expert Review of Molecular Diagnostics, London, v. 5, p. 209-219, 2005. doi:10.1586/14737159.5.2.209
- BAPTISTA, L. P. C.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J. L. **Variabilidade na produção de embriões de *Mus domesticus domesticus***. Ars Veterinaria, Jaboticabal, vol. 21, p. 101-108, 2005.
- BERTOLINI, M. Dissertação de Mestrado: **Sobrevivência *In vitro* e *in vivo* de embriões *Mus musculus* vitrificados**. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 1994.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. ***In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol**. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v.33, p. 245-251, 2005.
- BOCK, I.; LOSONCZI, E.; MAMO, S.; POLGAR, Z.; HARNOS, A.; DINNYES, A.; PRIBENSZKY, C. **Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance**. Cryo-letters, Cambridge, v. 31, p. 401–412, 2010.
- CAMARGO, L.S.A.; BOITE, M.C.;WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G.B.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; VIANA, J.H.M.; NOGUEIRA, L.A.G; **Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced *in vitro***. Cryobiology, San Diego, v. 63, p. 256–262, 2011. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.09.135
- CHEUICHE, Z. M. G. Dissertação de Mestrado: **Vitrificação de embriões *Mus musculus domesticus* envasados em microcapilares de quartzo**. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2010.
- CHEUICHE, Z.; ARRUDA, N. S.; COSTA, A.; MARQUES, L.S.; OSUNA, A.N.; RODRIGUES, J.L. **Princípios da crioconservação de embriões mamíferos**. A Hora Veterinária, Porto Alegre, v. 31, p. 53-59, 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. **Animais de laboratório: o camundongo**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, São Paulo, v.28, p.11-23, 2007.

EDASHIGE, K.; OHTA, S.; TANAKA, M.; KUWANO, T.; VALDEZ JR., D.M.; HARA, T.; JIN, B.; TAKAHASHI, S.; SEKI, S.; KOSHIMOTO, C.; KASAI, M. **The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae**. Biology of reproduction, Champaign, v. 77, p. 365–375, 2007. doi:10.1095/biolreprod.106.059261

HAMDOUN , A.; EPEL D. **Embryo stability and vulnerability in an always changing world**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 104, p. 1745–1750, 2007. doi: 10.1073/pnas.0610108104

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, 1899.

HITE, B.; 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. 146, p. 1–67, 1914.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL JR., G.E. **Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions**. Biology of Reproduction, Champaign, v. 78, p. 2–12, 2008. doi 10.1095/biolreprod.107.064113

MEZZALIRA, A.; PINZON, J.E.; PINTO, M.G.L.; SILVA, A.M.; OHLWEILER, L.U.; KLEIN, N.; GOETTEN, A.L.F.; MAZZAQUATRO, F.D.; MEZZALIRA, J.C. **Tratamento de oócitos com pressão negativa melhora a taxa de blastocistos eclodidos**. In: Reunião Anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 26, 2012, Foz do Iguaçu. Resumos. Foz do Iguaçu, 2012. p. 485.

NOWSHARI, M.A.; NAYUDU, P.L.; HODGES J.K. **Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes**. Theriogenology, Stoneham, v. 42, p. 1193-1204, 1994.

NOWSHARI, M.A.; BREM, G. **Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of expanded mouse blastocysts frozen by a simple rapid-freezing procedure.** Theriogenology, Stoneham, v. 50, p. 1001-1013, 1998.

PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. **Cold-shock response and cold-shock proteins.** Current Opinion in Microbiology, Oxford, v. 2, p. 175-180, 1999.

