

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

**EFEITOS DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE A VIABILIDADE E  
EXPRESSÃO GÊNICA DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS BOVINOS  
PRODUZIDOS *IN VITRO* SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

**Autor: Daiane Andréia Mentz**

**PORTO ALEGRE**

**2018**

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

**EFEITOS DA ALTA PRESSÃO GASOSA SOBRE A VIABILIDADE E  
EXPRESSÃO GÊNICA DE BLASTOCISTOS EXPANDIDOS BOVINOS  
PRODUZIDOS *IN VITRO* SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

**Autor: Daiane Andréia Mentz**

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

**Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues**

**PORTO ALEGRE**

**2018**

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

CIP - Catalogação na Publicação

Mentz, Daiane Andréia  
Efeitos da alta pressão gasosa sobre a viabilidade e expressão gênica de blastocistos expandidos bovinos produzidos in vitro submetidos à criopreservação / Daiane Andréia Mentz. -- 2018.

60 f.

Orientador: José Luiz Rodrigues.

Coorientador: Marcelo Bertolini.

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

1. Produção de embriões in vitro. 2. Criopreservação. 3. Estresse subletal. 4. Expressão Gênica. I. Rodrigues, José Luiz, orient. II. Bertolini, Marcelo, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho ao meu noivo Octávio Dumoncel, aos meus pais, e a maior benção da minha vida, minha filha Lavínia.

## AGRADECIMENTOS

A Deus em sua infinita bondade por guiar-me durante essa jornada.

Ao estimado Prof. Dr. José Luiz Rodrigues, pela oportunidade de ser sua orientada, pela disponibilidade, paciência e atenção dispensada durante a condução dos experimentos, pelo enriquecimento pessoal e profissional que obtive durante nossa convivência.

À equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, em especial, aos colegas Bruno Becker, Karine Campagnolo, Felipe Ongaratto, Andressa Gonsioroski, Luis Henrique Aguiar, Paula Marchioretto e o colaborador João Roberto Lopes Moraes pelo auxílio durante a realização desse trabalho, além das horas de mate e boas conversas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini pelo apoio e por todos os ensinamentos, e a Profa. Dra. Luciana Relly Bertolini pelo auxílio nos experimentos realizados na PUC-RS. Ao Prof. Dr. Jorge Stumps Diaz, pelo incentivo em trilhar essa caminhada.

Ao meu noivo Octávio pelo apoio incondicional, por compreender a distância, e não medir esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Ao meu pai pelo auxílio em manter-me em Porto Alegre, à minha mãe por cada oração rogando pela proteção divina. Aos bons amigos que torceram por mim e compreenderam minha ausência em diversos momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho torna-se realidade, meus sinceros agradecimentos.

*“Dar o exemplo não é a melhor maneira de  
influenciar os outros. É a única.”*

*Albert Schweitzer*

## RESUMO

A alta pressão gasosa (HGP, do inglês *high gaseous pressure*) tem sido utilizada como agente indutor de estresse subletal, capaz de produzir uma resposta celular ao insulto e fornecer proteção a estresses subsequentes, para modificar a tolerância de gametas e embriões a procedimentos potencialmente prejudiciais, como a criopreservação. Este estudo teve como objetivo determinar o efeito da exposição à HGP de 27,6 MPa durante 2h sobre a sobrevivência de blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vitro* frescos ou após o congelamento. Além disto, determinar o número total de células dos embriões criopreservados/descongelados eclodidos e o perfil transcricional dos genes CASP7 e NET1. No primeiro experimento, os embriões foram expostos à HGP e posteriormente submetidos ao cultivo *in vitro* por 72h. Não houve diferença nas taxas de eclosão dos blastocistos entre os grupos experimental (90,9% - 111/122) e controle (88,2% - 98/111). No segundo experimento, os embriões foram expostos à HGP, e 2h após o tratamento amostras de ambos os grupos foram fixadas para análise de expressão gênica, e os embriões remanescentes foram criopreservados pela curva de congelamento rápida. Duas horas após o descongelamento, uma segunda amostra foi fixada para análise da expressão de genes e o restante foi cultivado *in vitro* por 72h. A taxa de re-expansão dos embriões dos grupos controle e expostos à HGP, após 4 hrs, foram, respectivamente, 66,6% (92/138) e 74,6% (106/142). As taxas de eclosão (24h, 48h e 72h) pós-descongelamento dos embriões dos grupos controle e expostos à 27,6 MPa de HGP foram, respectivamente, 12,6% (15/119), 34,5% (41/119) e 52,1% (62/119), e, 12,2% (15/123), 35,8% (44/123) e 63,4% (78/123). Não foram observadas diferenças significativas na capacidade do blastocisto expandido de se reexpandir e eclodir entre os embriões dos grupos controle e submetidos à HGP. O número médio total de células dos blastocistos eclodidos do grupo HGP e do grupo controle também foram semelhantes as 24h (157,9 vs. 144,0), 48h (173,6 vs. 153,1) e 72h (190,6 vs. 162,6), respectivamente. Por outro lado, a determinação da expressão gênica revelou que 2h após a exposição à HGP e 2h após o descongelamento houve uma redução na expressão relativa do gene CASP7 e aumento da expressão relativa do gene NET1 nos embriões do grupo HGP. Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, a exposição dos blastocistos expandidos à HGP não se caracterizou por maior sobrevivência embrionária após o descongelamento. No entanto, resultou em uma

expressão alterada de genes que atuam sobre a cascata apoptótica (CASP7) e o crescimento e proliferação celular (NET1).

**Palavras-Chave:** Estresse subletal, congelamento, resposta celular, expressão gênica.



## ABSTRACT

High gaseous pressure (HGP) has been used as a sublethal stressor capable of inducing a cellular response to insult and providing protection to subsequent stresses in order, to modify the tolerance of gametes and embryos to potentially harmful procedures, such as cryopreservation. This study aimed to determine the effect of 27.6 MPa HGP exposure during 2h to of on the survival of bovine expanded blastocysts in vitro produced, fresh or after freezing. Moreover, determining the total number of cells from the cryopreserved/thawed embryos hatched and the transcriptional profile of CASP7 and NET1 genes. In the first experiment, the embryos were exposed to HGP and subsequently submitted to 72h of in vitro culture. There was no difference in the blastocyst hatch rates between the experimental (90.9% - 111/122) and control groups (88.2% - 98/111). In the second experiment, the embryos were exposed to HGP, and 2h after, samples of both groups were collected for gene expression analysis, and the remaining embryos were cryopreserved by the rapid freeze curve. After 2h of thawing, another sample was collected for analysis of gene expression and the remainder embryos were in vitro cultured during 72h. The re-expansion rates embryos of control and HGP exposed groups, after 4 hrs, were respectively 66.6% (92/138) and 74.6% (106/142). The post-thawing hatching rates (24h, 48h and 72h) of embryos of control and 27.6 MPa HGP exposed groups were respectively 12.6% (15/119), 34.5% (41/119) and 52.1% (62/119), and 12.2% (15/123), 35.8% (44/123) and 63.4% (78/123). No significant differences were observed in the ability of the expanded blastocyst to reexpand and hatch among of embryos of control and HGP exposed groups. The average of total number of cells in hatched blastocysts in the HGP and the control groups were also similar at 24h (157.9 vs. 144.0), 48h (173.6 vs. 153.1) and 72h (190.6 vs 162.6), respectively. On the other hand, determination of gene expression revealed that 2h after HGP exposure and 2h after thawing there were a reduction in the relative expression of CASP7 gene and increased the relative expression of NET1 gene in embryos of HGP group. Under our experimental conditions, the exposure of expanded blastocysts to the HGP was not characterized by improving embryo survival after thawing. However, it has resulted in modified expression of genes that act on apoptotic cascade (CASP7) and cell growth and proliferation (NET1).

**Keywords:** Sublethal stress, freezing, cellular response, gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Expressão relativa (média + erro padrão médio) dos genes CASP7, HSPB8, HSPH1, NET1, BAX e BCL-2 em embriões bovinos PIV 2h após tratamento com HGP .....	39
<b>Figura 2</b> - Expressão relativa (média + erro padrão médio) dos genes CASP7, HSPB8, HSPH1, NET1, BAX e BCL-2 em embriões bovinos PIV 2h após o descongelamento .....	.40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identificação dos grupos experimentais.....	322
<b>Tabela 2</b> - Sequência de <i>primers</i> utilizados na análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	344
<b>Tabela 3</b> - PIV de embriões bovinos.....	366
<b>Tabela 4</b> - Taxas de eclosão de blastocistos expandidos bovinos PIV submetidos à HGP e cultivados <i>in vitro</i> por 72 h.....	377
<b>Tabela 5</b> - Taxas de re-expansão 4 horas após o descongelamento, de blastocistos expandidos criopreservados 2h após a exposição à HGP .....	388
<b>Tabela 6</b> - Taxas de eclosão em diferentes momentos (24h, 48h e 72h) após o descongelamento dos blastocistos expandidos criopreservados.....	388
<b>Tabela 7</b> - Número médio total de células em blastocistos expandidos PIV tratados com HGP antes do congelamento, 24h, 48h e 72h após o descongelamento no estágio de blastocisto eclodido.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
μL	Microlitros
ART	Tecnologia(s) de reprodução assistida ( <i>assisted reproduction technology</i> )
atm	Atmosferas
BSA	Albumina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
CC	Controle Congelado
CF	Controle Fresco
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono gasoso
D5	Dia 5
D7	Dia 7
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>et al.</i>	E outros
EUA	Estados Unidos da América
FAVET	Faculdade de Medicina Veterinária
h	Horas
HGP	Alta pressão Gasosa ( <i>High Gaseous Pressure</i> )
HGPC	HGP Criopreservado
HGPF	HGP Fresco
HHP	Alta pressão hidrostática ( <i>High Hydrostatic Pressure</i> )
ICM	Massa celular interna ( <i>inner cell mass</i> )
IVP	Produção <i>in vitro</i> ( <i>in vitro production</i> )
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitros
MPa	Megapascal
mPBS	Tampão fosfato-salino modificado (Modified phosphate saline buffer )
N <sub>2</sub>	Nitrogênio gasoso
O <sub>2</sub>	Oxigênio gasoso
°C	Graus Celsius
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>t</sub>	RNA transportador
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido de Oviduto Sintético (Synthetic oviductal fluid)
TCN	Número total de células ( <i>total cell number</i> )
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
vs.	Versus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Estresse Celular.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Indução de estresse subletal em microorganismos e na conservação de alimentos .....	15
2.1.2 Indução de estresse subletal em embriões mamíferos.....	17
2.1.2.1 Alta pressão hidrostática .....	17
2.1.2.2 Alta pressão gasosa.....	19
2.1.3 Expressão gênica em resposta ao estresse celular.....	20
<b>2.2 Criopreservação de embriões bovinos PIV .....</b>	<b>23</b>
2.2.1 Métodos de criopreservação .....	24
2.2.2 Efeitos da criopreservação na qualidade de embriões PIV.....	27
<b>2.3 Avaliação da viabilidade embrionária.....</b>	<b>28</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Local e período de realização dos experimentos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Meios e reagentes .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 PIV de embriões bovinos.....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Procedência dos ovários .....	29
3.3.2 Destino dos ovários .....	29
3.3.3 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	30
3.3.4 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	30
3.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	31
<b>3.4 Grupos experimentais .....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Exposição dos embriões à HGP .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Despressurização da câmara.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Recuperação dos embriões e CIV .....</b>	<b>32</b>
<b>3.8 Coleta das amostras para análise de expressão gênica .....</b>	<b>33</b>

3.8.1 Determinação e quantificação da expressão gênica .....	33
<b>3.9 Congelamento dos embriões .....</b>	<b>34</b>
<b>3.10 Descongelamento dos embriões e CIV .....</b>	<b>35</b>
<b>3.11 Contagem do número total de células.....</b>	<b>35</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 PIV de embriões bovinos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Exposição dos embriões à HGP e o efeito sobre a viabilidade de embriões frescos cultivados <i>in vitro</i> por 72 h .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Exposição dos embriões à HGP e o efeito sobre a viabilidade de embriões congelados/descongelados e cultivados <i>in vitro</i> por 72h.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Contagem do número total de células (TCN).....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Análise de expressão gênica .....</b>	<b>39</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>45</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Gametas e embriões mamíferos sofrem várias manipulações durante os procedimentos *in vitro* realizados no âmbito das tecnologias de reprodução assistida (ART, do inglês *assisted reproduction technologies*). Grande parte das estratégias utilizadas para aumentar as taxas de sucesso das ART focam em mimetizar a fisiologia com o intuito de reduzir os inevitáveis danos causados pela manipulação (BOCK *et al.*, 2014). Da mesma forma, a criopreservação de gametas e embriões requer condições ajustadas para minimizar ou evitar o estresse prejudicial do choque osmótico, oxidativo, térmico e mecânico (JIANG *et al.*, 2016).

