

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

**VIABILIDADE DE BLASTOCISTOS DE *Mus musculus domesticus* EXPOSTOS
À ALTA PRESSÃO GASOSA E SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

Autor: Bruno Silveira Becker

PORTO ALEGRE

2016

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

**VIABILIDADE DE BLASTOCISTOS DE *Mus musculus domesticus* EXPOSTOS
À ALTA PRESSÃO GASOSA E SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

Autor: Bruno Silveira Becker

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

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Becker, Bruno Silveira

Viabilidade de blastocistos de *Mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação / Bruno Silveira Becker. -
- 2016.
51 f.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Alta Pressão Gasosa. 2. Criopreservação. 3. Resposta ao Estresse Subletal. 4. Blastocisto Murino. I. Rodrigues, José Luiz Rigo, orient. II. Título.

Bruno Silveira Becker

VIABILIDADE DE BLASTOCISTOS DE *Mus musculus domesticus*
EXPOSTOS À ALTA PRESSÃO GASOSA E SUBMETIDOS À
CRIOPRESERVAÇÃO.

Aprovado em 24 FEV 2016

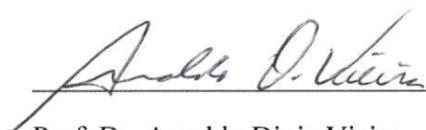
APROVADO POR:



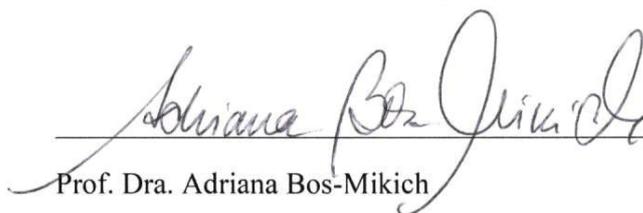
Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão



Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão



Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira
Membro da Comissão



Prof. Dra. Adriana Bos-Mikich
Membro da Comissão

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz Rodrigues, pelo convite feito em junho de 2012 para que me juntasse a equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução e pelo apoio recebido no momento em que mais precisei. Também agradeço pelos conselhos e visões de mundo e sociedade distribuídos ao longo de todos esses anos, ensinando-me que o resultado na pesquisa científica e na ciência é mérito daqueles que, simplesmente, praticam diariamente suas técnicas e teorias, sem contar os grandes ensinamentos sobre enologia.

À equipe do Laboratório, em especial, ao Dr. Maurício Salviano, Sr. João Roberto, e ao Favorino Collares, futuro colega no curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, um grande profissional ao qual agradeço o apoio e sugestões neste curto período em que convivemos, e pelas oportunidades que sua Equipe proporcionou na vida de minha família.

Aos colegas da Faculdade de Veterinária, em especial novamente ao Sr. João, à Amanda, minha eterna amiga da ETCOM, e aos colegas da secretaria do PPGCV, Zico e Alice, por todo auxílio necessário, pela amizade e pelas ótimas conversas sobre a vida cotidiana, não esquecendo dos litros de café compartilhados.

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

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

À minha esposa Denise, pelo carinho, amor apoio e compreensão em todos os momentos que esteve ao meu lado; e à sua família, em especial meu sogro Adelson e minha sogra Neide, pelo sempre excelente acolhimento que recebi, mesmo antes de sermos uma única Família.

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

MUITO OBRIGADO!

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

A alta pressão gasosa (*high gaseous pressure*, HGP) tem sido descrita como um agente estressante capaz de induzir resposta ao estresse subletal, fornecendo proteção celular a estresses subsequentes, como a criopreservação, embora os mecanismos celulares envolvidos ainda não estejam elucidados. Este princípio foi investigado em blastocistos murinos expostos a diferentes tratamentos utilizando-se HGP, seguidos ou não de criopreservação. De um total de 427 fêmeas de *Mus musculus domesticus* superovuladas, 308 (72,1%) produziram 3070 blastocistos viáveis (média de $7,2 \pm 11,5$ blastocistos/fêmea superovulada e de $10,0 \pm 12,5$ blastocistos/fêmea responsiva ao tratamento superovulatório) que foram expostos a tratamentos de distintas pressões e tempos de exposição, em quatro grupos experimentais: (a) 20,7 MPa por 2 h (P20.T2); (b) 20,7 Mpa por 4 h (P20.T4); (c) 27,6 Mpa por 2 h (P27.T2); e (d) 34,5 Mpa por 2 h (P34.T2). Todos os grupos foram pareados com controles não expostos à HGP. No primeira parte do experimento, embriões foram expostos à HGP, conforme os grupos experimentais acima, e posteriormente submetidos ao cultivo *in vitro* por 72 h com o objetivo de verificar a influência dos protocolos de HGP sobre a taxa de eclosão. Não houve diferença nas taxas de eclosão e na morfologia entre os grupos experimentais e os controles. Já na segunda parte do experimento, os embriões foram expostos à HGP, conforme os grupos experimentais acima, e posteriormente criopreservados por curva de congelamento clássica (rápida). Após o descongelamento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 72 h para a avaliação das taxas de eclosão entre os grupos. A taxa de eclosão do Grupo P34.T2 foi significativamente maior do que a dos controles criopreservados não expostos à HGP (70,2% vs. 58,6%, $p < 0,05$). Conclui-se que a HGP pode ser usada como agente estressor subletal sem perda da viabilidade embrionária, e que o uso da HGP de 34,5 MPa por 2 h prévio à criopreservação modificou positivamente a taxa de sobrevivência *in vitro* de blastocistos murinos criopreservados.

Palavras-Chave: alta pressão gasosa, criopreservação, resposta ao estresse subletal, blastocisto murino.

ABSTRACT

High gaseous pressure (HGP) has been reported as a sublethal stressor able to induce "sublethal stress response", providing cell protection to subsequent stress, such as cryopreservation, although the involved cellular mechanisms are little understood. This principle was investigated on murine blastocysts exposed to different HGP treatments with and without subsequent cryopreservation. A total of 308 (72.1%) out of 427 superovulated *Mus musculus domesticus* females produced 3,070 viable blastocysts (7.2 ± 11.5 blastocysts/superovulated mouse and 10.0 ± 12.5 blastocysts/female responsive to superovulation) that were exposed to distinct pressure intensities and exposure times, according to four experimental groups: (a) 20.7 MPa for 2 h (P20.T2); (b) 20.7 MPa for 4 h (P20.T4); (c) 27.6 MPa for 2 h (P27.T2); and (d) 34.5 MPa for 2 h (P34.T2). All groups were compared with non-exposed HGP controls. In the first part of the experiment, embryos were exposed to HGP treatments, according to the experimental groups as above, and subsequently *in vitro*-cultured for 72 h aiming to compare the effects of the HGP protocols on subsequent hatching rates. No differences in hatching rates and morphology were observed between experimental and control groups. In the second part of the experiment, embryos were exposed to HGP treatments, according to the experimental groups as above, and subsequently cryopreserved by rapid (classic) freezing. After thawing, embryos were *in vitro*-cultured for 72 h to compare hatching rates between groups. Hatching rates in the P34.5.T2 group were significantly higher than for the cryopreserved control embryos with no HGP treatment (70.2% vs. 58.6%, $p < 0.05$). Therefore, we conclude that HGP can be used as a stressor without compromising subsequent *in vitro* embryo viability, and the use of HGP at 34.5 MPa for 2 h prior to cryopreservation improved the *in vitro* survival of cryopreserved murine blastocysts compared with control counterparts.

Keywords: high gaseous pressure, cryopreservation, sublethal stress response, murine blastocyst.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Faixas de sobrevivência de embriões murinos expostos a diferentes pressões hidrostáticas por diferentes tempos de exposição..... 22
- Figura 2 - Taxas de eclosão de blastocistos murinos submetidos à HGP e cultivados *in vitro* por 72 h..... 34
- Figura 3 - Taxas de eclosão de blastocistos murinos submetidos à HGP, criopreservados, descongelados e cultivados *in vitro* por 72 h..... 35

ANEXO C

- Figura 4 - Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais/UFRGS.....51

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Principais sistemas métricos de pressão e suas interconversões..... | 28 |
| Tabela 2 - | Grupos experimentais e controle com os respectivos tratamentos (pressão e tempo), crioprocédimentos e identificação..... | 29 |
| Tabela 3 - | Resultado da superovulação de fêmeas de <i>Mus musculus domesticus</i> utilizadas no experimento..... | 32 |

ANEXO A

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 4 - | Formulação do meio mKSOM (50 mL) | 49 |
|------------|--|----|