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

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; ULRICH, P.; BARBOSA, C.; HATAMOTO, L.; SANTOS, C. **Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation.** Reproduction in Domestic Animals, Berlin, v. 40, p. 338–344, 2005a. doi:10.1111/J.1439-0531.2005.00589.X

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, p. 143–150, 2005b. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.09.007

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, p. 690-697, 2010. doi:10.1095/biolreprod.110.083386

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, p. 48–55, 2011. doi:10.1071/RD10231

RAFFERTY, JR.K.A. **Methods in experimental embryology of the mouse.** Baltimore, The Johns Hopkins Press, 1970, p. 94.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos.** In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo, Varela, 2002, Capítulo 8, p. 127-177.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, C.A.; SALVIANO, M.B.; WILLHELM, B.R.; COLLARES, F.J.F.; RODRIGUES, J.L. **High gaseous pressure pretreatment in *in vitro* maturation of canine oocytes.** In: INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2013, Hannover. *Reproduction, Fertility and Development*. Melbourne, v. 25, p. 282-283, 2012. doi:10.1071/RDv25n1Ab270

SIQUEIRA FILHO, E. Dissertação de Mestrado: **Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos.** Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2009.

SUCKOW, M.A.; DANNEMAN, P.; BRAYTON, C. **The Laboratory Mouse.** Notre Dame, CRC Press, 2001, p. 168.

TRIGAL, B.; MUÑOZ, M.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J.N.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; CASAIS, R.; DIEZ, C. **Cell counts and survival to vitrification of bovine *in vitro* produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure.** *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 48, p. 200–206, 2013. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02131.x

VALDEZ, C. A.; ABAS MAZNI, O.; TAKAHASHI, Y.; FUJIKAWA, S.; KANAGAWA, H. **Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution.** *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 96, p. 793–802, 1992.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. **Transferência direta de embriões bovinos congelados e descongelados.** *Theriogenology*, Stoneham, v. 37, p. 23-37, 1992.

WALKER, S.J.; ARCHER, P.; BANKS, J.G. **Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures.** *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 68, p. 157–162, 1990. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x

WEMEKAMP-KAMPHUIS, H.H.; KARATZAS, A.K.; WOUTERS, J.A.; ABEE, T. **Enhanced levels of cold-shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, p. 456–463, 2002.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. **Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C .** *Science*, Washington, v.178, p.411-414, 1972. doi: 10.1126/science.178.4059.411

WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. ***In vitro* storage of cattle embryos**. In: Control of reproduction in the cow. Martinus Nijhoff Ed., Hague, p. 427-436, 1978.

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, Great Britain, v. 2, p. 1071-1079, 1972.

WOUTERS, J.A.; JEYNOV, B.; ROMBOUTS, F.M.; VOS, W.M.; KUIPERS, O.P.; ABEE, T. **Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactobacillus lactis* MG1363 in cryoprotection**. Microbiology, Reading, v. 145, p. 3185–3194, 1999.

YAMANAKA, K.; FANG, L.; INOUE, M. **The CspA family in *Escherichia coli* : multiple gene duplication for stress adaptation**. Molecular Microbiology, Salem, v. 27(2), p. 247–255, 1998.

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, 1979.

5. ANEXOS

Anexo A

Número de animais utilizados no experimento

Número de fêmeas

	Superovuladas	Copuladas	Doadoras de embriões
FÊMEAS	60	45	38

Número de machos

	Número total	Descartado por falha reprodutiva
Machos	14	1

Anexo B**PROTOCOLO DO MEIO KSOM (50 mL)**

Componentes	mg	PM	mM
NaCl	277,5	58,46	95,00
KCl	9,3	74,56	2,50
CaCl ₂ 2H ₂ O	12,5	147,02	1,71
NaHCO ₃	105,0	84,02	25,00
Piruvato de Sódio	1,1	110,00	0,20
Lactato de Sódio	56,0	112,10	10,00
Glicose	1,8	180,02	0,20
EDTA	0,2	292,20	0,01
Glutamina	7,3	146,10	1,00
Vermelho fenol	0,5	-	0,01 (g/L)
Agrovet	7,8	-	-
KH ₂ PO ₄	2,3	136,09	0,35
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,4	246,48	0,20
BME amino acid solution 50x	1mL	-	-
MEM non-essential amino acid solution 100x	0,5mL	-	-
H ₂ O milli-Q	q.s.p. 50mL	-	-

Na hora do uso:

- Filtrar para um frasco com 0,4% de BSA.