A partir de estudos na área de microbiologia de alimentos (HITE, 1899) foi desenvolvida a estratégia de aplicar um tratamento que induz um estresse subletal em gametas e embriões visando melhorar a sobrevivência após as ART (PRYBENSZKY e VAJTA, 2011). Embriões mamíferos foram expostos ao estresse subletal induzido pela alta pressão hidrostática (HHP, do inglês *high hydrostatic pressure*), com o intuito de melhorar a resposta à criopreservação, mensurada pela sobrevivência embrionária após o reaquecimento e cultivo *in vitro* (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a e 2005b; BOCK *et al.*, 2010; SIQUEIRA-FILHO *et al.*, 2011; TRIGAL *et al.*, 2013; JIANG *et al.* 2016).

De acordo com Jiang *et al.* (2016), o tratamento com HHP resulta em mudanças significativas na expressão de genes relacionados a apoptose e genes envolvidos no processamento de RNA, crescimento e proliferação celular. Acredita-se que quando os embriões são expostos a um estresse subletal dentro dos seus limites de tolerância (PRYBENSK e VAJTA, 2011), eles respondem a esse estímulo alterando a expressão gênica e, essas mudanças os preparam para o próximo insulto, como por exemplo, a criopreservação (JIANG *et al.*, 2016). No entanto, se o impacto do estresse ultrapassa o limite de tolerância, pode ocorrer apoptose ou necrose (HANSEN, 2007).

Baseado no princípio de exposição de embriões ao estresse subletal, o primeiro objetivo dos experimentos foi determinar as taxas de re-expansão e eclosão de blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vitro* criopreservados, expostos previamente a alta pressão gasosa (HGP, do inglês *high gaseous pressure*) de 27,6 MPa por 2h. O segundo objetivo foi inferir sobre a qualidade embrionária através da determinação do número total de células dos embriões eclodidos de cada grupo



experimental após o descongelamento. O terceiro objetivo foi determinar a expressão dos genes CASP7, HSPH1, HSPB8, NET1, BAX e BCL2 no estágio de blastocisto expandido, fixados 2h após exposição a HGP, momento em que seriam criopreservados, e avaliar a expressão desses mesmos genes em embriões descongelados, fixados 2h após o descongelamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Estresse Celular

2.1.1 Indução de estresse subletal em microorganismos e na conservação de alimentos

Hite (1899) e Hite *et al.* (1914) submeteram amostras de leite, frutas e vegetais a HHP com o propósito de evitar a multiplicação de microorganismos e conservar por mais tempo esses alimentos, pois acreditava-se que os microorganismos eram susceptíveis à exposição à HHP. Existem numerosos organismos adaptados a pressão atmosférica (1 atm), denominados mesófilos, no entanto, diferentes microorganismos presentes no fundo do mar desenvolveram a capacidade de sobreviver sob condições extremas de pressão (ABE *et al.*, 1999).

Em 1979, Yayanos *et al.* (1979) isolaram um tipo de bactéria capaz de sobreviver em pressões hidrostáticas maiores que a pressão atmosférica. As bactérias barofílicas (atualmente denominados piezófilos; ABE *et al.*, 1999) são aquelas capazes de crescer preferencialmente ou exclusivamente em ambientes expostos a altas pressões ambientais (YAYANOS *et al.*, 1979). Abe *et al.* (1999) afirmam que a síntese protéica e de DNA são os processos celulares mais sensíveis à pressão, enquanto a síntese de RNA, e os ribossomos associados tanto ao mRNA e tRNA, mostram ser estáveis em pressões elevadas.

Wemekamp-Kamphuis *et al.* (2002) constataram que ao expor colônias de *Listeria monocytogenes* ao choque frio e subsequentemente à HHP, a sobrevivência pós pressurização foi 100 vezes maior do que a das células crescendo a 37 °C. De acordo com os autores o uso da exposição à alta pressão para preservação de produtos

alimentares foi amplamente explorado. Esse procedimento foi proposto como alternativa aos tratamentos térmicos convencionais, e a principal vantagem é que preserva as características organolépticas do produto inicial. O primeiro tratamento sujeitaria as células a uma situação de estresse subletal, conferindo a cepa bacteriana uma maior resistência ao procedimento subsequente. Os autores ainda observaram um aumento na produção das chamadas proteínas de choque frio (CSP, do inglês *cold shock proteins*). A produção de CSP não é induzida apenas pela baixa temperatura, mas também por outras alterações ambientais, como por exemplo, estresse nutricional e altas pressões hidrostáticas. Wouters *et al.* (1999) sugeriram que as CSP desempenham um papel na proteção contra os danos do processo de criopreservação, pois atuam como chaperonas de RNA, facilitando o processo de tradução (GRAUMAN e MARAHIEL, 1996).

Quando as células são submetidas a vários fatores indutores de estresse, também há o aumento na produção de uma classe de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (VENDRELL-FLOTATS *et al.*, 2017), as quais estão presentes em todas as células em todas as formas de vida (DILLER, 2006). As HSP também atuam como chaperonas moleculares e há evidências de que essas proteínas desempenham papéis fisiológicos importantes em condições normais (KREGEL, 2002). As HSP também são expressas como resposta a um aumento de temperatura e a outros estímulos estressantes com o intuito de proteger as células e auxiliar na sobrevivência, e parecem ser benéficas para as células quando as mesmas são expostas a insultos subsequentes (DILLER, 2006), como por exemplo, a criopreservação (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011).

As chaperonas moleculares tem função de manter as proteínas recém-sintetizadas na correta conformação, isto é, elas interagem com outras proteínas e, ao fazê-lo, minimizam a probabilidade de que essas outras proteínas interajam de forma inadequada uma com a outra (FEDER e HOFMANN, 1999). Assim, impedem a desnaturação de proteínas e auxiliam a sua renaturação durante e após períodos de exposição a agentes estressores (NAHLEH *et al.*, 2012).

De acordo com Fulda *et al.* (2010) qualquer situação que altere a homeostase da célula estimula uma resposta ao choque térmico (HSR, do inglês *heat shock response*). Embora o nome pareça se referir a alterações na temperatura, essa resposta também é induzida a partir de outros estímulos e é uma das principais atividades celulares para

preservar a sobrevivência frente ao estresse. Uma das principais alterações celulares causada pelo estresse é o dano protéico que leva à agregação de proteínas desdobradas. Para neutralizar este fenômeno, as células aumentam a expressão dos genes responsáveis pelas chaperonas moleculares, que auxiliam no redobramento de proteínas e reduzem a agregação proteica. Ainda de acordo com os autores, a capacidade de adaptação de uma célula determina seu destino. A resposta inicial ao estímulo estressante é orientar a célula a defender-se e recuperar-se do insulto. No entanto, se o estímulo nocivo não for resolvido, as células ativam reações que levam a apoptose. A exposição prévia das células a estresses subletais pode estimular uma resposta com a síntese de HSP e/ou CSP. Estas células expostas a uma nova situação de estresse responderão de forma mais rápida e agíl, procurando reduzir e limitar a extensão das lesões.

### 2.1.2 Indução de estresse subletal em embriões mamíferos

Agentes térmicos (ISOM *et al.*, 2009), soluções hiper ou hipo osmóticos (AGCA *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2009) e agentes oxidativos (VANDAELE *et al.*, 2010) já foram empregados como indutores de estresse em gametas e embriões. Indutores de estresse como os listados acima estimularam a realização de experimentos para investigar outros agentes causadores de estresse subletal celular, como por exemplo, a pressão hidrostática (PRYBENSZKY e VAJTA, 2011).

#### 2.1.2.1 Alta pressão hidrostática

A HHP tem sido utilizada para aumentar a tolerância de gametas e embriões a procedimentos potencialmente prejudiciais, como a criopreservação (BOCK *et al.*, 2010), visando aumentar a sobrevivência após o descongelamento. Esta técnica foi inicialmente demonstrada por Pribenszky *et al.* (2005a). Com base nestas experiências, utilizou-se a HHP como indutor de estresse subletal em gametas e embriões, e o tratamento mostrou-se aumentar a eficiência de diferentes ART (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a; PRIBENSZKY *et al.*, 2005b; PRIBENSZKY *et al.*, 2007; PRIBENSZKY *et al.*, 2008a; PRIBENSZKY *et al.*, 2008b; DU *et al.*, 2008a; DU *et al.*, 2008b; SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011; BOCK *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2016). Genes relacionados ao

estresse parecem ser os elementos chaves de um mecanismo de defesa à condição estressante (BOCK *et al.* 2014).

Em condições fisiológicas, as células normalmente estão expostas a uma pressão menor que 0,2 MPa (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011). A magnitude da HHP e o tempo de exposição depende do tipo de gameta ou fase de desenvolvimento embrionário a ser exposto (SARAGUSTY e ARAV, 2011). De acordo com os autores a exposição de gametas e embriões a pressões entre 200 e 900 atmosferas (20 e 90 MPa) antes da criopreservação, parece beneficiar a sobrevivência após o aquecimento. Por exemplo, oócitos suínos maturados *in vitro* utilizados na produção de *handmade cloning* (HMC) suportam pressão de 20 MPa (DU *et al.*, 2008a), enquanto blastocistos murinos podem sobreviver a uma pressão de 90 MPa por 30 min sem que haja alterações em sua integridade estrutural (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a).