ANEXO B

| | | |
|------------|---------------------------------------|----|
| Tabela 5 - | Formulação do meio mPBS (50 mL) | 50 |
|------------|---------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

| | |
|---------------------|---|
| % | Porcentagem |
| ± | Mais ou menos |
| °C | Graus Celsius |
| µL | Microlitros |
| mL | Mililitros |
| atm | Atmosferas |
| kgf/cm ² | Quilograma-força por centímetro quadrado |
| PSI | Libra por polegada quadrada |
| MPa | Megapascal |
| mca | Metros de coluna d'água |
| MPa/min | Megapascal por minuto |
| P20.T2.C | 20,7 Megapascais por 2 horas seguido de criopreservação |
| P20.T2.F | 20,7 Megapascais por 2 horas seguido de cultivo celular |
| P20.T4.C | 20,7 Megapascais por 4 horas seguido de criopreservação |
| P20.T4.F | 20,7 Megapascais por 4 horas seguido de cultivo celular |
| P27.T2.C | 27,6 Megapascais por 2 horas seguido de criopreservação |
| P27.T2.F | 27,6 Megapascais por 2 horas seguido de cultivo celular |
| P34.T2.C | 34,5 Megapascais por 2 horas seguido de criopreservação |
| P34.T2.F | 34,5 Megapascais por 2 horas seguido de cultivo celular |
| CC | Controle congelado |
| CF | Controle fresco |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| m ² | Metro quadrado |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CONCEA | Conselho Nacional de Experimentação Animal |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAVET | Faculdade de Medicina Veterinária |

| | |
|-----------------|--|
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| PIB | Produto interno bruto |
| g | Gramas |
| h | Horas |
| min | Minutos |
| s | Segundo |
| eCG | Gonadotrofina coriônica equina (<i>Equine chorionic gonadotropin</i>) |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana (<i>Human chorionic gonadotropin</i>) |
| HGP | Alta pressão Gasosa (<i>High Gaseous Pressure</i>) |
| HHP | Alta pressão hidrostática (<i>High Hydrostatic Pressure</i>) |
| CSP | Proteínas de choque frio (<i>Cold Shock Proteins</i>) |
| HSP | Proteínas de choque térmico (<i>Heat shock proteins</i>) |
| HSR | Resposta ao choque térmico (<i>Heat shock response</i>) |
| lx | Lux |
| M | Molar |
| mPBS | Tampão fosfato salino modificado (<i>Modified phosphate buffered saline</i>) |
| BSA | Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumin</i>) |
| N/A | Não se aplica |
| ∅ | Diâmetro |
| CO ₂ | Dióxido de carbono gasoso |
| N ₂ | Nitrogênio gasoso |
| O ₂ | Oxigênio gasoso |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| UI | Unidades internacionais |
| vs. | <i>Versus</i> |
| X | Vezes |
| US\$ | Dólar |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1. | Proteínas de choque térmico (HSP) | 17 |
| 2.2. | Estresse celular em microrganismos | 17 |
| 2.3. | Criopreservação de embriões | 18 |
| 2.4. | Danos da criopreservação | 19 |
| 2.5. | Estresse embrionário | 20 |
| 2.6. | Alta pressão hidrostática (HHP) | 21 |
| 2.7. | Alta pressão gasosa (HGP) | 23 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 3.1. | Local de realização dos experimentos | 25 |
| 3.2. | Meios e reagentes..... | 25 |
| 3.3. | Animais experimentais..... | 25 |
| 3.3.1. | Procedência dos animais | 25 |
| 3.3.2. | Alojamento e manutenção dos animais | 26 |
| 3.3.3. | Número de animais utilizados..... | 26 |
| 3.3.4. | Destino das carcaças e animais não utilizados..... | 26 |
| 3.3.5. | Protocolo de superovulação | 27 |
| 3.4. | Grupos experimentais | 27 |
| 3.5. | Coleta e identificação dos embriões | 29 |
| 3.6. | Classificação morfológica dos embriões | 30 |
| 3.7. | Exposição dos embriões à HGP | 30 |
| 3.8. | Despressurização da câmara | 30 |
| 3.9. | Incubação dos embriões para sua recuperação | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.10. Criopreservação dos blastocistos | 31 |
| 3.11. Descongelamento dos blastocistos criopreservados e cultivo <i>in vitro</i> | 31 |
| 4 RESULTADOS | 33 |
| 4.1. Superovulação das camundongas | 33 |
| 4.2. Efeito da HGP sobre a viabilidade de embriões frescos cultivados <i>in vitro</i> por 72 h..... | 33 |
| 4.3. Efeito da HGP sobre a viabilidade de embriões criopreservados após descongelamento e cultivo <i>in vitro</i> por 72 h. | 34 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 36 |
| 6 CONCLUSÃO | 41 |
| 7 PERSPECTIVAS | 42 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 43 |
| ANEXO A – FORMULAÇÃO MEIO mKSOM | 49 |
| ANEXO B – FORMULAÇÃO DO MEIO mPBS | 50 |
| ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA/UFRGS..... | 51 |

1 INTRODUÇÃO

A alteração da temperatura ambiental é um dos fatores estressores mais comuns observado em diferentes espécies, desde micro-organismos unicelulares até plantas e animais (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). O mecanismo de resposta, tanto em eucariotos quanto procariotos, ao estresse por choque térmico tem sido investigado em muitos modelos experimentais. Em geral, essa resposta envolve uma supra regulação ou indução de uma família de proteínas denominadas HSP, cujas funções são essencialmente minimizar o estresse celular causado pela elevação da temperatura (COLACO *et al.*, 2013).

Conforme postularam Lindquist e Craig (1988), essa resposta ao estresse é o mais abrangente sistema inespecífico de expressão gênica conhecido entre os seres vivos, sendo altamente conservado e identificado em todos os organismos em que tem sido estudado, de arqueobactérias e eubactérias até plantas e animais, embora certas características da resposta possam variar entre os organismos. A teoria proposta foi de que o estresse térmico induzia a expressão de genes, até então quiescentes, os quais promoviam na célula estressada a produção de determinadas classes de proteínas, entre elas as HSP. O processo pelo qual essas células respondiam ao estímulo ficou conhecido como HSR. Posteriormente, verificou-se que este processo era um fenômeno praticamente universal entre todos os seres vivos (KRAUSE; RODRIGUES-KRAUSE, 2011), sendo caracterizado pelo aumento extremamente rápido na expressão das HSP pelas células quando expostas não apenas ao calor, mas também a diversos outros desafios metabólicos, físicos e ou químicos (AHMED *et al.*, 2012). Esses agentes estressantes indutores compartilham em comum a propriedade de serem “caótipos proteicos”, ou seja, afetam, de modo adverso, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas e componentes celulares (MINOWADA; WELCH, 1995). Quando ocorre o acúmulo destas proteínas sem a correta conformação em virtude do estímulo estressor externo, tem início a HSR, desencadeando uma cascata de reações intermediárias até a resposta adequada ao estresse (VERGHESE *et al.*, 2012).

Embriões mamíferos tiveram a sua viabilidade mensurada após a exposição à HHP, visando empregar o estresse subletal como instrumento para proporcionar uma

posterior resposta à criopreservação (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a e 2005b; BOCK *et al.*, 2010; PRIBENSZKY *et al.*, 2010; PRIBENSZKY; VAJTA, 2011). Seguindo o mesmo princípio da exposição ao estresse subletal, o objetivo dos experimentos nesta dissertação foi determinar a taxa de eclosão de blastocistos murinos criopreservados após exposição a diferentes HGP (20,7 MPa por 2h e 4h; 27,6 MPa e 34,5MPa por 2h).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas de choque térmico (HSP)

As HSP são consideradas chaperonas moleculares, cujo papel biológico é manter as proteínas recém-sintetizadas na correta conformação, permitindo-lhes atravessar membranas biológicas ou diferentes compartimentos celulares, tais como o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. Também impedem a desnaturação de proteínas e ajudam na sua renaturação durante e depois de períodos de exposição aos agentes estressores (NAHLEH *et al.*, 2012). Este comportamento foi descrito inicialmente em 1962, quando Ritossa relatou que a exposição de células das glândulas salivares de *Drosophila busckii* ao calor, dinitrofenol ou salicilatos, resultava no surgimento de um novo padrão de espessamento em cromossomos, que representava sítios específicos de transcrição para a síntese proteica.

Embora exista farta bibliografia com pesquisas dedicando atenção às respostas celulares de múltiplos organismos ao choque térmico por aquecimento, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que regulam a adaptação ao estresse causado pelo frio, especialmente em células mamíferas. Em geral, procariotos e eucariotos respondem de maneira similar a esse agente estressor, superexpressando, de forma rápida e pontual, um pequeno grupo de proteínas denominadas CSP (SCHMID *et al.*, 2009). No entanto, ao contrário das HSP, as CSP não parecem ser tão conservadas entre os sistemas procariotos e eucariotos (AL-FAGEEH; SMALES, 2006).

2.2. Estresse celular em microrganismos

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

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

Estes experimentos se baseavam na técnica em que Hite (1899) e Hite, Giddings e Weakly (1914) empregavam a HHP no intuito de reduzir a carga microbiana na conservação de alimentos. Acreditava-se que os microrganismos eram susceptíveis à exposição a HHP. Entretanto, Yayanos, Dietz e Boxtel (1979) observaram a existência de microrganismos marinhos que resistiam às HHP presentes nas grandes profundidades oceânicas. Mais tarde, em 1996, um veículo submersível não tripulado da marinha japonesa coletou organismos procarióticos piezófilos que resistiam a pressões hidrostáticas maiores que 100 MPa nas profundezas do oceano (ABE; KATO; HORIKOSHI, 1999).

2.3. Criopreservação de embriões

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

O principal objetivo do congelamento de embriões é a preservação do metabolismo celular em estado de quiescência através do armazenamento em baixas temperaturas, de forma que este possa ser restabelecido após um período indeterminado de tempo de estocagem (MAZUR; LEIBO; SEIDEL, 2008). De acordo com Silva *et al.* (2015), a manutenção *in vitro* de vários tipos celulares vem se aperfeiçoando, sendo criopreservadas desde células únicas, como espermatozoides, a grupos celulares, como embriões, tecidos e órgãos inteiros. Desta forma, pode-se conservar o genoma de animais de diferentes gerações através de bancos de germoplasma espalhados pelo mundo. A criopreservação também permite o transporte destas células, sendo possível o deslocamento desde curtas distâncias a longas viagens de maneira facilitada, sem que se observe uma perda da viabilidade após o descongelamento (MAZUR; LEIBO; SEIDEL, 2008).