Anexo C

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 21

Número de Fêmeas: 10

Data de chegada das fêmeas: 13/03

Números das placas negativas: 14, 18,21

COLETA

Data de coleta: 05/04

Data FSH: 31/03

Hora de início da coleta: 09:05

Hora de término da coleta: 10:50

TOTAL de horas: 1:45

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	13		3	18	13	34
2	15		±5	±35		±40
3	16			3	93	96
4	17		2	8	65	75
5	19		1	16	46	63
6	20			4	61	65
7	22		1	3	37	41
8	14	X				
9	18	X				
10	21	X				
	TOTAL		±12	±87	315	±414

EG_i(PBS+0,1%PVP): 6

Botijão: 3(canino)

Canister: 1

Obs.: Substituição do macho 14 pelo 23 por motivo de 3 placas negativas consecutivas.

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões colocados	77	78	77	CULTIVO
Nº embriões retirados	74	78	77	
Temperatura início	36 °C		27 °C	
Temperatura final	33 °C		28 °C	
Hora de início	11:14			
Hora de término	13:14	15:14		
Total de horas	2:00	4:00		

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'15"

Temp. retorno à pressão: 5'25"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'25"

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	74	78	77	77
Hora de início	14:05	16:01	16:01	11:48
Placa	3A	3A	1A	2ª
Gota	1(37) 2(37)	3(39) 4(39)	1(38) 2(39)	1(26) 2(25) 3(26)

AVALIAÇÃO Dia: 07/04 Hora: 8:15(CB e CE) e 12:08(P1 e P2)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	1	3		
Mo		1		
Bl inicial		6	5	1
Bl	5	1	6	5
BE	26	36	39	43
B em eclosão	37	25	24	24
Eclodido	5	6	3	4
Total de horas	46:03	44:07	40:14	44:27
% de viáveis	98,64%	96,15%	100%	100%
EG _M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 21

Botijão: 3(canino)

Canister: 1

P1-6 tubos pq um não contem embrião

Retorno ao cultivo:

Dia: 07/04

Hora: 8:50

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados				
Mo		1		
Bl inicial		6	5	1
Bl	5	1	6	5
BE				
B em eclosão	32	20	19	19
Eclodido				

Avaliação: Dia: 10/04

Hora: 13:45

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	32	21	26	17
Degenerados	5	7	4	8
% eclodidos	86,48%	75%	86,6%	68%

Exposição ao Etilenoglicol:

	P1	P2	B	E
Nº	5-5-5-5-5	6-6-6-6-6-6	6-6-6-7-7-7	7-7-7-7-7-8
Hora	13:16	13:08	09:09	09:17
Tampa	Rosa, azul, roxo	Verde, azul grande	Branco	Amarelo

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Mo		
Bl		
BE	39	43
TOTAL	39	43

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 07/04 Início: 09:27 (22,4 °C) Seeding: 09:42 Término: ±11:35 Total de horas: ±1:53

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2
Mo		
Bl		
BE	25	36
TOTAL	25	36

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 07/04 Início: 13:25 (22,1 °C) Seeding: 13:40 Término: 15:31 Total de horas: 1:51

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 03/05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	12:10-12:20	11:30-11:50	12:40-12:55	10:45-11:00
Nº na palheta	5-5-5-5-5	6-6-6-6-6-6	7-7-6-7-6-6	8-7-7-7-7-7
Nº achado	5-5-5-4-4	0-6-6-6-6-6	7-7-6-7-6-6	8-6-7-7-7-7

Perdi dois sem zona na lavagem

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	23	28	39	42
Hora de início	12:37	12:07	13:10	11:22
Placa	3	5	3	5
Gota	1(11+1SZ) 2(9+2SZ)	3(11+3SZ) 4(12+2SZ)	3(19) 4(19+1SZ)	1(19+2SZ) 2(20+1SZ)

SZ = sem zona

AValiação (P1 – 30:03h.) (P2 – 30:33h.) (B – 29:30h.) (E – 31:18h.) Dia: 04/05 Hora: 18:40-19:00

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	1	1	7	5	
Reexpandidos	14+2SZ	16+1SZ	23	20+3SZ	
Degenerados	5+1SZ	6+4SZ	8+1SZ	14	
% reexpansão	73,91%	64,29%	76,92%	66,67%	
EG _F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.:

AValiação (P1 – 53:33h.) (P2 – 54:03h.) (B – 53:00h.) (E – 54:48h.) Dia: 05/05 Hora: 18:10-18:45

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	3	3	7	6	
Degenerados	12(+5 +3SZ)	14 (+6+5SZ)	23 (+8+1SZ)	19 (+14+3SZ)	
% eclodidos	20%	17,65%	23,33%	24%	
EG _F	3ecl+2re	3ecl+2re	5ecl	5ecl	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.