Siqueira Filho *et al.* (2011) observaram aumento das taxas de desenvolvimento *in vitro* de blastocistos bovinos PIV vitrificados após serem expostos por 1 h à 60 MPa de HHP. Trigal *et al.* (2013) observaram que blastocistos bovinos PIV expostos às mesmas condições de pressão que os citados acima revelaram uma cinética mais veloz de desenvolvimento *in vitro*, caracterizada por maior número de células presentes na massa celular interna (ICM, do inglês *inner cell mass*). Jiang *et al.* (2016) expuseram blastocistos bovinos PIV a três diferentes intensidades de HHP (40, 60 e 80 MPa) associados a diferentes períodos de recuperação (0, 1 h e 2 h após HHP) previamente à vitrificação. Após o reaquecimento, as taxas de re-expansão foram significativamente maiores nos grupos expostos a 40 e 60 MPa do que nos controles, mas inferior quando expostos a 80 MPa, demonstrando que esses embriões não toleraram a pressão de 80 MPa. A análise da expressão gênica indicou que 40 e 60 MPa de HHP promoveram competência embrionária através de infrarregulação de genes com atividade na apoptose, e suprarregulação de genes de crescimento e proliferação celular. Analisando coletivamente a expressão gênica, os resultados sugeriram que o estresse causado pela HHP induz os embriões a degradar fatores de transcrição que estimulam a apoptose e aumenta a transcrição e tradução de RNA (JIANG *et al.*, 2016).

Segundo Fulda *et al.* (2010) existem diferentes tipos de estresses, e a resposta da célula para enfrentar essas condições dependerá do tipo e nível do insulto, por isso a intensidade de HHP e o tempo de exposição da amostra são fatores importantes. Pribenszky *et al.* (2005a) demonstraram que embriões desafiados por 90 MPa por 2 h ou

30 MPa por 5 h degeneraram-se em até 2 h após a exposição. Os autores destacam que a descompressão dos embriões deve ser feita de forma gradual pois propicia um aumento da taxa de sobrevivência.

### 2.1.2.2 Alta pressão gasosa

Rodrigues *et al.* (2012) adaptaram uma câmara de pressão e com o auxílio desse equipamento expuseram gametas e embriões mamíferos a elevadas pressões gasosas. Inicialmente, os pesquisadores submetem oócitos caninos a HGP de 7,7 MPa por 1 h como fator indutor de estresse e observaram que a exposição à HGP não causava danos e, também, não alterava as taxas de meiose de oócitos caninos maturados *in vitro*.

O funcionamento da câmara de HGP é baseado no princípio de transferência de energia entre objetos. O diferencial da câmara de HGP é que ela tem menor peso e dimensões quando comparada ao equipamento que gera a HHP, proporcionando maior praticidade à exposição de embriões ao estresse subletal, permitindo sua utilização em diferentes locais de trabalho com criopreservação.

Collares (2014) coletou embriões murinos no estágio de 8-células, e os expôs à HGP de 15,7 MPa, durante 120 min ou 240 min. Após o período de exposição à HGP, os embriões foram submetidos ao CIV até desenvolverem-se ao estágio de blastocisto, quando então foram criopreservados. A primeira observação foi que a exposição a HGP no estágio de 8-células não impediu o desenvolvimento *in vitro* até o estágio de blastocisto. Os embriões foram descongelados e cultivados para avaliar a viabilidade *in vitro*. O grupo de embriões expostos à HGP durante 120 min e criopreservados apresentou taxa de re-expansão *in vitro* maior ( $p < 0,05$ ) que o grupo controle (86,3%; 63/73) vs. 72,8%; 67/92). Nesse mesmo experimento, amostras foram coletadas para avaliar possíveis alterações no padrão da expressão de genes que estão relacionados com a exposição a agentes estressantes. Essa análise não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Becker (2016) expôs previamente à criopreservação blastocistos murinos a diferentes tempos e magnitudes de HGP. A taxa de eclosão de 70,2% (106/151) dos

embriões do grupo exposto a HGP de 34 MPa durante 2 h foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a dos controles criopreservados não expostos à HGP 58,6% (78/133).

### 2.1.3 Expressão gênica em resposta ao estresse celular

A indução de um estresse subletal em embriões objetiva induzir uma resistência temporária nas células através da ativação da transcrição de genes que produzem proteínas específicas que permitem a adaptação ao estresse, resultando em maior sobrevivência (FEDER e HOFFMAN, 1999). No entanto, se o estresse ultrapassar o limite de tolerância poderá induzir a apoptose. No embrião bovino, a capacidade das células em realizarem a apoptose é um fenômeno adquirido durante o desenvolvimento e se torna identificável entre o estágio de oito e dezesseis células (HANSEN, 2007).

A apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico essencial que desempenha um papel crítico no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). De acordo com os autores, em nível molecular a apoptose é rigorosamente regulada e orquestrada através de duas principais vias e o resultado final de qualquer dos caminhos é a ativação da cascata de caspases, a clivagem de substratos celulares específicos, resultando em mudanças morfológicas e bioquímicas associadas à apoptose.

Somente a avaliação qualitativa ou morfológica não é suficiente para fornecer uma estimativa da qualidade e potencial desenvolvimento embrionário (WRENZYCKI *et al.*, 2004), por isso a importância da análise de expressão dos genes relacionados a apoptose e sobrevivência embrionária. Acredita-se que a maior tolerância ao estresse induzida por HHP deve-se à expressão diferencial de determinados genes (BOCK *et al.* 2010; BOCK *et al.* 2014; SIQUEIRA FILHO *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2014; JIANG *et al.* 2016).

Siqueira Filho *et al.* (2011) sugerem que a ação da HHP atuando como agente estressor subletal sobre o embrião altera a expressão de um grupo de genes. As proteínas produzidas como resposta da expressão gênica ao estresse podem reduzir ou facilitar a ativação da cascata apoptótica, levando a ativação ou inibição da expressão de outros genes, fenômeno este que pode promover maior criotolerância das células embrionárias. O momento de expor os embriões a um novo estresse pode ser um fator determinante da viabilidade embrionária. O autor menciona que o efeito protetor mais

efetivo da exposição à HHP é alcançado se o segundo procedimento (criopreservação, ativação partenogenética ou enucleação) é realizado até 2 h após o final do estresse subletal inicial. Diller (2006) observou que o momento do pico da expressão gênica varia de acordo com o tipo de célula e impactos do estresse, mas a primeira modificação significativa ocorre em até 3 h após a indução do estresse.

Siqueira Filho *et al.* (2011) observaram maior competência de desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos PIV vitrificados expostos previamente à HHP. No entanto, ao avaliar genes relacionados a estresse oxidativo (SOD2 e GPX4) e choque térmico (HSPA1A) não observaram alteração no padrão de expressão. Apenas a expressão do gene SC4MOL foi significativamente maior no grupo exposto a HHP e vitrificado 1 h após a exposição, sendo que estresses que causam desestabilização da membrana, como a exposição ao choque osmótico, baixas temperaturas e à alta pressão hidrostática, induzem a expressão do gene SC4MOL. Análise cumulativa de todos os genes (SC4MOL, HSPA1A, SOD2 e GPX4) revelaram um padrão de expressão semelhante, com tendência para o pico de transcrição 1 h após o tratamento com HHP.

Jiang *et al.* (2016) demonstraram o efeito da pressão e o tempo de recuperação nos perfis de expressão gênica. Um total de 399 transcritos gênicos foram identificados e observou-se um total de 340 genes diferencialmente expressos entre os grupos experimentais, como resultado da exposição das células embrionárias à HHP. As transcrições infra reguladas em células de embriões dos grupos tratados com 40 MPa e 60 MPa de HHP estão envolvidas com a apoptose. As transcrições supra reguladas estão envolvidas no processamento de RNA e transcrição, bem como regulação da síntese protéica e, provavelmente, essas expressões gênicas promoveram maior taxa de re-expansão após o aquecimento dos embriões.

Para confirmar os resultados do *microarray*, os autores realizaram qRT-PCR em oito genes: CASP7, NET1, APLP1, EIF4B, HSPH1, HSPB8, DIDO1 e F3, que desempenham papéis cruciais na apoptose, processamento de RNA ou síntese protéica. Estes genes tiveram a expressão significativamente alterada pela exposição das células embrionárias a diferentes HHP. CASP7, NET1, HSPH1, HSPB8, DIDO1 e F3 tiveram infra regulação nos grupos expostos a 40 MPa e 60MPa, enquanto os genes APLP1 e EIF4B apresentaram supra regulação. A caspase 7 (CASP7) é um membro da família de caspases, mais especificamente do grupo caspase II (composto pelas caspases 2, 3 e 7; JOUSAN *et al.*, 2008), sendo uma importante proteína de execução de apoptose

(ELMORE, 2007). A ativação das caspases representa um passo chave na indução da apoptose (CHANG e YANG, 2000). Jousan *et al.* (2008) demonstraram que os blastocistos com valores baixos do grupo de caspase II ativado têm maior potencial de se desenvolver até o estágio do blastocisto eclodido. A execução das caspases 3 e 7 são responsáveis pela destruição das proteínas estruturais e reguladoras, levando ao dano e à apoptose (CHANG e YANG, 2000).

Resultados de um estudo conduzido por Pero *et al.* (2018) demonstraram que o tratamento com um inibidor de caspase melhora a criotolerância dos embriões bovinos PIV, prevenindo a apoptose induzida pelo estresse causado pelo processo de criopreservação. A proteína 8 de choque térmico com 22 kDa (HSPB8) pertence à superfamília das pequenas HSP (SUN *et al.*, 2004) e está envolvida na regulação da proliferação celular e apoptose através da ativação do fator de crescimento transformante  $\beta$ -quinase ativada 1 (TAK1; LI *et al.*, 2007).

A translocação do gene indutor da morte obliterador 1 (DIDO1) do citoplasma para o núcleo é um importante evento inicial na ativação da maquinaria apoptótica, sugerindo que esse gene age através da indução de promotores de caspase, em vez de exercer um efeito direto sobre as caspases citoplasmáticas (GARCÍA-DOMINGO *et al.*, 2003). O gene transformador de células neuroepiteliais 1 (NET1) é um membro de moléculas da superfamília tetraspan (WU *et al.*, 2013) e está envolvido na transdução de sinal, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (WU *et al.*, 2013). O gene HSPH1 impede a agregação de proteínas desnaturadas em células sob estresse severo e pode representar um gene essencial para a resposta ao estresse por pressão (JIANG *et al.*, 2016).

Os membros da família de genes BCL-2 desempenham papéis fundamentais na regulação da apoptose (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002) e são categorizados em dois subgrupos, anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL, A1, Mcl-1) e pro-apoptótico (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim, Bad, Bid, Bcl-xS) (CORY e ADAMS, 1998). A proteína BCL-2 previne a apoptose induzida por uma variedade de estímulos e mantém a sobrevivência celular (YANG *et al.*, 1997) e quando Bax é super-expressado nas células, a morte apoptótica é acelerada (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2002). A expressão do gene BCL-2 tem como função proteger as células prevenindo ou impedindo o processo de apoptose. A BCL-2 é uma proteína localizada na membrana externa da mitocôndria e essencial na regulação da liberação da citocromo c (YANG *et*



*al.*, 1997). Uma vez liberada, a citocromo c ativa as caspases, responsáveis por desencadear o processo de apoptose.