2.4. Danos da criopreservação

Independentemente do método empregado (curva lenta, curva rápida ou vitrificação), muitos são os fatores associados à criopreservação que levam a danos com comprometimento das funções celulares após o reaquecimento. A formação de cristais de gelo, os efeitos tóxicos da solução crioprotetora e o choque osmótico são exemplos de fatores adversos dos crioprotocolos. Segundo Moussa *et al.* (2014), as alterações cromossômicas, as modificações da zona pelúcida, as alterações ultraestruturais do citoesqueleto e das membranas mitocondriais, e a fragmentação do material genético são as alterações mais frequentes desencadeadas pelo processo de criopreservação.

A extensão da lesão depende de diferentes propriedades celulares, que incluem, por exemplo, o tamanho, a forma, e a permeabilidade da membrana (VAJTA; KUWAYAMA, 2006). A retirada da água intracelular, importante fator para minimizar a extensão dos danos, depende da permeabilidade da membrana celular, determinada por sua composição e área, e das características físico-químicas do soluto, principalmente a temperatura e a diferença de concentração entre o meio extra e intracelular (HUGHES; MANCERA, 2014).

Dependendo do tipo celular, as temperaturas abaixo da corporal fisiológica, porém acima de 0°C, são definidas como “zona de perigo” e acarretam injúrias na refrigeração, consideradas irreversíveis (YAVIN *et al.*, 2009). As membranas celulares

são danificadas devido à fase de transição da porção lipídica, período durante a refrigeração em que ocorrem alterações estruturais e funcionais (YAVIN; ARAV, 2007). Vajta e Nagy (2006) afirmam que a exposição de oócitos e embriões a temperaturas entre 15°C e -5°C estão relacionadas a danos às gotas lipídicas citoplasmáticas e a microtúbulos, os quais comprometerão a fecundação e as divisões celulares subsequentes. Injúrias em microtúbulos são consideradas reversíveis, enquanto prejuízos às gotas lipídicas contribuem para a morte dos embriões criopreservados. Ainda segundo os autores, temperaturas entre -5°C e -80°C correspondem à principal fase de injúrias causadas por cristais de gelo, enquanto que temperaturas entre -50 e -150°C podem ocasionar fraturas da zona pelúcida e danos em organelas citoplasmáticas. Temperaturas abaixo de -150°C correspondem à fase de menor injúria, sendo o aquecimento acidental a causa mais provável de ocorrência de danos.

Embora o estresse seja um agente de injúria celular, dependendo do nível de intensidade, ele pode estimular uma resposta celular positiva frente a este processo lesivo e desencadear uma série de eventos que culminam no favorecimento do desenvolvimento celular (PUROHIT *et al.*, 2014). Ainda que a eliminação de qualquer interferente seja o princípio da otimização de uma cultura celular, relatos têm demonstrado que a indução de um preciso e apropriado estresse subletal determina uma resposta metabólica face à uma nova situação de estresse, que resulta em uma mais eficiente manutenção da qualidade embrionária e da sua competência de desenvolvimento (VAJTA *et al.*, 2010).

2.5. Estresse embrionário

Wilson (1973) postulou que seres vivos, durante seus estágios iniciais de desenvolvimento eram mais sensíveis às influências ambientais adversas do que em qualquer outra fase de seu ciclo de vida. Desta forma, a ideia de que procedimentos laboratoriais pudessem melhorar o desempenho e a qualidade embrionária, se alguma vez foi considerada no passado, sempre foi tida por muitos embriologistas como utopia (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Baseados nos experimentos de indução de estresse em microrganismos, pesquisadores passaram a utilizar este princípio em gametas e embriões visando aprimorar as biotécnicas da reprodução (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

Pribenszky *et al.* (2005a) relataram que submeter previamente embriões mamíferos ao estresse aumentaria a tolerância desses indivíduos a uma nova situação de estresse como, por exemplo, à criopreservação. Existem vários fatores que poderiam provocar este estresse, causando alterações no padrão fisiológico celular. Dentre esses, modificação do pH e da osmolaridade do meio de cultura, a privação no fornecimento de suprimentos nutritivos e a alteração da pressão hidrostática (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

Ao serem submetidas a um estresse subletal, as células se adaptam ao novo cenário, e usualmente a taxa de crescimento celular não é afetada. Níveis toleráveis de estresse podem causar adaptação transitória ou uma resposta adaptativa, acompanhada por mudanças fisiológicas temporais que muitas vezes resultam em uma maior tolerância ao estresse (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Entretanto, se o nível do estresse ultrapassar o limite crítico de tolerância, o mesmo irá desencadear o processo de apoptose ou necrose celular (FULDA *et al.*, 2010).

2.6. Alta pressão hidrostática (HHP)

Baseados nas observações das respostas celulares de microrganismo ao estresse causado por HHP, embriologistas realizaram experimentos com o objetivo de quantificar as taxas de sobrevivência e a resposta fisiológica de gametas e embriões criopreservados após a exposição à HHP (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a e 2005b; BOCK *et al.*, 2010; PRIBENSZKY *et al.*, 2010; PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

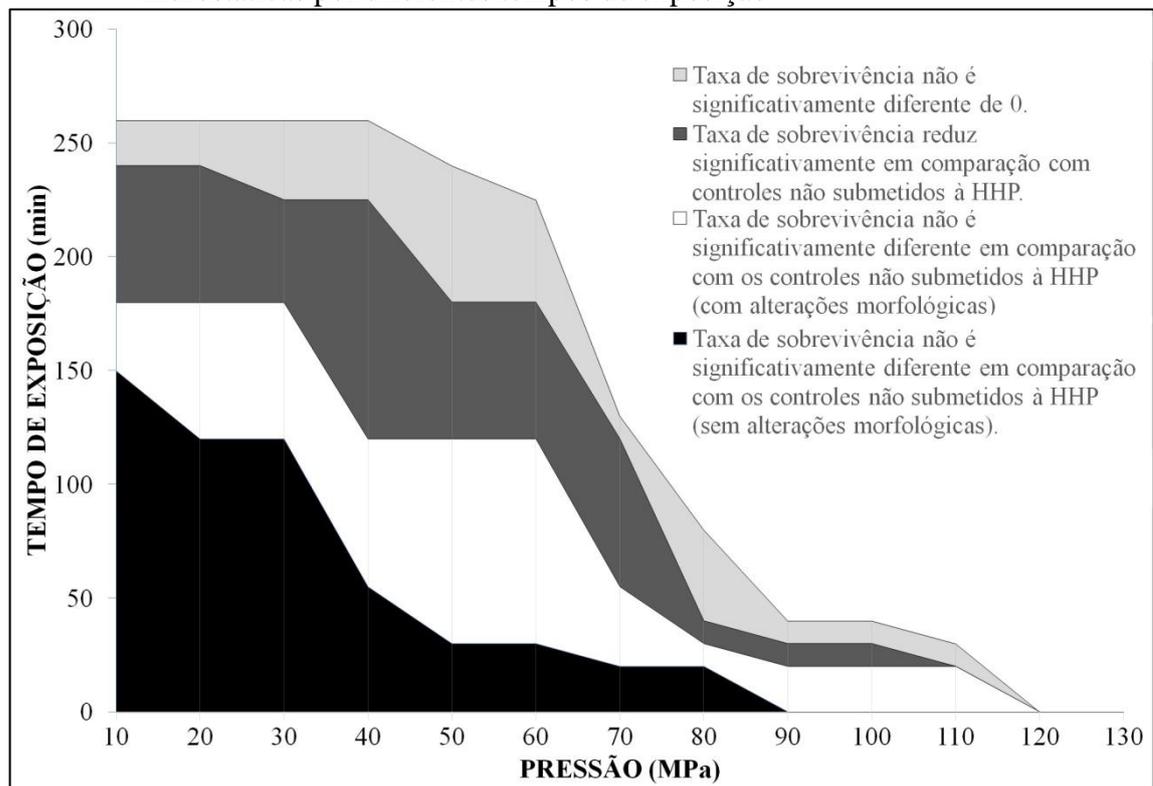
Segundo Pribenszky e Vajta (2011), o diferencial da modificação da pressão hidrostática é que esta causaria um estresse imediato, sendo também uniforme na amostra, com maior confiabilidade, consistência, precisão e segurança. Também citam que os embriões mamíferos em condições fisiológicas estão expostos à pressão de aproximadamente 0,2 MPa e, surpreendentemente, podem resistir até 80 MPa por 120 min.

Pribenszky *et al.* (2005a) comentam que a magnitude e o tempo de exposição a HHP pode ser letal aos embriões murinos, sendo sua sobrevivência dependente deste binômio. Em seus experimentos concluíram que o tempo de 30 min e 300 min de exposição a 90 MPa e a 30 MPa de pressão hidrostática são, respectivamente, letais aos embriões murinos. Neste experimento, ilustrado na Figura 1, foram determinadas quatro

faixas com diferentes graus de letalidade: duas apresentaram taxas de sobrevivência diferentes do grupo controle, sendo que, em uma delas, não houve sobrevivência, e duas apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes ao grupo controle, apenas se diferenciando nas alterações morfológicas quanto à compactação dos embriões.

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

Figura 1 - Faixas de sobrevivência de embriões murinos expostos a diferentes pressões hidrostáticas por diferentes tempos de exposição



Fonte: PRIBENSZKY *et al.*, 2005a, p.146.