Anexo D

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 22

Número de Fêmeas: 10

Data de chegada das fêmeas: 20/03

Números das placas negativas: 15,18

COLETA

Data de coleta: 06/04

Data FSH: 1º/04

Hora de início da coleta: 8:37

Hora de término da coleta: 9:33

TOTAL de horas: 00:56

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	13		3	2	36	41
2	16			15	36	51
3	17				20	20
4	19		X	X	17	-
5	20		X	X	14	-
6	21			17	9	26
7	22			X		-
8	23			X		-
9	15	X				
10	18	X				
TOTAL			-	-	132	-

EG_i(PBS+0,1%PVP): 6

Botijão: 3(canino)

Canister: 1

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões colocados	32	34	31	CULTIVO
Nº embriões retirados	32	34	31	
Temperatura início	37 °C		26 °C	
Temperatura final	32,5 °C		26,5 °C	
Hora de início	9:56			
Hora de término	11:56	13:56		
Total de horas	2:00	4:00		

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'10"

Temp. retorno à pressão: 5'10"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'30"

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	32	34	31	31
Hora de início	12:35	14:53	14:53	10:32
Placa	1B	1B	2B	2B
Gota	1(16) 2(16)	3(17) 4(17)	3(15) 4(16)	1(15) 2(16)

1 já degenerado

2 já degenerados

AVALIAÇÃO Dia: 08/04 Hora: 11:00

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	1	3	3	3
Mo		2	1	1
Bl inicial	2	1		
Bl	3	2	2	
BE	13	14	16	12
B em eclosão	11	10	8	13
Eclodido	2	2	1	2
Total de horas	46:25	44:07	44:07	48:28
% de viáveis	96,87%	91,17	90,32	90,32
EG _M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 19

Botijão: 3(canino)

Canister: 1

(perdi 1 na lavagem)

Retorno ao cultivo: Dia: 08/04 Hora: 11:40

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados				
Mo		2	1	1
Bl inicial	2	1		
Bl	3	2	2	
BE				
B em eclosão	6	5	3	8
Eclodido				

Avaliação: Dia: 10/04 Hora: 14:00

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	6	6	1	9
Degenerados	4	4	5	0
% eclodidos	60%	60%	16,66%	100%

Exposição ao Etilenoglicol:

	P1	P2	B	E
Nº	6+6	7+7	5+5+5	5+6
Hora	12:18	12:22		12:08
Tampa	Azul	Verde	Branco	amarelo

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Bl				
BE	12	14	15	11
TOTAL	12	14	15	11

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 08/04 Início: 12:29 (22,1 °C) Seeding: 12:42 Término:

Total de horas:

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 03/04

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	13:25-13:30	13:30	13:34-13:40	13:41-13:45
Nº na palheta	6+6	7+7	5+5+5	6+5
Nº achado	0+6	7+0	5+5+5	6+5

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	6	7	15	11
Hora de início	14:17	14:17	14:17	14:17
Placa	4	1	1	4
Gota	3(3) 4(3)	1(4) 2(3)	3(7) 4(8)	1(5+1s/z) 2(5)

SZ = sem zona

AVALIAÇÃO 28:48h.

Dia: 04/04

Hora: 19:05-19:15

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos					
Reexpandidos	4	5	12	6	
Degenerados	2	2	3	4+1SZ	
% reexpansão	66,67%	71,43%	80%	54,55%	
EG_F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

AVALIAÇÃO 53:03h.

Dia: 05/05

Hora: 19:20-19:35

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos			1		
Degenerados	4 (+2)	5 (+2)	11 (+3)	6 (+4+1SZ)	
% eclodidos	0%	0%	08,33%	0%	
EG_F	4 reexp	3 reexp	1ecl+4reesp	5reexp	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 17

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.