## 2.2 Criopreservação de embriões bovinos PIV

Os primeiros embriões produzidos inteiramente *in vitro* (MIV, FIV e CIV) resultaram no nascimento de terneiros no final de década de 80 (FUKUDA *et al.*, 1990). Desde então, o uso comercial da PIV vem aumentando constantemente ao longo dos anos, como indicaram os dados estatísticos publicados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), chegando a produzir mais de 670.000 embriões *in vitro* em 2015, superando os 630.000 produzidos em 2014 (PERRY, 2015).

Em meados do século XX, conseguiu-se criopreservar com eficiência espermatozoides (POLGE *et al.*, 1949). Na década de 70, Wilmut (1972) e Whittingham *et al.* (1972) relataram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões murinos, e Wilmut e Rowson (1973) anunciaram o nascimento do primeiro terneiro resultante da transferência de um embrião criopreservado. A partir de então foram criopreservados com êxito embriões de diferentes espécies mamíferas, como por exemplo caprina (BILTON e MOORE, 1976), ovina (WILLADSEN *et al.*, 1974), equina (YAMAMOTO *et al.*, 1982), humana (TROUNSON e MOHR, 1983) e suína (KASHIWAZAKI *et al.*, 1991).

A criopreservação interrompe as atividades celulares, permitindo a manutenção das células *ad infinitum*, possibilitando o deslocamento de embriões através de diferentes geografias e o planejamento da transferência de embriões no momento mais apropriado (PERO *et al.*, 2018). As técnicas de criopreservação são essenciais no cenário das ART, pois torna possível armazenar por tempo indeterminado embriões de várias espécies, inclusive espécies exóticas ou ameaçadas de extinção, além de permitir a importação e exportação de genomas (WAKCHAURE *et al.*, 2015).

Em 2014 mais da metade das transferências de embriões bovinos produzidos *in vivo* no mundo foram realizadas com embriões congelados (60,9%, 317.386), no entanto, 74% (234.866) dos embriões bovinos PIV foram transferidos a fresco (PERRY, 2015). Isso deve-se ao fato de que os embriões produzidos por maturação oocitária, fecundação e cultivo *in vitro* possuem propriedades bioquímicas e moleculares aberrantes em comparação aos embriões produzidos *in vivo* (HANSEN *et al.*, 2009) e

devido essas diferenças tem menor criotolerância quando comparados aos produzidos *in vivo* (MUCCI *et al.*, 2006).

Morfologicamente os embriões PIV apresentam um citoplasma mais escuro, menor quantidade de células (CROSIER *et al.*, 2001) e uma zona pelúcida mais frágil (ABE e HOCHI, 2003). Em nível ultraestrutural, em comparação com os embriões produzidos *in vivo*, os blastocistos PIV caracterizam-se pela falta de junção desmosomal, menor população de microvilosidades, maior quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma (LONERGAN *et al.*, 2001; ABE *et al.*, 2002), maior número de detritos no espaço perivitelino e nas cavidades intercelulares (RIZOS *et al.*, 2002). Essas observações podem, em parte, explicar as diferenças entre esses embriões em termos de criotolerância.

### 2.2.1 Métodos de criopreservação

O processo de criopreservação envolve 6 principais passos: I) exposição ao agente crioprotetor; II) resfriamento a temperaturas abaixo de zero; III) armazenamento; IV) descongelamento ou aquecimento; V) remoção do agente crioprotetor; VI) retorno a um ambiente fisiológico (WAKCHAURE *et al.*, 2015). Independente do método de criopreservação de eleição, o objetivo dos procedimentos é minimizar os danos e auxiliar as células a sobreviverem (VAJTA e NAGY, 2006).

As estratégias de criopreservação são baseadas em dois principais fatores: crioprotetores e curvas de resfriamento (VAJTA e NAGY, 2006). Basicamente, dois procedimentos podem ser utilizados, o congelamento rápido ou a vitrificação (MUCCI *et al.*, 2006). O congelamento lento foi primeiro descrito por Whittingham *et al.* (1972) e Wilmut (1972) e desde os anos oitenta do século passado não é mais utilizado. A grande desvantagem deste procedimento é a exigência de um aquecimento lento (daí vem o nome – Curva Lenta), que exige um equipamento que permite aquecer o sistema com uma velocidade de 20 °C/min (WILMUT, 1972), o que levou a diminuição da utilização.

O primeiro protocolo bem-sucedido aplicado em 1972 para a criopreservação de embriões mamíferos finalizava a curva a -70°C e em seguida as palhetas eram mergulhadas em nitrogênio líquido. O resfriamento de embriões feito desta maneira é referido por Mazur (1990) como o congelamento de equilíbrio, onde o potencial

osmótico dos líquidos intra e extracelulares estão em equilíbrio. Willadsen (1977) introduziu uma modificação baseada em experimentos com embriões ovinos, ao invés de resfriar os embriões lentamente até  $-70^{\circ}\text{C}$ , ele os resfriou até  $-30^{\circ}\text{C}$ , e em seguida os mergulhou em nitrogênio líquido.

O método desenvolvido por Willadsen (1977) denominado congelamento rápido, se caracteriza não pela velocidade de resfriamento da curva, mas pela temperatura em que os embriões são transferidos para o nitrogênio líquido. Os autores realizaram experimentos expondo os embriões ao nitrogênio líquido a partir de diferentes temperaturas sub zero e constataram que os melhores resultados de sobrevivência embrionária eram obtidos com o descongelamento rápido (daí vem o nome Curva Rápida), com velocidades de  $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . A partir deste momento a maioria das curvas de congelação de embriões mamíferos utilizam velocidades de resfriamento entre  $0,3$  e  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até temperaturas entre  $-35$  e  $-40^{\circ}\text{C}$ , para então expor os embriões ao nitrogênio líquido. A literatura mais atual, como por exemplo, Arav (2014), talvez por desconhecimento do autor, passou a denominar curva lenta o que na realidade trata-se da curva rápida (referência?).

Esse método consiste em expor os embriões a uma concentração relativamente baixa de crioprotetores (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Após a exposição aos crioprotetores, os embriões são então colocados em palhetas e resfriados até em torno dos  $-6^{\circ}\text{C}$  (entre  $-5$  e  $-7^{\circ}\text{C}$ ), onde permanecem por alguns minutos para atingir o equilíbrio (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Em seguida, induz-se a cristalização do meio extracelular (*seeding*). Este procedimento é realizado encostando na palheta que contém o embrião um objeto com a temperatura do nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) e deve ser realizado preferencialmente acima na coluna que contém o embrião, evitando que o objeto tenha contato no local onde se aloja o embrião (VAJTA e NAGY, 2006). A partir do *seeding* as etapas subsequentes são realizadas por um equipamento automático, que irá resfriar lentamente  $-0,3$  a  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , até finalizar a curva a  $-35^{\circ}\text{C}$  e em seguida as palhetas devem ser mergulhadas em nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) líquido (WILLADSEN, 1977).

A vitrificação é um método de criopreservação mais recente, que elimina a formação de gelo intracelular e extracelular, modificando o estado físico do meio em que o embrião se encontra, transformando-o em um estado vítreo (WAKCHAURE *et al.*, 2015). Faz-se isso através da desidratação e da extrema elevação da viscosidade, pois o embrião é exposto a um pequeno volume de crioprotetores altamente concentrado

e taxas de resfriamento ultra-rápidas ( $-15.000^{\circ}\text{C}$  a  $-30.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), sendo em seguida mergulhado no nitrogênio líquido (LOUTRADI *et al.*, 2008). No entanto, sabe-se que o uso de soluções de vitrificação concentradas são tóxicas aos embriões (KASAI e MUKAIDA, 2004; BERTOLINI *et al.*, 2005). Outra questão é em relação ao armazenamento de embriões vitrificados, pois isso pode representar uma possível fonte de contaminação viral (BIELANSKI *et al.*, 2000), já que os embriões vitrificados, dependendo da presença ou não de envase, podem entrar em contato direto com o nitrogênio líquido (WAKCHAURE *et al.*, 2015).

Segundo Hasler (2014), a vitrificação de um pequeno número de embriões é bastante conveniente e consideravelmente mais rápida do que o congelamento. No entanto, não é incomum no ambiente comercial ter dezenas ou centenas de embriões no mesmo momento para criopreservar, e considerando isso, o congelamento torna-se mais rápido do que a vitrificação quando calculado o tempo de criopreservação por embrião. De acordo com o autor, além disso, uma vez que as palhetas estão na máquina de congelamento programável, o profissional tem o tempo livre para trabalhar em outras tarefas.

### 2.2.2 Efeitos da criopreservação na qualidade de embriões PIV

Diferentes experimentos foram conduzidos com o intuito de melhorar as taxas de sobrevivência após a criopreservação, principalmente alterando o meio de CIV (RIZOS *et al.*, 2003; GOMEZ *et al.*, 2008) ou modificando o método de criopreservação (RALL e FAHY, 1985; VAJTA *et al.*, 1997; VAJTA *et al.*, 1998).

O congelamento de embriões é uma condição de estresse complexa, uma vez que as células podem ser danificadas não apenas pela formação de cristais de gelo, mas também pela alta osmolaridade devido à alta concentração de solutos internamente durante o processo de congelamento (WOUTERS *et al.*, 1999). Podem ocorrer lesões em todas as fases do processo de criopreservação. A primeira lesão que pode ocorrer é durante o resfriamento, com a temperatura entre +15 e -5 °C, podendo danificar de forma irreversível as gotículas lipídicas citoplasmáticas e os microtúbulos (VAJTA e NAGY, 2006). Entre -5 e -80°C, a principal fonte de lesão é a formação de cristais de gelo intracelular, e entre -50 e -150°C é quando ocorrem danos ou fraturas na zona pelúcida ou no citoplasma (RALL e MEYER, 1989). Vajta e Nagy (2006) afirmam que o armazenamento em nitrogênio líquido a -196 °C é a fase menos perigosa do processo de criopreservação e o aquecimento acidental é provavelmente a forma mais frequente de danos.

As membranas são frequentemente danificadas durante os procedimentos de congelamento/descongelamento ou durante a desidratação/rehidratação, pois esses processos induzem grandes esforços mecânicos nas membranas e essas tensões produzem uma série de deformações físicas podendo prejudicar a atividade biológica (WOLFE e BRYANT, 1999). O citoesqueleto é uma rede de microfilamentos e microtúbulos que proporcionam à célula sua integridade estrutural e capacidade de mobilidade. O processo de criopreservação pode desestabilizar ou danificar o citoesqueleto e, dessa forma, o embrião pode perder sua via intracelular de comunicação, causando destruição da célula (DOBRINSKY, 1996). Além disso, Park *et al.* (2006) relatam que o processo de criopreservação pode causar danos que resultam em um aumento na fragmentação do DNA e transcrição de genes relacionados à apoptose, reduzindo a capacidade de desenvolvimento de embriões congelados e descongelados.

### 2.3 Avaliação da viabilidade embrionária

Lindner e Wright Jr (1983) afirmaram que a avaliação morfológica dos embriões é útil na previsão de taxas de prenhez para grupos de embriões, mas é de valor limitado na determinação da sobrevivência individual do embrião. Ao avaliar morfológicamente um embrião, é possível estimar se esse embrião irá eclodir ou não (VAN SOOM *et al.*, 1997). No entanto, ao transferir o embrião para o útero de uma fêmea, não necessariamente ocorrerá implantação do embrião no útero, pois sabe-se que é necessário um número suficiente de células do botão embrionário para garantir o desenvolvimento a termo (VAN SOOM *et al.*, 1997).