Em outro experimento, Pribenszky *et al.* (2005a) utilizaram diferentes HHP para expor os blastocistos murinos antes da vitrificação. A exposição dos embriões à HHP de 60 MPa pelo período de 30 min proporcionou as maiores taxas de sobrevivência dos blastocistos à vitrificação. Os embriões previamente expostos à pressão também apresentaram uma velocidade de reexpansão maior (entre 4 h e 6 h vs. 20 h) e com maior percentual de eclosões em relação aos embriões não expostos (98% vs. 46%). No

mesmo experimento Foi realizada transferência embrionária para o útero de camundongas receptoras e os resultados de sobrevivência *in vivo* não apresentaram diferença significativa em relação aos controles frescos (85% vs. 83%).

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

Embriões bovinos produzidos *in vitro* submetidos aos tratamentos de HHP de 40 MPa e de 60 MPa e após, vitrificados, tiveram, depois de reaquecidos, taxas de re-expansão superiores ao grupo controle vitrificados não tratado anteriormente com HHP (90,% vs. 87% vs. 63%, respectivamente).

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

2.7. Alta pressão gasosa (HGP)

Com uma abordagem diferente e seguindo a linha de indução de estresse em embriões através de elevadas pressões, Rodrigues *et al.* (2012) adaptaram uma câmara de pressão adequada à exposição a elevadas pressões gasosas (HGP). Neste experimento inicial foram expostos oócitos caninos à HGP de 7,7 MPa por 1 h como indutor de estresse sobre o gameta feminino. Os resultados revelaram que a exposição à HGP, a priori, não alterava as taxas de maturação dos oócitos.

Collares (2014) expôs embriões murinos no estágio de 8-células a 15,7 MPa por 2 h e 4 h e após, submeteu-os ao processo de congelamento pelo método de curva clássica no estágio de blastocisto. Após o descongelamento, verificou a viabilidade *in vitro* através das taxas de reexpansão embrionária. Amostras em diferentes momentos do experimento também foram colhidas para a análise da alteração no padrão da

expressão de genes relacionados com a exposição a agentes estressantes. Essa análise não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais e os controles. Segundo o autor, uma possível explicação seria a variação biológica dos embriões entre os grupos e dentro de um mesmo grupo. A exposição dos embriões no estágio de 8-células a 15,7 MPa não comprometeu a viabilidade *in vitro* para desenvolverem-se ao estágio de blastocisto. Em seu experimento, houve uma diferença nas taxas de expansão dos blastocistos criopreservados expostos à HGP durante 120 min. quando comparado com o controle, que somente foi exposto ao processo de congelamento (86,3% vs. 72,8% respectivamente). Desta forma, concluiu que a HGP poderia ser empregada na indução de estresse celular subletal em embriões murinos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da FAVET da UFRGS.

3.2. Meios e reagentes

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

3.3. Animais experimentais

Os animais experimentais foram machos e fêmeas da espécie *Mus musculus domesticus* (camundongo-doméstico) da cepa CF1 suíço-albina. Todas as atividades e procedimentos realizados estiveram de acordo com legislação vigente (BRASIL, 2008; BRASIL, 2010; CFMV, 2002; CONCEA, 2013a; CONCEA, 2013b; CONCEA, 2013c.). O projeto foi aprovado pela CEUA da UFRGS sob a carta de aprovação número 27397.

3.3.1. Procedência dos animais

Os animais experimentais foram adquiridos junto ao CREAL da UFRGS. Fêmeas adultas, com idade a partir de oito semanas, foram utilizadas como doadoras de embriões, e machos adultos foram utilizados para os acasalamentos e produção dos embriões. O transporte dos animais entre o CREAL e o laboratório, ambos na cidade de Porto Alegre/RS, foi realizado em veículo próprio para esta finalidade.

3.3.2. Alojamento e manutenção dos animais

Os animais recém-chegados passaram por um período de ambientação de 15 dias, com o objetivo de reduzir e eliminar os efeitos do estresse causado pelo transporte e mudança de espaço físico.

Após este período, os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da FAVET da UFRGS. O local possui ambientes segregados, sendo uma sala de animais, um almoxarifado, uma sala de procedimentos e um ambiente de limpeza e higienização dos materiais utilizados.

A sala de animais, onde ficavam os camundongos, possui área de 12 m², fechada com exaustão e ventilação forçada, mantendo as condições de temperatura controlada em 22±2°C e luminosidade de 300 lx (ciclo de 14 h claro/10 h escuro). A limpeza da sala ocorreu duas vezes por semana, quando as gaiolas usadas eram trocadas por gaiolas novas higienizadas e forradas com maravalha (Vetsul, Brasil). Os bebedouros eram limpos, tendo sua água trocada. O horário de limpeza foi no início da manhã ou fim de tarde, de maneira a evitar perturbações no período de descanso dos animais (ciclo de luz). A ração (Nuvilab CR-1 - Quimtia, Brasil) e a água foram fornecidas *ad libitum*.

As fêmeas foram acomodadas em gaiolas plásticas de 1.360 cm², apropriadas para este fim, em grupos de até 15 indivíduos, sempre respeitado o limite máximo (CONCEA, 2013c). Os machos, por sua natureza territorialista, foram acomodados individualmente em gaiolas plásticas de 390 cm².

3.3.3. Número de animais utilizados

No total foram empregados nos experimentos 20 machos e 394 fêmeas de *Mus musculus domesticus*.

3.3.4. Destino das carcaças e animais não utilizados

As carcaças de animais foram colocadas em sacos previamente identificados como resíduo biológico e estes armazenados em locais adequados disponibilizados pela FAVET da UFRGS junto às salas de necropsia do setor de Patologia Animal, sendo

estes destinados a empresas terceirizadas, especializadas no correto descarte de resíduos biológicos (BRASIL, 2010.).

Os animais não utilizados e os que restaram ao final do experimento (as fêmeas placas negativas, já reutilizadas, e os machos) foram eutanasiados pelo método de inalação do anestésico isofluorano. Para o procedimento, estes animais foram colocados em caixa plástica transparente hermeticamente fechada contendo algodão embebido com o anestésico (em área segregada dentro da caixa, sem possibilidade de contato do algodão com o roedor) de maneira que a microatmosfera ficasse saturada com fármaco, levando rapidamente o animal à inconsciência e posterior óbito, que foi constatado pela ausência de reflexo corneal e batimentos cardíacos, de acordo com o preconizado pelas normativas vigentes (CONCEA, 2013b; CONCEA, 2013c), e suas carcaças, destinadas conforme parágrafo anterior.

3.3.5. Protocolo de superovulação

As fêmeas foram induzidas à superovulação mediante aplicação via intraperitoneal de 10 UI (0,2 mL) de eCG (Folligon - Intervet, Brasil) e, após 46h, aplicação intraperitoneal de 10 UI (0,2 mL) de hCG (Chorulon - Intervet, Brasil). Após a segunda aplicação, as fêmeas foram colocadas com os machos na proporção de uma a, no máximo, três fêmeas por macho para que ocorresse a cópula. No início da manhã seguinte ao acasalamento (dia 1 da prenhez), as fêmeas foram separadas dos machos e segregadas conforme a presença (placa positiva) ou ausência (placa negativa) de tampão vaginal. As fêmeas placas positivas foram separadas para a coleta de embriões na manhã do quarto dia da prenhez. Já as fêmeas placas negativas foram reutilizadas uma vez mais no tratamento de superovulação após o período 14 dias da constatação da ausência de tampão vaginal.

3.4. Grupos experimentais

O experimento foi desenhado de maneira que as pressões observadas estivessem distribuídas ao longo da escala de pressão compatível com a da capacidade técnica do equipamento (até 41,4 MPa, equivalente à 6000 PSI), e considerando experimentos

prévios já realizados por nosso grupo. Desta forma, foram escolhidas três faixas de pressão para os grupos experimentais (20,7 MPa; 27,6 MPa e 34,5MPa). A Tabela 1 mostra a conversão entre os principais sistemas métricos com as pressões citadas neste trabalho. O tempo de exposição foi definido em 2 h, exceto para a pressão de 20,7MPa, que possui 2 h e 4 h como tempo de exposição.

Tabela 1 - Principais sistemas métricos de pressão e suas interconversões.

| PSI | MPa | mca | atm | kgf/cm² |
|------------|------------|------------|------------|---------------------------|
| 14,7 | 0,1 | 10,3 | 1,0 | 1,0 |
| 1450,4 | 10,0 | 1019,7 | 98,7 | 102,0 |
| 2277,1 | 15,7 | 1601,0 | 155,0 | 160,1 |
| 3000,0 | 20,7 | 2109,3 | 204,1 | 210,9 |
| 4000,0 | 27,6 | 2812,4 | 272,2 | 281,2 |
| 5000,0 | 34,5 | 3515,5 | 340,2 | 351,5 |
| 6000,0 | 41,4 | 4218,5 | 408,3 | 421,8 |
| 8702,3 | 60,0 | 6118,5 | 592,2 | 611,8 |
| 11603,0 | 80,0 | 8158,0 | 789,5 | 815,8 |
| 13053,4 | 90,0 | 9177,7 | 888,2 | 917,7 |

Legenda: PSI - Libra por polegada quadrada; MPa – Megapascal; mca – Metros de coluna d'água; atm – Atmosfera; kgf/cm² – Quilograma-força por centímetro quadrado.