Anexo E

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 23

Número de Fêmeas: 11

Data de chegada das fêmeas: 20/03

Números das placas negativas: 18,23

COLETA

Data de coleta: 09/04

Data FSH: 04/04

Hora de início da coleta: 09:08

Hora de término da coleta: ±11:50

TOTAL de horas: ±02:42

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	13			1	34	35
2	15		1	8	60	69
3	16			8	20	28
4	17			5	66	71
5	19			3	16	19
6	20			1	2	3
7	21			6	8	14
8	22				32	32
9	23		1	3	15	19
10	23	X				
11	18	X				
	TOTAL		2	35	253	290

EG₁(PBS+0,1%PVP): 8

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

1 dos 3 criotubos caiu no chão e virou solução.

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões colocados	59	63	61	CULTIVO
Nº embriões retirados	(54)	63	61	
Temperatura início	37 °C		24,5 °C	
Temperatura final	33 °C		25 °C	
Hora de início	12:13			
Hora de término	14:13	16:13		
Total de horas	02:00	04:00		

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'20"

Temp. retorno à pressão: 5'04"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'15"

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

→ KSOM da lavagem
estava muito roxo

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	53	62	61	(61)
Hora de início	15:22	17:19	17:19	12:41
Placa	2	2	1	1
Gota	1(27) 2(27)	3(32) 4(30)	3(31) 4(30)	1(30) 2(31)

AVALIAÇÃO – a placa 2 tinham 2 gotas fora dos poços

Dia: 11/04

Hora: 8:40

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados		1	3	2
Mo				
Bl inicial		1		
Bl				
BE	18	26	29	19
B em eclosão	32	32	28	34
Eclodido	3	2	1	6
Total de horas	41:18	39:21	39:21	43:59
% de viáveis	100%	98,38%	95,08%	96,66%
EG _M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

Retorno ao cultivo:

Dia: 11/04

Hora: 09:28

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados		1	3	2
Mo				
Bl inicial		1		
Bl				
BE				
B em eclosão	27	27	23	29
Eclodido	3	2	1	6

Avaliação:

Dia: 16/04

Hora: 16:30

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	24	24	13	24
Degenerados	5	6	14	13
% eclodidos	82,76%	80%	48,15%	64,86%

Exposição ao Etilenoglicol:

	P1	P2	B	E
Nº	6-6-5	6-6-5-5	6-6-6-6	6-6(5)
Hora				
Tampa	verde	amarelo	branco	Azul/azul fraco

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Bl				
BE	17	22	24	17
TOTAL				

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 11/04 Início: 10:08 (22 °C) Seeding: 10:22 Término: 12:14 Total de horas: 02:06

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 06/05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	14:05-14:10	13:20-13:30	14:10-14:17	13:31-13:37
Nº na palheta	5-6-6	6-5-5-6	6-6-6-6	6-5-6
Nº achado	5-6- 0	6-5-5-6	6-6-6-6	6-4-6

→ Estourou

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	11	22	24	16
Hora de início	14:33	14:00	14:33	14:00
Placa	4	3	4	3
Gota	1(6) 2(5)	1(11) 2(11)	3(12) 4(12)	3(6+2SZ) 4(8)

SZ = sem zona

AVALIAÇÃO (P1 e E – 27:40h.) (P2 e B – 27:07h.)

Dia: 07/05

Hora: 17:40-18:12

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	1	2	10	1	
Reexpandidos	10	16	14	10+1SZ	
Degenerados		4		3+1SZ	
% reexpansão	100%	81,82%	100%	75%	
EG_F	1ecl+4re	2ecl+3re	2ecl+3re	1ecl+4re	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 2(canino)

Canister: 2

AVALIAÇÃO (P1 e E – 44:10h.) (P2 e B – 43:37h.)

Dia: 08/05

Hora: 10:10

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos		4	9	1	
Reexpandidos	1	5	4	2	
Degenerados	5	4 (+4)	6	3 (+3+2SZ)	
% eclodidos	0%	30,77%	47,37%	11,11%	
EG_F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.