Van Soom *et al.* (1997) postularam que apenas a morfologia e/ou a capacidade de eclodir não podem ser recomendadas para estimar a qualidade do embrião bovino, quer antes da transferência ou como avaliação para o sistema de PIV, pois blastocistos que parecem ser morfológicamente normais sob um estereomicroscópio podem não ser necessariamente viáveis (HARDY *et al.*, 1989).

O blastocisto mamífero é composto por dois subconjuntos de células: a ICM e as células do trofotoderma (DE LA FUENTE e KING, 1997). A contagem do número de ICM e células do trofotoderma é um procedimento útil para estimar a viabilidade do embrião (IWASAKI *et al.*, 1990). O número de células contidas na ICM é considerado um indicador de potencial desenvolvimento a termo (VAN SOOM *et al.*, 1997).

Para avaliação *in vitro*, é possível fixar os embriões e corar de forma diferencial esses dois tipos de células, através de métodos simples quimicamente definidos (DE LA FUENTE e KING, 1997; THOUAS *et al.*, 2001). Esses métodos de coloração podem ser utilizados de forma confiável e rápida, pois cora intensamente blastocistos murinos e bovinos PIV, com ou sem zona pelúcida (THOUAS *et al.*, 2001).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e período de realização dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos no período de março de 2016 a dezembro de 2017 no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da FAVET da UFRGS, e no Laboratório de Biologia Molecular e Engenharia Genética, do Departamento de Farmacologia da PUCRS.

#### **3.2 Meios e reagentes**

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

#### **3.3 PIV de embriões bovinos**

##### **3.3.1 Procedência dos ovários**

Os ovários foram obtidos de fêmeas abatidas no Frigorífico São Leopoldo Ltda. (Frigoleo), localizado no município de São Leopoldo-RS. Para o transporte entre o frigorífico e o Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, os ovários foram armazenados em recipiente térmico contendo solução fisiológica acrescida de 1% de antibiótico a 30°C.

##### **3.3.2 Destino dos ovários**

Após a aspiração dos folículos, os ovários foram armazenados em sacos identificados como resíduo biológico e estes descartados em recipiente adequado na sala de necropsia do setor de Patologia Animal da FAVET da UFRGS, que foram destinados a empresas responsáveis pelo descarte de resíduos biológicos.

### 3.3.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Ao chegar ao laboratório, aferiu-se a temperatura da solução em que os ovários estavam imersos no recipiente térmico, e em seguida os ovários foram lavados com solução fisiológica. Para obtenção dos complexos *Cumulus-oophorus* (CCOs), folículos de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados utilizando agulha 18G acoplada a seringa descartável de 5 mL, e o conteúdo folicular foi depositado em tubos plásticos de 50 mL. Após a aspiração de todos os ovários, o líquido folicular foi filtrado e depositado em placa de Petri de 90 mm. Para diluir este aspirado, utilizou-se mPBS com 1% de SFB (Invitrogen, Carlsbad, EUA), e em seguida foi iniciada a busca dos CCOs sob lupa estéreo microscópica (20X).

Foram selecionados para MIV, CCOs com citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células do *Cumulus-oophorus*. Grupos de 15 a 20 CCOs foram lavados três vezes, e transferidos para gotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral. Esse meio é constituído de Tissue Culture Medium 199 (TCM-199), suplementado com bicarbonato de sódio (2,4 mM), de piruvato de sódio (2,2 mg/mL), cisteamina (50µM), 1% de gentamicina, 10% de SFB, FSH suíno (5 µg/mL; Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), LH suíno (5 µg/mL, Lutropin; Bioniche Animal Health), Estradiol (1µg/ml) e fator de crescimento epidermal (100 ng/µl). O período de maturação foi de 22 a 24h, em incubadora a 38,8 °C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após colocar os CCOs em MIV, os ovários foram contados, pesados e descartados conforme descrito anteriormente.

### 3.3.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

Para a FIV, os CCOs foram lavados três vezes em meio de fecundação (Fert-TALP), e transferidos para gotas de 50 µL deste meio sob óleo mineral. Para a seleção e capacitação espermática *in vitro*, foi utilizado o procedimento descrito por Parrish *et al.* (1995), com modificações. Em cada rotina foram preparados dois tubos eppendorf de 2 mL, em cada um deles adicionado 300 µL da solução de Percoll 90%, e sobre essa camada adicionado gentilmente 300 µL da solução de Percoll 45%. Uma palheta de sêmen bovino congelado foi descongelada a 37 °C por 50 segundos, e com uma gota



avaliava-se a motilidade e vigor espermático. O conteúdo da palheta de sêmen foi dividido e adicionado sobre as camadas de gradiente de Percoll, e os tubos foram centrifugados por 10 min a 1400 G. Ao final dessa centrifugação removia-se o sobrenadante e se adicionava 500 µL de meio de fecundação, sendo então os tubos submetidos a nova centrifugação a 700 G por 2 min. Ao término da centrifugação, determinava-se um volume para concentração espermática final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Em todas as rotinas foram utilizadas palhetas de sêmen de apenas um touro e da mesma partida. Os CCOs ficaram em contato com os espermatozoides durante 18h a 38.8 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> e umidade do ar saturada. O dia da FIV foi considerado o dia 0, para se determinar a cinética do desenvolvimento embrionário.

### 3.3.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após as 18h do início da FIV, as estruturas foram pipetadas para remover as células do *Cumulus-oophorus* e lavadas 3 vezes em meio Fluido de Oviduto Sintético (SOF, do inglês *synthetic oviductal fluid*) suplementado com aminoácidos, 1,5 mM de D-glicose, 0,72 mM de piruvato de sódio, 0,2 mM de glutamina e 1% SFB. Em seguida foram submetidos ao CIV em grupos de 15 a 20 estruturas, em gotas de 100 µL de meio SOF, sob óleo mineral, em estufa a 38.8 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> e umidade do ar saturada. No D5 foi avaliada a taxa de clivagem e realizado o *feeding*, momento em que se removia 50 µL de meio SOF de cada gota e adicionava 50 µL de meio SOF novo.

## 3.4 Grupos experimentais

Baseado em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (COLLARES, 2014; BECKER, 2016), foi definida a pressão de 27,6 MPa, e o tempo de exposição em 2h. Os grupos experimentais estão identificados na tabela 1.

**Tabela 1** - Identificação dos grupos experimentais

<b>Identificação grupo</b>	<b>HGP</b>	<b>Criopreservação</b>
HGP Fresco (HGPF)	Sim	Não
Controle Fresco (CF)	Não	Não
HGP Congelado (HGPC)	Sim	Sim
Controle Congelado (CC)	Não	Sim

### **3.5 Exposição dos embriões à HGP**

No D7 do CIV, foram selecionados os embriões no estágio de blastocisto expandido e classificados morfológicamente em grau 1 e 2 (IETS, 2010). Os embriões selecionados foram removidos da placa de CIV, colocados em placa de Petri ( $\varnothing$  35 mm) contendo solução mPBS e 0,4% de BSA e finalmente distribuídos de forma aleatória entre os grupos experimentais. Os embriões dos grupos expostos à pressão foram colocados em criotubos contendo 750  $\mu$ L de mPBS com 1% de PVP. Em seguida, os criotubos sem tampa foram colocados na câmara de pressão e submetidos à HGP de 27,6 MPa durante 2h. Os embriões dos grupos controles foram transferidos para as gotas de CIV e mantidos em estufa a 38,8 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, com umidade do ar saturada.

### **3.6 Despressurização da câmara**

Após o término do período de exposição à HGP, a despressurização da câmara foi realizada de forma gradual com a redução de aproximadamente 2,5 MPa/min com intervalos de 2 min a cada 5,5 MPa.

### **3.7 Recuperação dos embriões e CIV**

Findada a despressurização da câmara de pressão, os criotubos contendo os embriões foram retirados da câmara e submetidos a centrifugação de 1000 rpm durante 3 min. O conteúdo de cada criotubo foi transferido para placas de Petri ( $\varnothing$  35 mm) e os criotubos lavados no mínimo três vezes com solução de mPBS com 0,4% de BSA para

recuperar os embriões. Em seguida, foi realizada a identificação dos embriões sob esteromicroscópio de luz transmitida (20 X). Os embriões recuperados foram colocados em CIV, e dependendo do grupo experimental, após 2h submetidos ao processo de criopreservação ou mantidos em CIV por 72 h.

### **3.8 Coleta das amostras para análise de expressão gênica**

Amostras de 5 blastocistos expandidos de cada grupo experimental foram fixados 2h após a exposição à HGP para a análise da expressão gênica. 2h após o descongelamento, outra amostra de embriões de cada grupo experimental foi coletada e fixada para análise da expressão gênica. Para isso, os embriões foram lavados em solução de mPBS contendo 1% de PVP, colocados em criotubos de 0,5mL e armazenados em nitrogênio líquido até a análise de expressão gênica.

#### **3.8.1 Determinação e quantificação da expressão gênica**

Realizou-se pela técnica de transcriptase reversa por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR) a determinação da expressão dos genes CASP7, NET1, HSPH1, HSPB8, BAX, BCL-2. Inicialmente, a extração de RNA das amostras foi obtida usando RNeasy Micro Kit (50) (Qiagen, EUA). O RNA amplificado foi convertido para cDNA usando a transcrição reversa do GoScript (Promega, Brasil). Foram seguidos os protocolos especificados pelos fabricantes. As seqüência de *primers* dos genes bovinos CASP7, NET1, HSPH1, HSPB8, BAX, BCL-2 foram projetados usando o software Primer-BLAST disponível no National Center for Biotechnology Information, e encontram-se na tabela 2.

**Tabela 2** - Sequência de *primers* utilizados na análise da expressão gênica por PCR em tempo real

Gene	Primer sequences (5' - 3')	Código no Gen Bank
BAX	F- GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT	XM_015458140.1
	R- ACAGCTGCGATCATCCTCTG	
BCL2	F- GAGTTCGGAGGGGTCATGTG	NM_001166486.1
	R- GGGCCATACAGCTCCACAAA	
CASP7	F- TAACAGGAATGGGTGTCCGC	XM_002698509.4
	R- CTCACATCGAAACCCAGGCT	
HSPH1	F- CCAGATGCCGAGGCTAATGA	XM_005213576.3
	R- CCCTAACTGCCAGACCAAGT	
HSPB8	F- AAGTTTCTAGGCCTGCGTCC	NM_001014955.1
	R- AAGACACTCCAGCCACGAAG	
NET1	F- TTTAACACCTGGCCCCCATT	XM_010811281.1
	R- TTGTTTGACCAAAGCGCCTG	

### 3.9 Congelamento dos embriões

Para a criopreservação, os blastocistos expandidos foram removidos da placa de CIV, e lavados em solução mPBS com 0,4% BSA. Em seguida, os embriões foram expostos à solução crioprotetora composta por mPBS com 0,4% de BSA e 1,5M de etileno glicol por, no mínimo, 5 min e, no máximo, 20 min. Os embriões foram envasados em palhetas de plástico de 0,25 mL.