O sistema de nomenclatura dos grupos experimentais segue o modelo Px.Ty.z, que consiste na seguinte sistemática: a letra “P” representa “pressão” e a letra “x” é a variável pressão (MPa); a letra “T” representa “tempo” e a variável “y” é o tempo de exposição (h); a variável “z” é a indicação se os embriões do grupo experimental foram criopreservados (C) ou cultivados *in vitro* imediatamente após a exposição à HGP (F). O sistema de nomenclatura dos grupos controle segue o modelo Cz, que consiste na seguinte sistemática: a letra “C” representa “controle” e a variável “z” é a indicação se os embriões controle foram submetidos ao processo de criopreservação (C) ou cultivados *in vitro* imediatamente após a coleta (F). A Tabela 2 apresenta os grupos experimentais e os controles, bem como os procedimentos aos quais eles foram submetidos.

Tabela 2 - Grupos experimentais e controle com os respectivos tratamentos (pressão e tempo), crioprocédimentos e identificação

| Classificação | Pressão (MPa) | Tempo (h) | Criopreservação | Identificação |
|----------------------|---------------|-----------|-----------------|---------------|
| Grupos experimentais | 20,7 | 2 | Sim | P20.T2.C |
| | 20,7 | 2 | Não | P20.T2.F |
| | 20,7 | 4 | Sim | P20.T4.C |
| | 20,7 | 4 | Não | P20.T4.F |
| | 27,6 | 2 | Sim | P27.T2.C |
| | 27,6 | 2 | Não | P27.T2.F |
| | 34,5 | 2 | Sim | P34.T2.C |
| | 34,5 | 2 | Não | P34.T2.F |
| Grupos controles | N/A | N/A | Sim | CC |
| | N/A | N/A | Não | CF |

Legenda: MPa – Megapascal; h – Horas; N/A – Não se aplica.

3.5. Coleta e identificação dos embriões

As fêmeas doadoras foram eutanasiadas por deslocamento cervical na manhã do quarto dia de prenhez (90 h após aplicação de hCG), em conformidade com a legislação vigente (CFMV, 2002; CONCEA, 2013b), e, submetidas a subsequente abertura da cavidade abdominal. Esta técnica, comumente utilizada em roedores com menos de 200 g, consiste no rompimento da medula cervical e está classificada como procedimento de severidade sem recuperação (UFRGS, 2010). Apesar de possuir restrições pelo CONCEA (2013a), o emprego da técnica de deslocamento cervical foi necessário no experimento pela necessidade de ausência de influências externas sobre o metabolismo embrionário, como por exemplo, ação de fármacos anestésicos e contaminação microbiológica. Isto se deve ao fato de certas drogas ou agentes contaminantes, uma vez presentes na circulação do roedor, causarem danos aos blastocistos, comprometendo a sua viabilidade (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Após a abertura da cavidade abdominal, os cornos uterinos junto com os ovidutos foram retirados a partir de duas incisões, uma na bursa ovárica, separando a salpinxe do ovário, e a outra na base do corno uterino. Os embriões no estágio de blastocisto foram coletados através da perfusão dos cornos uterinos com solução mPBS (WHITTINGHAM, 1971) suplementada com 0,4% de BSA, sob estereomicroscópio (aumento de 10X), com luz incidente. Os blastocistos de cada fêmea foram segregados

entre os grupos experimentais e controles, com o objetivo de diluir o efeito “fêmea” nos experimentos.

3.6. Classificação morfológica dos embriões

As estruturas embrionárias identificadas no lavado dos cornos uterinos de cada doadora foram classificadas morfológicamente (aumento de 60X) e segregadas de forma aleatória entre os grupos experimentais e controles. Nos experimentos foram selecionados somente embriões identificados como blastocistos e classificados com morfologia de grau 1 (ROBERSTON; NELSON, 1999).

3.7. Exposição dos embriões à HGP

Os embriões dos grupos experimentais foram colocados em criotubos contendo 1 mL de mPBS com 0,4% de BSA. Após, os criotubos sem tampa foram transferidos para a câmara de pressão e submetidos à HGP a temperatura de 25 °C no período especificado para cada grupo, conforme descrito na Tabela 2.

Já os embriões do grupo controle imediatamente após a coleta foram transferidos e mantidos em incubadora a 37,5 °C em mPBS com 0,4% de BSA a atmosfera com umidade saturada contendo e ar atmosférico com 5% de CO₂ pelo período em que os blastocistos dos grupos experimentais estiveram submetidos ao tratamento.

3.8. Despressurização da câmara

Findado o tempo de exposição à HGP, padronizou-se a despressurização da câmara com a redução de 0,5 MPa/min com intervalos de 2 min a cada 5,0 MPa.

3.9. Incubação dos embriões para sua recuperação

Após a despressurização padronizada, os criotubos contendo os embriões dos grupos experimentais foram retirados da câmara de pressão e imediatamente colocados

na incubadora pelo período de 2 h a 37,5°C em atmosfera com umidade saturada contendo ar atmosférico com 5% CO₂ com a finalidade de reduzir a espuma formada no meio durante à exposição à HGP e de permitir aos embriões uma resposta fisiológica ao estresse subletal. A redução da espuma permite uma maior eficiência na localização dos blastocistos quando transferidos para uma placa de petri. O conteúdo dos criotubos foi transferido para uma placa de petri (Ø 35 mm) com auxílio de micropipeta de 1000 µL. Cada criotubo foi lavado por três vezes com solução de mPBS com 0,4% de BSA para facilitar a recuperação e a identificação dos embriões.

A procura dos embriões foi feita em esteromicroscópio sob luz transmitida. Os embriões recuperados foram agrupados e então submetidos ao procedimento de criopreservação ou cultivo *in vitro*, dependendo do qual grupo experimental a que pertenciam.

3.10. Criopreservação dos blastocistos

Os embriões destinados à criopreservação foram expostos por, no mínimo, 5 min e, no máximo, 20 min, a solução crioprotetora de mPBS+BSA suplementada com 10% de etilenoglicol e envasados em grupos de até 7 embriões em palhetas de 0,25 mL.

As palhetas foram então congeladas pelo método de curva de resfriamento de *quasi-equilibrium* (MAZUR, 1990), com o abaixamento gradual de temperatura à velocidade de 2,2°C por min até a temperatura de -6°C, quando então foi realizada a indução da cristalização. Após, a curva seguiu a redução de 0,3°C por min até atingir a temperatura de -35°C, momento na qual as palhetas, após estabilização pelo período de 5 min, foram transferidas para o nitrogênio líquido e ficaram armazenadas até o momento do descongelamento. O procedimento de criopreservação foi realizado com auxílio do equipamento de congelamento automático TK 2000 (Tetakon, Brasil).

3.11. Descongelamento dos blastocistos criopreservados e cultivo *in vitro*

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 21°C por 20 s e o conteúdo, diluído em 3 mL de solução de mPBS com 0,4% de BSA suplementada com 0,25 M de sacarose. Após 3 min de exposição a esta solução, os embriões foram lavados em mPBS

com 0,4% de BSA e após, em meio de cultura mKSOM (LAWITTS; BIGGERS, 1993) suplementado com 0,4% de BSA, sendo então cultivados *in vitro* em mKSOM com 0,4% de BSA em gotas sob óleo mineral incubadora pelo período de 72 h a 37,5°C em atmosfera com umidade saturada contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂, quando então foram observadas as taxas de eclosão dos embriões dos grupos controle e experimentais.

4 RESULTADOS

4.1. Superovulação das camundongas

Conforme exposto na Tabela 3, 308 (72,1%) das 427 fêmeas superovuladas apresentaram tampão vaginal no dia seguinte à aplicação de hCG, indicando cópula. Destas, obteve-se estruturas de 210 fêmeas (49,2%), recuperando-se um total de 5.290 estruturas embrionárias. Das 187 fêmeas (43,8%) que apresentaram 5.053 estruturas viáveis, foram recuperados 1.008 mórulas e 3.070 blastocistos.

Com relação ao cálculo de eficiência da produção de embriões através do protocolo de superovulação, obteve-se a média de $7,2 \pm 11,5$ blastocistos para cada fêmea utilizada. A média de blastocistos por fêmea que apresentou pelo menos uma estrutura (independentemente de ser viável ou não) foi de $16,4 \pm 12,7$ blastocistos.

Tabela 3 – Resultado da superovulação de fêmeas de *Mus musculus domesticus* utilizadas no experimento