Anexo F

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 24

Número de Fêmeas: 10

Data de chegada das fêmeas: 27/03

Números das placas negativas: 23, 15, 18

COLETA

Data de coleta: 16/04

Data FSH: 11/04

Hora de início da coleta: 09:00

Hora de término da coleta: 10:55

TOTAL de horas: 01:55

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	13		1	9	36	46
2	16	X				
3	17			4	31	35
4	19		3	17+19(4cels)	10	49
5	20		4	32	43	79
6	21				12	12
7	22			3	14	17
8	23	X				
9	15	X				
10	18	X				
	TOTAL		8	84	146	238

EG_i(PBS+0,1%PVP): 6

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões colocados	33	33	32	CULTIVO
Nº embriões retirados	33	33	32	
Temperatura início	37 °C		22 °C	
Temperatura final	31 °C		23 °C	
Hora de início	11:18			
Hora de término	13:18	15:18		
Total de horas	2:00	4:00		

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'10"

Temp. retorno à pressão: 5'45"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'25"

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	33	33	32	32
Hora de início	14:02	16:10	16:10	11:43
Placa	③	4	2	2
Gota	1(16) 2(17)	1(16) 2(17)	3(16) 4(16)	1(16) 2(16)

▶ Gotas mais avermelhadas

AVALIAÇÃO Dia: 18/04 Hora: 8:08 cor das gotas voltaram ao normal

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	1	1		1
Mo	1	1	1	2
Bl inicial		1	1	
Bl			1	
BE	12	13	7	8
B em eclosão	15	16	22	19
Eclodido	4	1		2
Total de horas	42:06	39:58	39:58	44:25
% de viáveis	96,96%	96,96%	100%	96,87%
EG _M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

Retorno ao cultivo: Dia: 18/04 Hora: 08:47

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	1	1		1
Mo	1	1	1	2
Bl inicial		1	1	
Bl				
BE				
B em eclosão	10	11	17	14
Eclodido	4	1		2

Avaliação: Dia: 22/04 Hora: 16:50

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	12	12	14	14
Degenerados	4	3	5	5
% eclodidos	75%	80%	73,68%	73,68

Exposição ao Etilenoglicol:

	P1	P2	B	E
Nº	6-6	4-4-5	4-4	4-4
Hora	9:10	9:19	9:14	9:16
Tampa	verde	azul	branco	amarelo

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Bl			1	
BE	12	13	7	8
TOTAL	12	13	8	8

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 18/04 Início: 09:26 (18,2 °C) Seeding: 9:39 Término: 11:31 Total de horas: 02:05

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 06/05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	14:53-14:57	14:44-14:48	14:48-14:53	14:59-15:02
Nº na palheta	6-6	5-4-4	4-4	4-4
Nº achado	6-6	5-4-4	4-4	4-4

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	12	13	8	8
Hora de início	15:25	15:25	15:25	15:25
Placa	1	2	2	1
Gota	1(6) 2(6)	1(7) 2(6)	3(4) 4(4)	3(4) 4(3+1SZ)

SZ = sem zona

→ destroi um.

AVALIAÇÃO 27:25h.

Dia: 07/05

Hora: 18:50-19:12

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	②	2	2	1	
Reexpandidos	10	8	6	5	
Degenerados		3		1+1SZ	
% reexpansão	100%	76,92%	100%	75%	
EG _F	1eclo+4re	2eclo+3re	2+3re	1eclo+4	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 2(canino)

Canister: 2

AVALIAÇÃO 43:25h.

Dia: 08/05

Hora: 10:50

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos					
Reexpandidos	2	3			
Degenerados	4	2 (+3)	3	1 (+1+1SZ)	
% eclodidos	0%	0%	0%	0%	
EG _F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.