As palhetas foram então transferidas para o equipamento de congelamento TK 2000 (Tetakon, Brasil) em temperatura ambiente. O programa de resfriamento selecionado reduziu a temperatura até -6°, quando foi realizada a indução da cristalização. Em seguida, a curva de congelamento (0,3°C/min) resfriou as amostras até atingir a temperatura de -35°C. Após estabilização, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas até o momento do descongelamento.

### 3.10 Descongelamento dos embriões e CIV

As palhetas foram removidas do nitrogênio líquido e em seguida colocadas em banho-maria a 37°C/30 s. O conteúdo das palhetas foi depositado em placas de Petri contendo solução de mPBS com 0,4% de BSA suplementada com 0,25 M de sacarose. Os embriões foram expostos a esta solução por no mínimo 3 min, e no máximo 10 min e lavados em mPBS com 0,4% de BSA. Após foram transferidos para gotas de meio SOF condicionado, onde foram submetidos a CIV por 72 h a 38,8°C em atmosfera com umidade saturada contendo 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. As taxas de re-expansão foram avaliadas com 4 horas de cultivo e as taxas de eclosão observadas 24 h, 48 h e 72 h após o descongelamento.

### 3.11 Contagem do número total de células

Ao avaliar a sobrevivência embrionária, determinada pela eclosão, em três momentos (24h, 48h e 72h) após o descongelamento, blastocistos eclodidos foram removidos das gotas e realizada coloração para contagem do número de células. A coloração empregada foi a descrita por Thouas *et al.* (2001), com as seguintes modificações: os blastocistos eclodidos foram incubados em 500 µl de solução alcoólica contendo 25 µg/ml Hoechst (Bisbenzimidide H 33258) e armazenados a 4°C durante a noite. Os blastocistos corados foram então transferidos para uma gota de glicerol sobre uma lâmina, e pressionados suavemente com uma lamínula. Para a determinação do número total de células (TCN, do inglês *total cell number*) as lâminas foram examinadas em microscópio invertido (400X) equipado com uma lâmpada ultravioleta e filtros de excitação (460nm).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PIV de embriões bovinos

O número de ovários que tiveram os folículos aspirados foi de 2058, o que proporcionou a identificação de 7360 complexos *Cumulus oophorus* considerados com

aspecto morfológico aptos à MIV. Após a MIV e a FIV, 6410 presumíveis zigotos foram cultivados *in vitro*. A partir de 23 rotinas, a taxa média de clivagem foi de 70,7% (4537/6410), e a taxa média de blastocistos no D7 foi de 32% (2058/6410), conforme dados da tabela 3.

**Tabela 3 - PIV de embriões bovinos**

Oócitos em MIV	Oócitos em CIV	Clivados	Taxa de clivagem (%)	N blastocistos D7	Taxa de blastocistos D7 (%)
225	175	144	82,3	59	33,7
100	63	51	81,0	36	57,1
240	120	93	77,5	48	40,0
510	467	358	76,7	121	25,9
360	260	207	79,6	103	39,6
500	413	294	71,2	90	21,8
450	347	232	66,9	72	20,7
550	522	386	73,9	175	33,5
350	325	245	75,4	99	30,5
405	379	266	70,2	112	29,6
360	354	255	72,0	114	32,2
300	283	178	62,9	138	48,8
285	254	198	78	79	31,1
310	307	224	73,0	100	32,6
195	170	143	84,1	61	35,9
285	259	184	71,0	96	37,1
330	296	209	70,6	100	33,8
345	181	122	67,4	58	32,0
490	417	303	72,7	113	27,1
360	340	250	73,5	141	41,5
260	160	132	82,5	51	31,9
260	129	105	81,4	54	41,9
200	189	156	82,5	38	20,1

#### 4.2 Exposição dos embriões à HGP e o efeito sobre a viabilidade de embriões frescos cultivados *in vitro* por 72 h

A primeira etapa dos experimentos consistiu em expor os embriões no D7 à HGP e imediatamente após, cultivá-los *in vitro* para avaliar a sobrevivência embrionária. A sobrevivência do grupo experimental e seu respectivo controle foram analisados estatisticamente pelo teste do Chi-Quadrado ( $p \leq 0,05$ ). Foram utilizados 233 blastocistos expandidos em 11 repetições. Os resultados apresentados na tabela 4 mostram que não há diferença na taxa de eclosão entre os embriões cultivados *in vitro* imediatamente após a exposição à HGP e o respectivo controle, indicando que a HGP não causa efeitos deletérios sobre a capacidade de desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto eclodido.

**Tabela 4** - Taxas de eclosão de blastocistos expandidos bovinos PIV submetidos à HGP e cultivados *in vitro* por 72 h.

Grupo	Embriões	Embriões Eclodidos
	N	N (%)
CF	111	98 (88,2)
HGPF	122	111 (90,9)

#### 4.3 Exposição dos embriões à HGP e o efeito sobre a viabilidade de embriões congelados/descongelados e cultivados *in vitro* por 72h

Duzentos e oitenta blastocistos expandidos foram utilizados em 12 repetições. As taxas de re-expansão e eclosão foram analisadas estatisticamente pelo teste do Chi-Quadrado ( $p < 0,05$ ). Os embriões do grupo HGPC não mostraram diferença nas taxas de re-expansão e eclosão em relação ao grupo controle. Os resultados são apresentados nas tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** - Taxas de re-expansão 4 horas após o descongelamento, de blastocistos expandidos criopreservados 2h após a exposição à HGP.

<b>Grupo</b>	<b>Embriões N</b>	<b>Embriões Re-expandidos N (%)</b>
<b>CC</b>	138	92 (66,6)
<b>HGPC</b>	142	106 (74,6)

**Tabela 6** - Taxas de eclosão em diferentes momentos (24h, 48h e 72h) após o descongelamento dos blastocistos expandidos criopreservados.

<b>Grupo</b>	<b>24 horas</b>			<b>48 horas</b>		<b>72 horas</b>	
	<b>Embriões N</b>	<b>Embriões Eclodidos N</b>	<b>Taxa de eclosão (%)</b>	<b>Embriões Eclodidos N</b>	<b>Taxa de eclosão (%)</b>	<b>Embriões Eclodidos N</b>	<b>Taxa de eclosão (%)</b>
	<b>CC</b>	119	15	12,6	41	34,5	62
<b>HGPC</b>	123	15	12,2	44	35,8	78	63,4

#### 4.4 Contagem do número total de células (TCN)

Um total de 30 embriões do grupo HGPC foi corado e 25 embriões do CC, em 7 repetições. Na tabela 7 estão apresentados o TCN em blastocistos eclodidos 24h, 48h ou 72h após o descongelamento. A contagem do TCN foi analisada estatisticamente por ANOVA, seguido do teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças na estimativa do TCN entre os grupos experimentais.

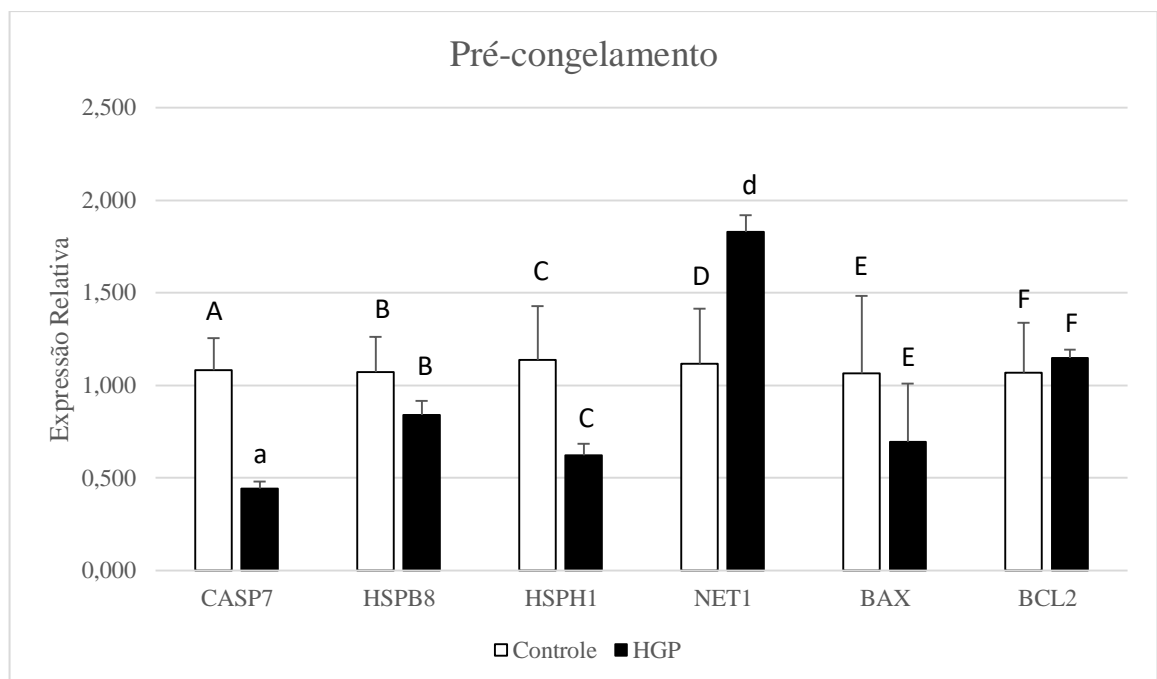


**Tabela 7** - Número médio total de células em blastocistos expandidos PIV tratados com HGP antes do congelamento, 24h, 48h e 72h após o descongelamento no estágio de blastocisto eclodido

Grupo	24h		48h		72h	
	Embriões	Células	Embriões	Células	Embriões	N de células
	N	$\bar{X} \pm sd$	N	$\bar{X} \pm sd$	N	$\bar{X} \pm sd$
CC	6	144,0 $\pm$ 29,2	12	153,1 $\pm$ 24,7	7	162,6 $\pm$ 66,5
HGPC	10	157,9 $\pm$ 34,4	12	173,6 $\pm$ 30,7	8	190,6 $\pm$ 43,1

#### 4.5 Análise de expressão gênica

Os dados de expressão gênica foram examinados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey, e valores de  $p$  inferiores a 0,05 foram considerados significativos. A expressão quantitativa de cada gene foi analisada individualmente. A expressão dos genes CASP7 e NET1 foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) no grupo HGPC 2h após o tratamento com HGP (Figura 1) e 2 h após o descongelamento (Figura 2). A determinação da expressão dos genes foi realizada em quatro replicações.