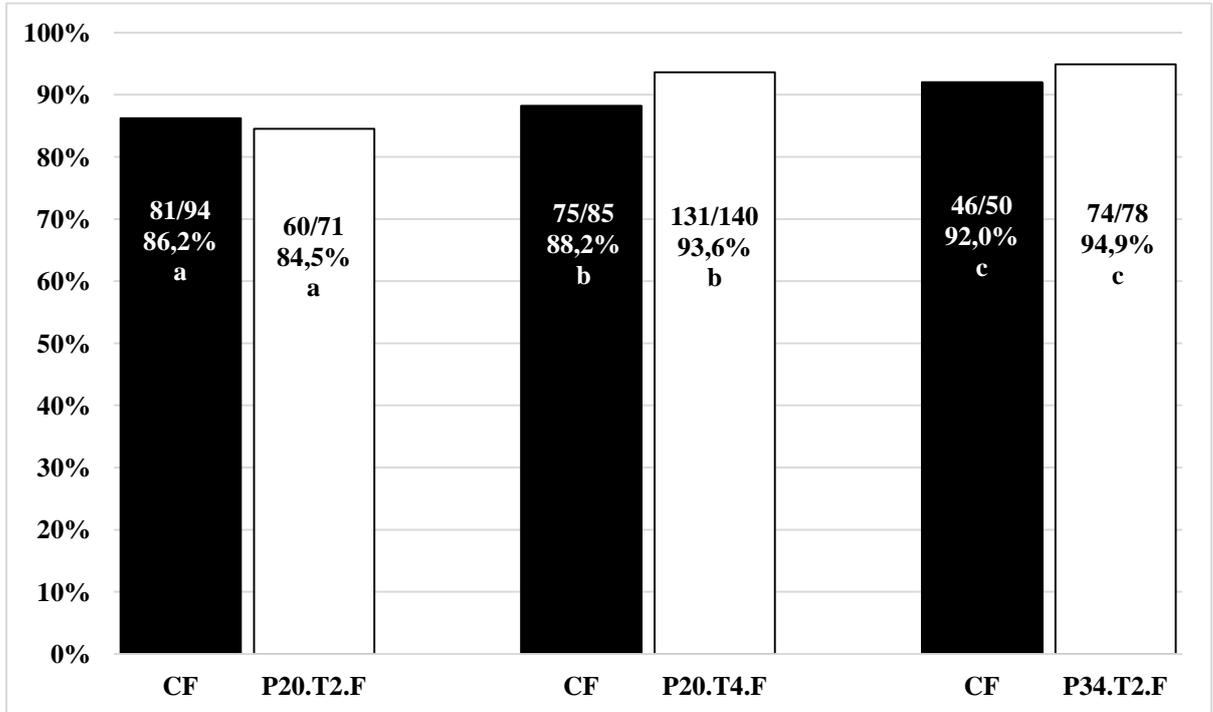
| | n | % |
|------------------------|----------|----------|
| Total | 427 | 100,0 |
| Placa vaginal positiva | 308 | 72,1 |
| Com estruturas | 210 | 49,2 |
| Com estruturas viáveis | 187 | 43,8 |

4.2. Efeito da HGP sobre a viabilidade de embriões frescos cultivados *in vitro* por 72 h

Com a finalidade de verificar qual o efeito somente do uso da pressão, os embriões foram inicialmente expostos à HGP e imediatamente após, cultivados *in vitro*. Uma vez que os grupos experimentais não foram realizados simultaneamente, por limitações técnicas do equipamento, somente foram analisados estatisticamente pelo teste do Chi-Quadrado ($\alpha = 0,05$) o grupo experimental com seu respectivo controle. Os dados apresentados na Figura 2 mostram que não há diferença entre os embriões cultivados *in vitro* logo após a exposição à HGP e os respectivos controles cultivados *in vitro*.

vitro imediatamente após a coleta, indicando que a pressão não causa efeito negativo na capacidade do embrião de levar adiante seu desenvolvimento.

Figura 2 – Taxas de eclosão de blastocistos murinos submetidos à HGP e cultivados *in vitro* por 72 h.

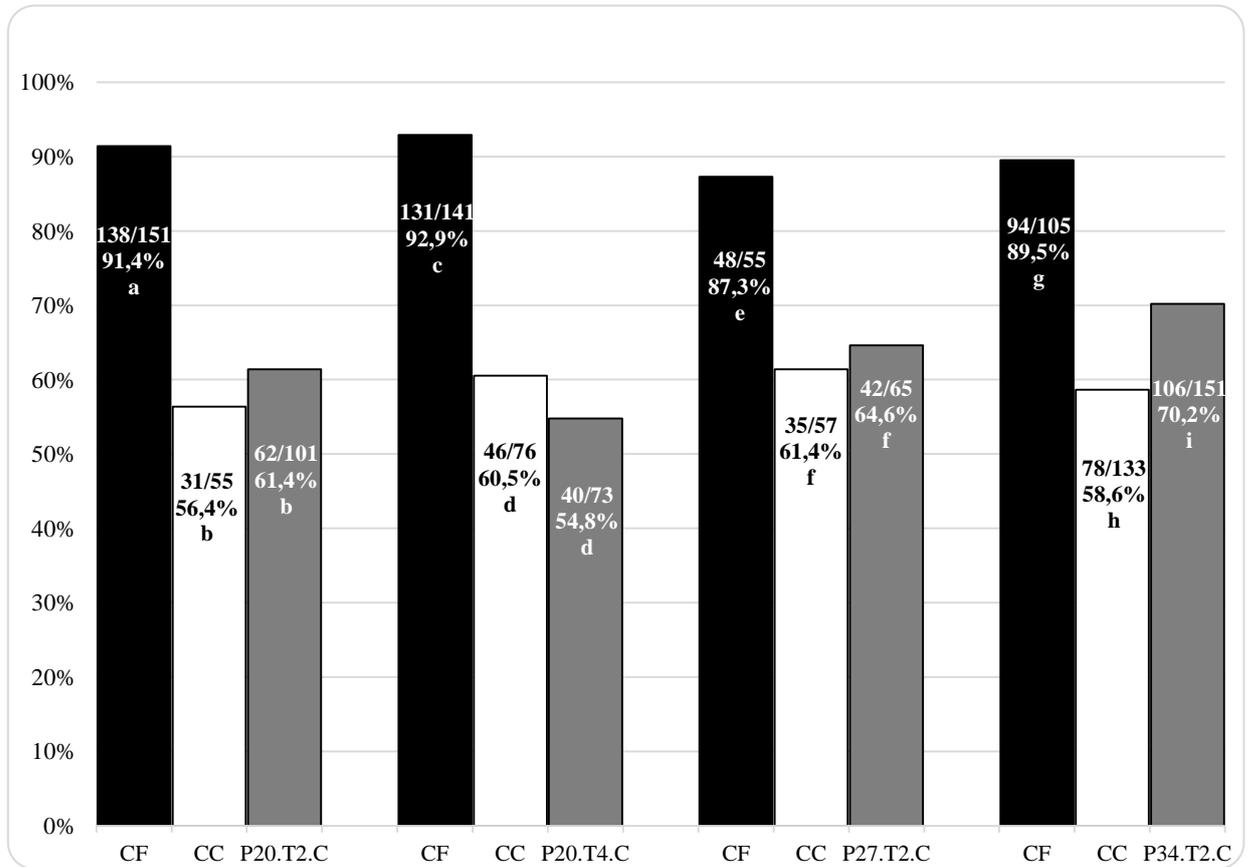


Legenda: CF – Controle fresco; P20.T2.F – Embriões cultivados após exposição à 20,7 MPa durante 2 horas; P20.T4.F – Embriões cultivados após exposição à 20,7 MPa durante 4 horas; P34.T2.C – Embriões cultivados após exposição à 34,5 MPa durante 2 horas. Letras diferentes nas colunas de cada grupo experimental são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Replicações: 3.

4.3. Efeito da HGP sobre a viabilidade de embriões criopreservados após descongelamento e cultivo *in vitro* por 72 h.

Os blastocistos dos grupos experimentais P20.T2.C, P20CT4.C e P27.T2.C não apresentaram diferença na taxa de viabilidade *in vitro* quando comparados com seus respectivos controles, entretanto, os blastocistos do grupo P34.T2.C revelaram maior taxa de eclosão quando comparado ao seu respectivo controle ($P < 0,05$). Os resultados estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 – Taxas de eclosão de blastocistos murinos submetidos à HGP, criopreservados, descongelados e cultivados *in vitro* por 72 h.



Legenda: CF – Controle fresco; CC – Controle criopreservado; P20.T2.C – Embriões descongelados após exposição à 20,7 MPa durante 2 horas e posterior criopreservação; P20.T4.C – Embriões descongelados após exposição à 20,7 MPa durante 4 horas e posterior criopreservação; P27.T2.C – Embriões descongelados após exposição à 27,6 MPa durante 2 horas e posterior criopreservação; P34.T2.C – Embriões descongelados após exposição à 34,5 MPa durante 2 horas e posterior criopreservação. Letras diferentes nas colunas de cada grupo experimental são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$). Replicações: 4.

5 DISCUSSÃO

O experimento realizado testou o emprego da HGP com o objetivo de determinar a sobrevivência *in vitro* de embriões murinos frescos e criopreservados após a exposição ao estresse subletal. O diferencial da câmara de pressão é que seu emprego é simples, baseado em princípios de transferência de forças entre objetos, adaptando-se de forma fácil a qualquer realidade de utilização com criopreservação. Entretanto, por envolver gases com alta pressão, é imprescindível a verificação das normas de segurança no seu emprego, pois os riscos de acidentes são inerentes à sua utilização.

Nos últimos anos, diferentes experimentos demonstraram a eficiência da utilização da HHP para induzir estresse subletal em células embrionárias de maneira a modificar as taxas de sobrevivência após os procedimentos de criopreservação (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Para controlar a intensidade do estresse, de forma que ocorra de maneira esperada, muitos são os fatores envolvidos que devem ser levados em consideração, como por exemplo: a magnitude da pressão, o tempo de exposição, a temperatura durante a exposição, a espécie e o estágio de desenvolvimento embrionário (Bock *et al.*, 2010).

A primeira etapa do projeto incluiu a obtenção de camundongos para a produção de embriões por superovulação. O biotério central da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS/RS), com a limitação de espaço e orçamento para manter simultaneamente várias cepas de cobaias, descontinuou a linhagem *Mus musculus domesticus* CF1 suíço albina, visando dar espaço para a produção de cepas livres de patógenos específicos (SPF). Diante da ausência de fornecedores na região metropolitana de Porto Alegre, as opções mais próximas foram Santa Maria e Pelotas. Por questões de disponibilidade de fornecimento dentro do cronograma previsto, foram adquiridos 170 animais (150 fêmeas e 20 machos) do biotério da Universidade Federal de Pelotas. Após o período de quarentena e ambientação, iniciaram-se as rotinas de superovulação. Os resultados foram completamente opostos ao esperado, considerando o histórico de obtenção de embriões no laboratório. O percentual de fêmeas cobertas (placas positivas) foi menor do que o habitual (55% vs. 70-80%) e nas coletas não foram identificadas estruturas embrionárias. Durante a coleta, observou-se em diferentes fêmeas ovários com sinais de hemorragia e processos inflamatórios.