Anexo G

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 25

Número de Fêmeas: 10

Data de chegada das fêmeas: 27/03

Números das placas negativas: 15, 26

COLETA

Data de coleta: 23/04

Data FSH: 18/04

Hora de início da coleta: 8:30

Hora de término da coleta: ±10:35

TOTAL de horas: ±2:05

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	13			3	18	21
2	17			7	32	39
3	18		14	53	1	68
4	19		8	16		24
5	20		1	2	6	9
6	21			12	46	58
7	22			24	34	58
8	25			3	4	7
9	15	X				
10	26	X				
TOTAL			23	120	141	284

EG₁(PBS+0,1%PVP): 6

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2
Nº embriões colocados	33	34
Nº embriões retirados	33	34
Temperatura início	37 °C	
Temperatura final	34,5 °C	
Hora de início	10:47	
Hora de término	12:47	14:47
Total de horas	2:00	4:00

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'13"

Temp. retorno à pressão: 5'50"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'12"

CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
32	CULTIVO
32	
23,5 °C	
26,5 °C	

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	33	34	32	33
Hora de início	13:27	15:17	15:17	11:15
Placa	3	3	1	1
Gota	1(17) 2(16)	3(17) 4(17)	3(16) 4(16)	1(16) 2(17)

AVALIAÇÃO Dia: 25/04 Hora: 7:25

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	2	2	1	2
Mo	1	2		
Bl inicial		2		1
Bl	3	1	4	1
BE	7	4	8	3
B em eclosão	20	21	19	25
Eclodido		2		1
Total de horas	41:58	40:08	40:08	44:10
% de viáveis	93,93%	94,12%	96,87%	93,93%
EG_M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

Retorno ao cultivo: Dia: 25/04 Hora: 08:08

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados	2	2	1	2
Mo	1	2		
Bl inicial		2		1
Bl				
BE				
B em eclosão	15	16	14	20
Eclodido		2		1

Avaliação: Dia: 29/04

Hora: 15:00

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	12	15	10	18
Degenerados	6	9	5	6
% eclodidos	33,33%	62,5%	66,66%	75%

Exposição ao Etilenoglicol:

	P1	P2	B	E
Nº	5-5	2-3	6-6	2-2
Hora	8:29	8:31	8:26	8:34
Tampa	azul	verde	branco	amarelo

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Bl	3	1	4	1
BE	7	4	8	3
TOTAL	10	5	12	4

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 25/04 Início: 8:40 (20,2 °C) Seeding: 8:53 Término: 10:45 Total de horas: 1:52

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 15/05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	12:47-12:50	12:42-12:45	12:35-12:40	12:52-12:54
Nº na palheta	5-5	2-3	6-6	2-2
Nº achado	5-5	2-3	6-6	2-2

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	10	5	12	4
Hora de início	13:25	13:25	13:25	13:25
Placa	2	1	2	1
Gota	1(5) 2(5)	1(2) 2(3)	3(6) 4(5+1SZ)	3(2) 4(2)

SZ = sem zona

AVALIAÇÃO 30:25h.

Dia: 16/05

Hora: 18:50-19:05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	1				
Reexpandidos	7	5	7+1SZ	4	
Degenerados	2		4		
% reexpansão	80%	100%	66,67%	100%	
EG_F	1ecl+4re	5	5	4	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 19

Botijão: 2(canino)

Canister: 2

AVALIAÇÃO 49:20h.

Dia: 17/05

Hora: 14:45

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos					
Reexpandidos	2		2+1SZ		
Degenerados	1 (+2)		0 (+4)		
% eclodidos	0%		0%		
EG_F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.

Anexo H

PROTOCOLO PARA COLETA DE EMBRIÕES *Mus musculus domesticus*

2013

Nº da coleta: 26

Número de Fêmeas: 9

Data de chegada das fêmeas: 03/04

Números das placas negativas: 13, 17, 18

COLETA

Data de coleta: 24/04

Data FSH: 19/04

Hora de início da coleta: 9:02

Hora de término da coleta: 10:27

TOTAL de horas: 1:25

Placas positivas:

Nº	♂	Sem estruturas	Óvulos	Degenerados	8 células (viáveis)	TOTAL
1	26			8	5	13
2	16			8	19	27
3	19			12(4cel)		12
4	20		4	10	23	37
5	23			4	45	49
6	25		3	10	25	38
7	13	X				
8	17	X				
9	18	X				
TOTAL			7	52	117	176