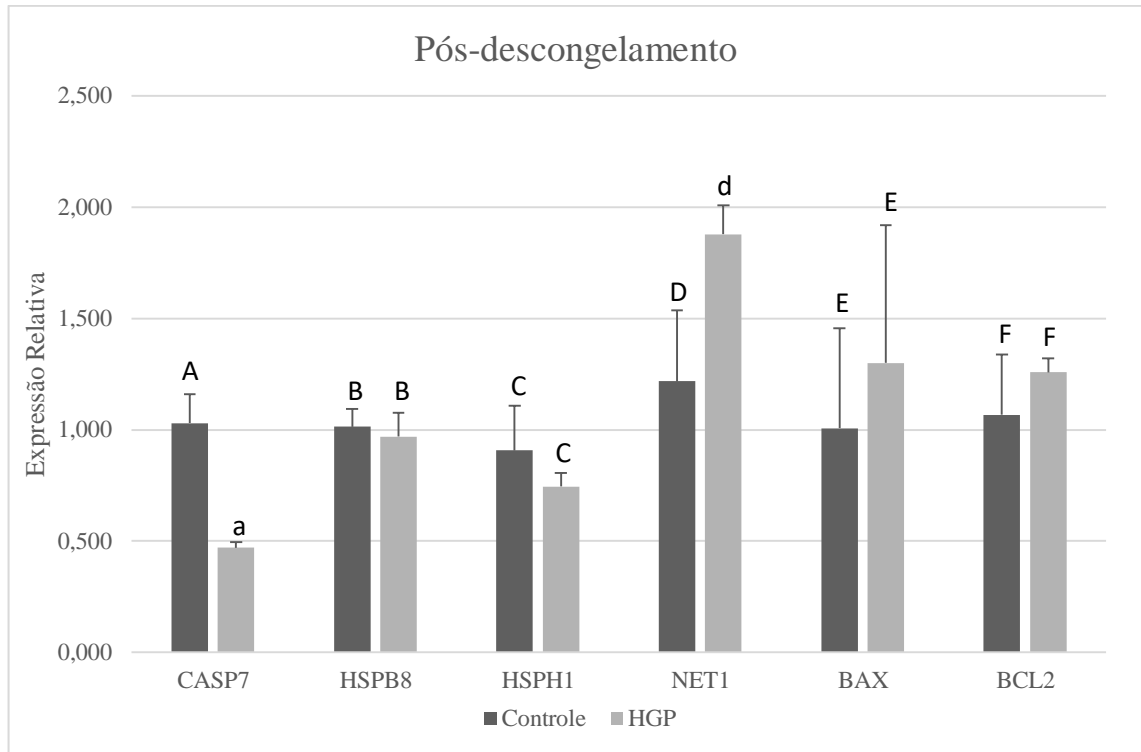


**Figura 1** – Expressão relativa (média + erro padrão médio) dos genes CASP7, HSPB8, HSPH1, NET1, BAX e BCL-2 em embriões bovinos PIV 2h após tratamento com HGP.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

A:a  $p = 0,004753$

D:d  $p = 0,03095$



**Figura 2** - Expressão relativa (média + erro padrão médio) dos genes CASP7, HSPB8, HSPH1, NET1, BAX e BCL-2 em embriões bovinos PIV 2h após o descongelamento

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

A:a  $p = 0,003753$

D:d  $p = 0,045$

## 5 DISCUSSÃO

Na primeira etapa dos experimentos, investigamos o efeito da HGP sobre a viabilidade de blastocistos expandidos PIV através das taxas de eclosão. Observamos que não houve diferença na sobrevivência embrionária *in vitro* entre o grupo HGPF e seu respectivo controle (90,9% vs. 88,2%, respectivamente, tabela 4). Os resultados obtidos revelam que a HGP não exerceu efeito negativo sobre a capacidade de desenvolvimento dos blastocistos expandidos até o estágio de blastocisto eclodido, e isso indica que o gás não causa efeitos nocivos aos embriões, demonstrando a barotolerância embrionária frente à HGP. Os embriões sobreviveram à HGP sem alterações significativas na capacidade de sobrevivência, determinada pelas taxas de eclosão. Em estudos anteriores, Collares (2014) observou que expor embriões murinos no estágio de 8-células à HGP e posteriormente submetê-los a CIV, não alterou a capacidade de desenvolvimento dos embriões ao estágio de blastocisto. Becker (2016) expôs embriões murinos no estágio de blastocisto a diferentes magnitudes de HGP, e não observou diferenças estatísticas entre as taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* dos grupos experimentais, quando comparados com seus respectivos controles. Estas observações corroboram nossos resultados e permitem afirmar que a exposição de embriões murinos e bovinos PIV nos estágios pré eclosão à HGP não induz alterações no potencial de desenvolvimento.

Ao utilizarmos a HGP como tratamento prévio ao congelamento, constatamos que a taxa de re-expansão (tabela 5) e as taxas de eclosão 24h, 48h e 72h após o descongelamento (tabela 6) foram semelhantes ao seu respectivo controle. Embora não haja diferença estatística, é possível observar que 72h após o descongelamento, há uma tendência de aumento na taxa de eclosão do grupo HGPC (tabela 6). Becker (2016) em experimentos com embriões murinos, revelou que a taxa de eclosão dos blastocistos do grupo exposto à 34 MPa de HGP foi superior à observada no grupo controle (70,2% vs. 58,6%, respectivamente;  $P < 0,05$ ). Os resultados diferem dos que obtivemos, o que pode ser justificado pela magnitude de pressão utilizada, o estágio de desenvolvimento embrionário e a espécie. Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, as taxas de re-expansão e eclosão obtidas foram semelhantes entre os embriões do grupo HGPC e os embriões do grupo CC. Ao considerarmos os experimentos realizados com exposição de embriões bovinos PIV à HHP e posterior congelamento (PRIBENSKZY *et*

*al.*, 2005b) ou vitrificação (PRIBENSZKY *et al.*, 2008a), os autores relataram taxas de sobrevivência significativamente superiores nos grupos tratados com HHP em comparação aos grupos não tratados. As diferenças entre os nossos resultados e os dos autores referenciados podem ser em decorrência do uso de diferentes sistemas de cultivo e/ou sistemas de criopreservação, inclusive pela presença de SFB no meio SOF utilizado no CIV, pois sabe-se que o SFB pode afetar a criotolerância embrionária (MUCCI *et al.*, 2006).

Ao compararmos o grupo HGPC com o grupo CC na estimativa de TCN de blastocistos eclodidos 24h, 48h e 72h após o descongelamento, a retomada do desenvolvimento dos blastocistos após o descongelamento não diferiu entre os grupos experimentais, no entanto às 72 horas se pode constatar uma tendência (160,6 vs. 192,6 células/embrião) de maior velocidade nos ciclos mitóticos dos embriões expostos à HGP (tabela 7). Trigal *et al.* (2013) observaram um maior número de células da massa celular interna de blastocistos bovinos PIV aquecidos após a vitrificação, que foram previamente expostos à HHP. No entanto, as comparações entre os experimentos são tecnicamente inviáveis devido às diferenças em termos de sistemas de cultivo, estágio de embrião criopreservado, além de diferenças no procedimento de criopreservação e no método de indução de estresse subletal, pois esses pesquisadores utilizaram a HHP como método indutor de estresse e a vitrificação para criopreservar.

Levando em consideração a análise de expressão gênica, os resultados do presente estudo apontaram que a indução do estresse subletal através da HGP altera a expressão dos genes CASP7 e NET1, no entanto a expressão relativa dos genes HSPH1, HSPB8, BAX e BCL2 avaliados podem não ser afetados pelo tratamento com HGP. Uma possível explicação é que diferentes genes podem ou não ser afetados, dependendo da natureza e da magnitude do estresse empregado, do tempo de exposição, da temperatura e de diferentes períodos de recuperação após a exposição ao estresse e a manipulação subsequente.

A avaliação da expressão de determinados genes envolvidos na cadeia apoptótica e na sobrevivência celular é uma possível forma de compreender e esclarecer quais os mecanismos que os embriões utilizam para protegerem-se do estresse subletal, e que os permitem terem respostas mais eficientes (taxas de sobrevivência *in vitro*) após o estresse subsequente, como na criopreservação, por exemplo. Nossos dados corroboram com os de Jiang *et al.* (2016) que também encontraram diferenças

significativas na expressão do gene CASP7 entre os embriões de grupos expostos à pressão e embriões do grupo controle, pois em nossos experimentos este gene apresentou uma infra regulação no grupo HGPC 2h após a exposição à HGP (figura 1) e 2h após o descongelamento (figura 2). Levando em consideração o fato da CASP7 ser um gene pró-apoptótico, a menor expressão deste gene poderia implicar em maior resistência frente a uma situação de estresse subletal e consequentemente maior sobrevivência embrionária. Interessantemente, o gene NET1 que está envolvido em fenômenos de migração, proliferação e diferenciação celular, apresentou uma supra regulação no grupo exposto à HGP nos dois momentos de quantificação gênica (figura 1 e 2). Esses genes relacionados ao estresse foram há pouco identificados em embriões tratados com HHP e vitrificados, e parecem ser elementos que fazem parte de um mecanismo de defesa celular.

Jiang *et al.* (2016) também observaram que quando o procedimento de criopreservação foi realizado 2h após a exposição ao estresse subletal, induziu maiores mudanças de expressão gênica, no entanto, não promoveu melhor taxa de re-expansão quando comparado ao grupo que foi criopreservado 1h após exposição à HHP. Em nosso experimento, ao criopreservar os embriões 2h após a exposição à HGP, observamos alterações na expressão dos genes CASP7 e NET1, contudo, não obtivemos taxas mais eficientes de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto eclodido após o descongelamento. Os autores sugerem que mudanças adicionais na expressão de genes durante a segunda hora de recuperação podem corrigir mudanças já ocorridas durante a primeira hora, cancelando algumas das alterações necessárias para resistir a insultos da criopreservação.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos realizados permitiram observar que a exposição de blastocistos expandidos bovinos PIV à 27,6 de HGP por 2h, e subsequente CIV, não altera o índice de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto eclodido.

A indução de estresse subletal pela HGP alterou a expressão dos genes CASP7 e NET1. A exposição à HGP prévia ao congelamento não modificou a sobrevivência *in vitro* de blastocistos expandidos bovinos PIV após o descongelamento, além de não alterar a cinética do desenvolvimento embrionário, determinada através do número de células.

## 7 PERSPECTIVAS

A PIV de embriões bovinos é uma biotécnica reprodutiva importante que visa explorar e maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas geneticamente selecionadas. Através da punção folicular guiada por ultrassonografia é possível obter oócitos de fêmeas jovens, de alto valor genético, além de fêmeas que não possuem a possibilidade de gerar prole. Além disso, a PIV viabiliza o uso de uma dose de sêmen de diferentes reprodutores para fecundar vários oócitos na rotina de PIV.

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* está bem estabelecida, no entanto, apesar da produção em larga escala de embriões PIV, ainda são enfrentadas limitações como a baixa criotolerância desses embriões. Baseado nisso, alternativas vêm sendo desenvolvidas a fim de melhorar a resistência desses embriões ao processo de criopreservação. Nossos resultados mostraram que o tratamento com pressão aplicada antes do congelamento não melhorou a velocidade de desenvolvimento *in vitro*, a sobrevivência embrionária e o número de células totais dos embriões. Entretanto, a exposição à HGP alterou a expressão dos genes CASP7 e NET1 2h após a pressurização e 2h após o descongelamento. Os resultados deste experimento podem contribuir no delineamento de futuros experimentos que visam incrementar a eficiência das taxas de sucesso da criopreservação de embriões bovinos PIV.

A partir dos resultados obtidos com a exposição de embriões bovinos PIV à HGP de 27,6 MPa durante 2h, pretendemos, em experimentos futuros, elevar a pressão à 34 MPa, objetivando aumentar o estresse subletal e, conseqüentemente, melhorando a resistência desses embriões ao processo de criopreservação. Estudos com oócitos e embriões revelaram que o efeito protetor do tratamento com estresse subletal através da HHP pode diferir dependendo do tempo entre o tratamento e o início da segunda manipulação, como a criopreservação. Baseado nisso, é importante avaliar em experimentos futuros diferentes períodos de exposição e recuperação após à HGP. Estudos a campo também são necessários para avaliar se é possível obter aumento na taxa de prenhez após a transferência de embriões bovinos PIV expostos à HGP antes do congelamento.