Diante da situação, procurou-se identificar as possíveis causas para a ineficiência do protocolo: foram revisadas as condições do biotério, adquiridos novos hormônios e revistos os protocolos. Os resultados continuaram negativos. Então se optou por observar a fertilidade de machos e fêmeas em condições fisiológicas. Uma vez que camundongos fêmeas possuem ciclo estral com duração entre 4 e 5 dias (NEVES; MANCINI-FILHO; MENEZES, 2013), foram colocadas fêmeas junto aos machos pelo período de 4 dias, sendo observada a presença de tampão vaginal no início de todas as manhãs. Embora a média de placas positivas continuasse em 60%, as fêmeas apresentaram em média 15 estruturas viáveis ao quarto dia de prenhez. Algumas prenhezes foram examinadas aos 15 dias, sendo as fêmeas eutanasiadas para a verificação da presença de fetos. Em média, foram identificados seis fetos por corno uterino, chegando-se a conclusão que os animais (tanto as fêmeas quanto os machos) tinham capacidade reprodutiva, entretanto as fêmeas não respondiam adequadamente ao protocolo de superovulação. Uma possível explicação para o fato poderia ser eventuais cruzamentos endogâmicos das matrizes, acarretando em colônias com um perfil genético não responsivo aos hormônios utilizados no protocolo de superovulação.

Após seis meses com o insucesso na utilização de praticamente todos os animais do lote adquirido inicialmente, foi necessário reiniciar a busca por novos fornecedores, na tentativa de reestabelecer o protocolo de obtenção de embriões. Nesta mesma época, o CREAL da UFRGS, que até então apenas produzia ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da cepa Wistar, anunciou o início do fornecimento de camundongos CF1 suíço albinos. Assim sendo, adquiriram-se 20 machos que foram mantidos durante o período dos experimentos. As fêmeas foram adquiridas em número de 20 fêmeas por semana. Os resultados obtidos na produção de embriões estão abaixo do esperado, com valores próximos aos padrões fisiológicos da espécie, entretanto, considerando que a linhagem é nova na Instituição e que não havia dados de eficiência na obtenção de embriões com a mesma, houve avanço significativo, pois, foi possível iniciar os experimentos com o número de blastocistos obtidos.

Outra situação que demandou estudos foi a capacidade máxima de pressão de cilindros convencionais em 3307 PSI (22 MPa). Para contornar o problema, foi adquirido um cilindro especial de argônio gasoso de alta pressão com capacidade para 6000 PSI (41,37 MPa). Após estudos de garantia de segurança na utilização da câmara sob estas condições, realizados por profissionais credenciados para tal função, iniciamos

as rotinas dos primeiros grupos experimentais. Em função da modificação do manômetro da câmara, a visualização da pressão exercida foi feita de maneira mais precisa utilizando a escala em PSI, de forma que os dois primeiros grupos experimentais (P20.T2 e P20.T4) tiveram a pressão estabelecida em 3000 PSI - equivalente à 20,7 MPa - ligeiramente maior em relação aos 15,7 MPa utilizados no trabalho de Collares (2014), entretanto, conservando os mesmos tempos de exposição. Os demais grupos (P27.T2 e P34.T2) tiveram o objetivo de aumentar a intensidade do estresse subletal.

Na primeira etapa experimental com HGP, quantificou-se o efeito exercido somente pela pressão na viabilidade *in vitro* através da comparação das taxas de eclosão dos blastocistos. Conforme exposto na Figura 2, não houve diferença estatística nas taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* entre os grupos experimentais quando comparados com seu respectivo controle, indicando que a HGP não exerce influência negativa na capacidade do blastocisto de levar adiante seu desenvolvimento embrionário. Anteriormente, Collares (2014) já havia realizado esta observação empregando embriões murinos no estágio de 8-células. Embora os blastocistos tenham sido submetidos a uma pressão equivalente a 3500 metros de profundidade do oceano (grupo P34.T2), não foram observadas alterações morfológicas, revelando a capacidade dos blastocistos em preservar a viabilidade após a exposição à HGP. Esta resistência já havia sido descrita por Pribenszky et al. (2005a) empregando HHP. Os pesquisadores relataram que exposições de blastocistos murinos a intensidades de HHP (90 MPa por 1 s ou 30 MPa por 120 min) não causaram alterações morfológicas e as taxas de eclosão dos embriões tratados foram iguais aos controles, resultado similar ao obtido nos nossos experimentos. Bock *et al.* (2010) e Siqueira Filho *et al.* (2011) também chegaram à mesma conclusão em seus experimentos, empregando HHP de 60 MPa por 60 min em blastocistos murinos e blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, comprovando que a exposição à alta pressão em uma intensidade considerada leve não causa efeito negativo na viabilidade embrionária *in vitro* e não altera a morfologia dos embriões.

Após a verificação da ausência de efeito das HGP sobre a capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* dos blastocistos murinos, iniciou-se a etapa de exposição à HGP, posterior criopreservação, descongelamento e cultivo *in vitro*. Ao examinarmos na Figura 3 o grupo P20.T4.C, percebe-se que, embora não tenha apresentado diferença significativa em relação ao controle congelado, há uma redução na taxa de eclosão. Este comportamento pode significar, após maiores estudos, que o

tempo de 4 horas de exposição dos blastocistos à HGP ultrapassa o limiar de estresse subletal que o embrião pode suportar sem que haja danos celulares, que diminuam a viabilidade embrionária, a exemplo do que foi relatado por FULDA *et al.* (2010).

Os grupos experimentais P20.T2.C e P27.T2.C não revelaram aumentar a taxa de sobrevivência dos blastocistos em relação aos respectivos controles congelados. Por outro lado, a taxa de sobrevivência dos blastocistos do grupo P34.T2.C foi superior à observada nos blastocistos do grupo controle (70,2% vs. 58,6%, $P < 0,05$). Estes dados são consoantes com os descritos por Pribenszky *et al.* (2005a). Entretanto, os dados do autor mostram que blastocistos criopreservados tratados com HHP tiveram taxas de eclosão semelhante aos controles frescos, porém, os controles vitrificados não expostos à HHP não eclodiram. A exemplo do que foi relatado por PRIBENSZKY *et al.* (2010), o resultado deste grupo experimental (P34.T2.C) demonstra que os embriões submetidos a um prévio estresse, de uma intensidade e período de tempo controlados, a fim de se atingir limites superiores dentro da zona de estresse subletal, apresentaram uma resposta adaptativa ao processo subsequente de criopreservação, constatada através do aumento da viabilidade embrionária *in vitro*.

As análises de expressão gênica das amostras, coletadas durante a realização dos experimentos, que visam a detecção de variações nos níveis de expressão de genes de resposta ao estresse subletal não foram executadas pois o tempo transcorrido entre o início do Curso e a aprovação do projeto junto ao CEUA/UFRGS, a ineficiência do primeiro lote de camundongos e o estabelecimento do Laboratório de Biologia Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde as amostras serão processadas, levaram a atrasos no cronograma original.

Entre os possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de resposta ao estresse subletal, estão a ativação das chaperonas moleculares HSP resultando na proteção das proteínas essenciais às células e inibição de processos apoptóticos (STINSHOFF *et al.*, 2009), e das CSP, que evitam que as células reduzam suas taxas de desenvolvimento quando sob efeito de um agente estressor (MASUDA *et al.*, 2012). Outros mecanismos importantes a citar são a permeabilidade de crioprotetores pelas aquaporinas (CAMARGO *et al.*, 2011), a proteção contra radicais reativos de oxigênio pelas enzimas antioxidantes (KIMURA *et al.* 2010), a inibição de fatores pró-apoptóticos (CZABOTAR *et al.*, 2014), o aumento da disponibilidade

energética através de maior aporte intracelular de glicose (VELKER *et al.*, 2012) e a ativação de proteínas e fatores de proliferação de ciclo celular (GREEN; DAY, 2013).

Jiang *et al.* (2016) demonstraram em um estudo com o perfil de expressão gênica com diferentes tratamentos de HHP (40 MPa, 60 MPa e 80 MPa, todos por 60 min), que 340 transcritos gênicos de um total de 399 são têm sua expressão alterada em função do estresse subletal pela HHP. Embora algumas destas alterações no padrão de expressão sejam comuns entre os três tratamentos (26 transcritos), a intensidade do estresse está relacionada com o padrão de expressão de determinados genes (136 genes em 40 MPa, 21 genes em 60 MPa, 39 genes em 80 MPa, 66 genes comuns em 40 MPa e 60 MPa, 15 genes comuns em 60 MPa e 80 MPa, e 37 genes comuns em 40 MPa e 80 MPa). O estudo ainda revelou que há diferenças nesta expressão em função do tempo de recuperação após o estresse subletal, sendo somente 9 genes comuns entre 0 h, 1 h e 2 h.

Estudos com o objetivo de quantificar a alteração da expressão dos genes envolvidos como os processos acima citados, responsáveis pelo controle de funções celulares, ainda necessitam ser conduzidos para elucidar quais os mecanismos que os embriões pré-implantação utilizam como estratégia de defesa diante do estresse subletal causado por HGP.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho revelou que a pressão de 20,7 MPa, por 2 h e 4 h, e a pressão de 34,5 MPa por 2h não alteram a morfologia e a taxa de eclosão de blastocistos murinos expostos ao estresse subletal por HGP e subsequente cultivo *in vitro*.