EG_i(PBS+0,1%PVP): 5

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

EXPOSIÇÃO À PRESSÃO

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2
Nº embriões colocados	28	28
Nº embriões retirados	28	28
Temperatura início	37 °C	
Temperatura final	32 °C	
Hora de início	10:40	
Hora de término	12:40	14:40
Total de horas	2:00	4:00

CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
28	CULTIVO
28	
23,5 °C	
26 °C	

Pressão exercida: kgf/cm² (160) atm(154,85) MPa (15,69)

Temp. retirada de pressão: 1'8"

Temp. retorno à pressão: 5'15"

Temp. 2ª retirada de pressão: 1'10"

CULTIVO 1 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	28	28	28	28
Hora de início	13:25	15:22	15:22	11:10
Placa	3	3	1	1
Gota	1(14) 2(14)	3(14) 4(14)	3(14) 4(14)	1(14) 2(14)

AVALIAÇÃO Dia: 25/04 Hora: 23:55

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados				
Mo	1		3	2
Bl inicial	1		2	
Bl	1	3	1	
BE	12	17	11	12
B em eclosão	13	8	11	14
Eclodido				
Total de horas	34:30	32:33	32:33	36:45
% de viáveis	100%	100%	100%	100%
EG_M	5	5	5	5

EG_M(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

Retorno ao cultivo: Dia: 26/04 Hora: 00:14

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Degenerados				
Mo	1		3	2
Bl inicial	1		2	
Bl				
BE				
B em eclosão	8	3	6	9
Eclodido				

Avaliação: Dia: ±29/04

Hora: ±16:00

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Eclodidos	5	3	8	6
Degenerados	5		3	5
% eclodidos	50%	100%	72,73%	54,55%

Exposição ao Etilenoglicol:

→ Aumentou um embrião (pode ser do P1 que ficou na placa)

	P1	P2	B	E
Nº	6-7	5-5-5(6)	6-6	6-6
Hora	00:34	00:38	00:40	00:34
Tampa	azul	Verde	branco	amarelo

B e E: Mauricio envasou (bolhas de ar muito pequenas)

CRIOPRESERVAÇÃO (EG)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Bl	1	3	1	
BE	12	17+1	11	12
TOTAL	13	20+1	12	12

Curva de 0,3°C/min até -35

Dia: 26/04 Início: 00:48 (21,7 °C) Seeding: 01:02 Término: 02:54 Total de horas: 1:52

Botijão: 2

Canister: 5 (camundongos Lis)

DESCONGELAMENTO (26°C/30' em PBS)

Dia: 15/05

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Hora início e fim	14:35-14:37	14:16-14:25	14:27-14:31	14:08-14:12
Nº na palheta	7-6	5-5-5-6	6-6	6-6
Nº achado	7-5	5-5-4-5	6-6	5-6

CULTIVO 2 (37,5°C) (Ksom)

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA
Nº embriões	11	20	12	11
Hora de início	15:15	15:15	15:15	15:15
Placa	3	4	3	4
Gota	1(5+1SZ) 2(5)	1(10) 2(10)	3(6) 4(6)	3(6) 4(5)

SZ = sem zona

AVALIAÇÃO 28:29h.

Dia: 16/05

Hora: 19:44-19:57

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos		3	2	1	
Reexpandidos	10+1SZ	17	8	10	
Degenerados			2		
% reexpansão	100%	100%	83,33%	100%	
EG_F	5	3eclo+2re	2eclo+3re	1eclo+4re	

EG_F(PBS+0,1%PVP): 20

Botijão: 2(canino)

Canister: 2

AVALIAÇÃO 47:30h.

Dia: 17/05

Hora: 14:45

	PRESSÃO 1	PRESSÃO 2	CONTROLE BANCADA	CONTROLE ESTUFA	TOTAL
Eclodidos	1	3	1	1	
Reexpandidos	4+1SZ	12	4	5	
Degenerados			0 (+2)		
% eclodidos	20%	25%	20%	16,67%	
EG_F					

EG_F(PBS+0,1%PVP):

Botijão: 3(canino)

Canister: 2

OBS.: No percentual de eclodidos foram desconsiderados os "SZ" e os que já estavam degenerados nas 30 h.