O princípio de expor os embriões a uma situação de estresse subletal definido para melhorar a tolerância a um estresse subsequente, pode delinear uma estratégia para obter melhores resultados em diversas ART. Os mecanismos celulares que contribuem para esses processos necessitam ser elucidados, por isso é essencial realizar análises que busquem compreender de forma mais aprofundada as alterações metabólicas e ultraestruturais dos embriões pressurizados.

Gametas e embriões respondem de forma diferente a uma situação de estresse, e, fundamentado neste argumento, é interessante avaliar os efeitos da exposição à HGP em oócitos e espermatozoides utilizados na PIV de embriões. A possibilidade de melhorar a qualidade geral, como a capacidade de fecundação, a competência de desenvolvimento embrionário, e a tolerância a uma situação de estresse, abre uma nova perspectiva na criopreservação no âmbito da embriologia.

É notória a menor criotolerância dos embriões bovinos PIV, e tendo em vista a necessidade econômica de criopreservá-los para sua otimização comercial, o emprego da HGP como indutor de estresse subletal, objetivando a proteção cruzada, pode vir a tornar-se uma alternativa para que o congelamento desses embriões venha a ser uma realidade nas rotinas de PIV.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, n. 3, p. 193-202, 2003.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.

AGCA, Y.; LIU, J., RUTLEDGE, J. J., CRITSER, E. S., CRITSER, J. K. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 2, p. 212-219, 2000.

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

BECKER, B. S. Dissertação de Mestrado: Viabilidade de blastocistos de *mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2016.

BERTOLINI, M.; DA COSTA LANGE, M.; RODRIGUES, J. L. In vitro and in vivo survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, 2005.

BIELANSKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 110-116, 2000.

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

BOCK, I.; LOSONCZI, E.; MAMO, S.; POLGAR, Z.; HARNOS, ANDREA; ANDRAS, D.; PRIBENSZKY, C. Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. **Cryoletters**, v. 31, n. 5, p. 401-412, 2010.

BOCK, I.; RAVEH-AMIT, H.; LOSONCZI, E.; CARSTEA, A. C.; FEHER, A.; MASHAYEKHI, K.; MATYAS, S.; DINNYES, A.; PRIBENSZKY, C. Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? **Reproduction, Fertility and Development**, 2014.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 821-846, 2000.

COLLARES, F. J. F. Dissertação de Mestrado: Expressão gênica e taxas de desenvolvimento de embriões *Mus musculus domesticus* expostos à pressão gasosa no estágio de 8-células e submetidos à crioconservação no estágio de blastocisto. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2014.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375-1385, 2001.

CORY, S.; ADAMS, J. M. Matters of life and death: programmed cell death at Cold Spring Harbor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1377, n. 2, p. R25-R44, 1998.

DE LA FUENTE, R.; KING, W. A. Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. **Zygote**, v. 5, n. 4, p. 309-320, 1997.

DILLER, K. R. Stress protein expression kinetics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 403-424, 2006.

DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 17-26, 1996.

DU, Y.; LIN, L.; SCHMIDT, M.; BØGH, I. B.; KRAGH, P. M.; SØRENSEN, C. B.; LI, J.; PURUP, S.; PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; KUWAYAMA, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; BOLUND, L.; VAJTA, G. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. **Cloning and Stem Cells**, v. 10, n. 3, p. 325-330, 2008a.

DU, Y.; PRIBENSZKY, C. S.; MOLNÁR, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; KUWAYAMA, M.; PEDERSEN, M.; VILLEMOS, K.; BOLUND, L.; VAJTA, G. High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction**, v. 135, n. 1, p. 13-17, 2008b.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v. 42, n. 1, p. 114-119, 1990.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

GARCÍA-DOMINGO, D.; RAMÍREZ, D.; DE BUITRAGO, G. G.; MARTÍNEZ-A, C. Death inducer-obliterator 1 triggers apoptosis after nuclear translocation and caspase upregulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 9, p. 3216-3225, 2003.

GÓMEZ, E; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, C. O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 1013-1021, 2008.

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. A. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. **Archives of Microbiology**, v. 166, n. 5, p. 293-300, 1996.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. **Development**, v. 107, n. 3, p. 597-604, 1989.

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

HANSEN, P. J.; BLOCK, J., LOUREIRO, B., BONILLA, L., HENDRICKS, K. E. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2009.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152-169, 2014.

HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report. **West Virginia Agricultural Experiment Station**, v. 58, 1899.

HITE, B. H.; WEAKLEY, C. E.; GIDDINGS, N. J. The effect of pressure on certain micro-organisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. **West Virginia University Agricultural Experiment Station**, v. 146, 1914.

ISOM, S. C.; LAI, L.; PRATHER, R. S.; RUCKER, E. B. Heat shock of porcine zygotes immediately after oocyte activation increases viability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 6, p. 548-554, 2009.

IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 1, p. 279-284, 1990.

JIANG, Z.; HARRINGTON, P.; ZHANG, M.; MARJANI, S. L.; PARK, J.; KUO, L.; PRIBENSZKY, C.; TIAN, X. Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of In Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

JOUSAN, F.; PAULA, L. A. D. C. E.; BRAD, A. M., ROTH, Z., HANSEN, P. J. Relationship between group II caspase activity of bovine preimplantation embryos and capacity for hatching. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 3, p. 217-220, 2008.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004.

KASHIWAZAKI, N.; OHTANI, S.; MIYAMOTO, K.; OGAWA, S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Veterinary Record**, v. 16, p. 256-257, 1991.

KREGEL, K. C. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177-2186, 2002.

LI, B.; SMITH, C. C.; LAING, J. M.; GOBER, M. D.; LIU, L.; AURELIAN, L. Overload of the heat-shock protein H11/HspB8 triggers melanoma cell apoptosis through activation of transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1. **Oncogene**, v. 26, n. 24, p. 3521, 2007.

LIN, L.; DU, Y., LIU, Y., KRAGH, P. M., LI, J., PURUP, S., ... VAJTA, G. Elevated NaCl concentration improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, n. 3, p. 360-366, 2009.

LIN, L.; LUO, Y.; SØRENSEN, P.; PRÆTORIUS, H.; VAJTA, G.; CALLESEN, H.; PRIBENSZKY, C.; BOLUND, D.; KRISTENSEN, T. N. Effects of high hydrostatic pressure on genomic expression profiling of porcine parthenogenetic activated and cloned embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 3, p. 469-484, 2014.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JR, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n. 4, p. 407-416, 1983.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001.

LOUTRADI, K. E.; KOLIBIANAKIS, E. M.; VENETIS, C. A.; PAPANIKOLAOU, E. G.; PADOS, G.; BONTIS, I.; TARLATZIS, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. 186-193, 2008.

NAHLEH, Z.; TFAYLI, A.; NAJM, A.; EL SAYED, A.; NAHLE, Z. Heat shock proteins in cancer: targeting the 'chaperones'. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 927-935, 2012.

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

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PARK, S. Y.; KIM, E. Y.; CUI, X. S.; TAE, J. C.; LEE, W. D.; KIM, N. H.; LIM, J. H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v. 14, n. 2, p. 125-131, 2006.

PERO, M.; ZULLO, G.; ESPOSITO, L.; IANNUZZI, A.; LOMBARDI, P.; DE CANDITIIS, C.; GASPARRINI, B. Inhibition of apoptosis by caspase inhibitor Z-VAD-FMK improves cryotolerance of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 108, p. 127-135, 2018.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2015.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; CSEH, S.; SOLTI, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 87, n. 1-2, p. 143–150, June 2005a.

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, 2005b.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; KÚTVÖLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J.; LEDERER, J. Improved post-thaw motility,



viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 181-182, 2007.

PRIBENSZKY, C.; SIQUEIRA, F. E.; MOLNÁR, M.; HARNOS, A.; RUMPF, R. Improved post-warming developmental competence of open pulled straw-vitrified in vitro-produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 1, p. 125-125, 2008a.

PRIBENSZKY, C.; DU, Y.; MOLNÁR, M.; HARNOS, A.; VAJTA, G. Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1, p. 200-207, 2008b.

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

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

RALL, W. F.; MEYER, T. K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 31, n. 3, p. 683-692, 1989.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 3, p. 320-327, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence

or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

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. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 282-283, 2012.

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

SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 4, p. 585-590, 2011.

SUN, X.; FONTAINE, J. M.; REST, J. S.; SHELDEN, E. A.; WELSH, M. J.; BENNDORF, R. Interaction of human HSP22 (HSPB8) with other small heat shock proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2394-2402, 2004.

THOUAS, G. A.; KORFIATIS, N. A., FRENCH, A. J., JONES, G. M., & TROUNSON, A. O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 3, n. 1, p. 25-29, 2001.

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**, v. 48, n. 2, p. 200-206, 2013.

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

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G.; BOOTH, P. J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESON, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**, V. 18, p. 191-195.

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

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophoctoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, n. 1, p. 47-56, 1997.

VANDAELE, L.; THYS, M.; BIJTTEBIER, J.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; MAES, D.; MEIER, E.; VAN SOOM, A. Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 505-511, 2010.

VENDRELL-FLOTATS, M.; ARCARONS, N.; BARAU, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; MOGAS, T. Effect of heat stress during in vitro maturation on developmental competence of vitrified bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S4, p. 48-51, 2017.

WAKCHAURE, R.; GANGULY, S.; SHARMA, S.; PRAVEEN, P. K.; SHARMA, M.; MAHAJAN, T. A Review on Cryopreservation of Embryos and its Research Implications in Animal Breeding and Reproduction. **Internacional Journal of Pharmacy & Biomedical Research**, v. 2, n. 5, p. 11-16, 2015.

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**, v. 68, n. 2, 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, n. 4059, p. 411-414, Oct. 1972.

WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A.; MOOR, R.M. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 11, p. 560, 1974.

WILLADSEN, S. M. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. **The Freezing of Mammalian Embryos**, v. 52, p. 175-201, 1977.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Sciences**, v. 2, p. 1071-1079, 1972.

WILMUT, I.; ROWSON, L. E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v. 92, n. 26, p. 686-690, 1973.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane–solute–water systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 103-129, 1999.

WOUTERS, J. A.; JEYNOV, B.; ROMBOUTS, F. M.; DE 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**, v. 145, n. 11, p. 3185–3194, Nov. 1999.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LEMME, E.; KORSawe, K.; NIEMANN, H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 593-603, 2004.

WU, Y.-Y.; CHEN, L.; WANG, G. L.; ZHANG, Y. X.; ZHOU, J. M.; HE, S.; ZHU, Y. Y. Inhibition of hepatocellular carcinoma growth and angiogenesis by dual silencing of NET-1 and VEGF. **Journal of Molecular Histology**, v. 44, n. 4, p. 433-445, 2013.

YAMAMOTO, Y.; OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.; HACHINOHE, Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplements**, n. 32, LONDON, P. 399-403, 1982.

YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, n. 275, p. 1129–1136, 1997.

YANG, M.; RAJAMAHENDRAN, R. expression of bcl-2 and bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3-4, p. 159-169, 2002.

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

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 57-70, 2001.