As HGP de 20,7 MPa por 2 h e 4 h e de 27,6 MPa por 2 h não modificaram a capacidade de reação dos blastocistos murinos à criopreservação, enquanto que a exposição destes embriões à HGP de 34,5 MPa por 2 h alterou a taxa de sobrevivência *in vitro*, mensurada através da taxa de eclosão, proporcionando maior resistência à criopreservação dos blastocistos murinos.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos com o grupo P34.T2.C, espera-se elevar a pressão à 6000 PSI (41,4 MPa), limite operacional deste sistema com cilindro especial, de forma a aumentar o estresse, ainda dentro da zona considerada subletal e, conseqüentemente, atingir níveis de sobrevivência próximos aos controles não submetidos à HGP. Com a análise da expressão gênica, espera-se também compreender e esclarecer quais os mecanismos que os embriões utilizam para protegerem-se do estresse subletal e que no estresse subsequente os permitem terem melhores taxas de sobrevivência *in vitro*. Pretende-se realizar transferências destes embriões para fêmeas receptoras de modo a avaliar a viabilidade e sobrevivência embrionária *in vivo*.

O Brasil é o maior produtor de embriões bovinos produzidos *in vitro*, respondendo por cerca de 70% do total, com 366.517 embriões produzidos em 2013 (IETS, 2014), sendo a pecuária responsável pela movimentação 6,9% do PIB brasileiro, em torno de 332 bilhões de reais. A maior parte destes embriões não é transferido a fresco em função de não haver um número suficiente de receptoras e, lamentavelmente, a criopreservação ainda não é uma solução economicamente viável em função da reduzida taxa de sobrevivência *in vivo* após descongelamento para os embriões não utilizados.

Embriões produzidos *in vitro* são menos resistentes à criopreservação do que os produzidos *in vivo*, o que tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (DODE; LEME; SPRÍCIGIO, 2013). Segundo os autores, essas diferenças devem-se a maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, massa celular interna geralmente menor com e menos células, e menor quantidade de células totais. Além disso, estes embriões possuem um grande acúmulo intracelular de lipídeos e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões *in vivo* (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004). Outro aspecto diferencial está relacionado ao aspecto molecular, uma vez que embriões produzidos *in vitro* diferem na expressão de genes importantes para o desenvolvimento (MUNDIM *et al.*, 2009).

Desta forma, o emprego da HGP como indutor de estresse subletal embrionário pode vir a ser uma alternativa para a utilização econômica da criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

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.

AHMED, K. *et al.* Chemical inducers of heat shock proteins derived from medicinal plants and cytoprotective genes response. **International Journal of Hyperthermia**, London, v. 28, n. 1, p. 1-8, Jan. 2012.

AL-FAGEEH, M. B.; SMALES, C. M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. **Biochemical Journal**, London, v. 397, p. 247-259, July 2006.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 388 p.

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, Mar. 1976.

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

BRASIL. **Lei** nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 08 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 out. 2008, seção 1, p. 01-02.

BRASIL. **Lei** nº 12.305, de 02 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 ago. 2010, seção 1, pág. 03-07.

CAMARGO, L. S. A. *et al.* Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, San Diego, v. 63, n. 3, p. 256-262, Dec. 2011.

COLACO, C. A. *et al.* Heat shock proteins: stimulators of innate and acquired immunity. **BioMed Research International**, Cairo, v. 2013, p. 1-11, 2013.

COLLARES, F. J. F. **Expressão gênica e taxas de desenvolvimento de embriões *Mus musculus domesticus* expostos à pressão gasosa no estágio de 8-células e submetidos à criopreservação no estágio de blastocisto**. 2014. 64 f. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). **RESOLUÇÃO** 174 de 20 de junho de 2002. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em

animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 jun. 2002, Seção 1, p. 201.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Resolução Normativa** CONCEA nº 12 de 20 de setembro de 2013a - ANEXO. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2013, seção 1, p. 52-59.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Resolução Normativa** CONCEA nº 13 de 20 de setembro de 2013b - ANEXO. Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 set. 2013, seção 1, p. 5-12.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Resolução Normativa** CONCEA nº 15 de 16 de dezembro de 2013c. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 dez. 2013, seção 1, p. 09-12.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 15, p. 49–63, Jan. 2014.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 144-150, abr./jun. 2013.

FARIN C. E.; FARIN P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. E53-E62, Feb. 2004.

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

GREEN, C. J.; DAY, M. L. Insulin-like growth factor 1 acts as an autocrine factor to improve early embryogenesis *in vitro*. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 57, n. 1, p. 837-844, Sept. 2013.

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

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

HUGHES, Z. E.; MANCERA, R. L. Molecular mechanism of the synergistic effects of vitrification solutions on the stability of phospholipid bilayers. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 106, n. 12, p. 2617–2624, June 2014.

IETS. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, n. 4, p. 14-26, Dec. 2014.

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

KASHIWAZAKI, N. *et al.* Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. **Veterinary Record**, London, v.128, n.16, p. 256-257, Mar. 1991.

KRAUSE, M.; RODRIGUES-KRAUSE, J. C. Extracellular heat shock proteins (eHSP70) in exercise: Possible targets outside the immune system and their role for neurodegenerative disorders treatment. **Medical Hypotheses**, London, v. 76, n. 2, p. 286-290, Feb. 2011.

KIMURA, N. *et al.* Intrinsic oxidative stress causes either 2-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 441–451, July 2010.

LAWITTS, J. A.; BIGGERS, J. D. Culture of preimplantation embryos. In: WASSARMAN, P. M.; DEPAMPHILIS, M. L. (editors). **Methods in Enzymology - Guide to Techniques in Mouse Development**, San Diego: Academic Press, 1993, v. 225, p. 153-164.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 631-677, Dec. 1988.

MASUDA, T. *et al.* Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 27, p. 10885–10890, July 2012

MAZUR, P. Equilibrium, Quasi-Equilibrium, and Nonequilibrium Freezing of Mammalian Embryos. **Cell Biophysics**, New York, v. 17, n. 1, p. 53-92, Aug. 1990.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL-JR., G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 78, n.1, p. 2–12, Jan. 2008.

MINOWADA, G.; WELCH, W. I. Clinical implications of the stress response. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v.95, p. 3-12, Jan, 1995.

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

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

NAHLEH, Z. *et al.* Heat shock proteins in cancer: targeting the ‘chaperones’. **Future Medicinal Chemistry**, Londres, v. 4, n. 7, p. 927-935, May 2012.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. 216 p.

PRIBENSZKY, C. *et al.* Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.52, n.4, p.479–487, Oct. 2004.

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

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

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

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

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 40, n. 2, p. 253–266, Oct. 2010.

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

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. **Certificação e identificação de embriões. In: International Embryo Transfer Society (IETS)**. USA, abril, 1998. Trad. OLIVEIRA FILHO, E. B. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Uberlândia: SBTE, 1999. Cap. 9, p. 109-122.

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

SCHMID, B. *et al.* Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1621-1627, Mar. 2009.

SILVA, A. R. *et al.* Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. **Research and Reports in Biodiversity Studies**, London. v. 2015, n. 4, p. 1–8, Mar. 2015.

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

STINSHOFF, H. *et al.* Effect of different cryopreservation methods on the quality of in vitro produced bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 22, n. 1, p. 217-217, Jan. 2009.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS). **Guia de severidade dos procedimentos científicos CEUA-UFRGS**. (2010). Disponível em: <http://www.ufrgs.br/ceua/docs-e-formularios/guia-de-severidade>. Acesso em 31 de jan. 2016.

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

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

VAJTA, G. *et al.* Embryo culture: can we perform better than nature? **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 453-469, Apr. 2010.

VELKER, B. A. M.; DENOMME, M. M.; MANN, M. R. W. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 143, May 2012.

VERGHESE, J. *et al.* Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 76, n. 2, p. 115-158, June 2012.

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

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

WHITTINGHAM, D. G. Culture of mouse ova. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 14, p. 7–21, June 1971.

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. *et al.* Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, San Diego, v. 11, p. 560, Dec. 1974.

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**, Amsterdam, v. 11, p. 1071-1079, Nov. 1972.

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A – FORMULAÇÃO MEIO mKSOM

Tabela 4. Formulação do meio mKSOM (50 mL).

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

Fonte: LAWITTS; BIGGERS, 1993.

Legenda: mg - miligrama; PM - Peso molecular; mM - Milimol, q.s.p = quantidade suficiente para.

Obs. Na hora do uso, filtrar para um frasco contende 0,4% de BSA.

ANEXO B – FORMULAÇÃO DO MEIO mPBS

Tabela 5. Formulação do meio mPBS (50 mL).

| Componentes | Massa (mg) | PM | mM |
|---|--------------|--------|--------|
| NaCl | 400,00 | 58,46 | 136,85 |
| KCl | 10,00 | 74,56 | 2,68 |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 6,60 | 147,02 | 0,90 |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 5,00 | 84,02 | 1,19 |
| Benzilpenicilina procaínica | 4,21 | - | - |
| Benzilpenicilina potássica | 1,40 | - | - |
| Estreptomicina base (sulfato) | 1,94 | - | - |
| Glicose | 54,95 | 180,0 | 6,10 |
| Piruvato de Sódio | 1,80 | 110,0 | 0,33 |
| Na ₂ HPO ₄ H ₂ O | 62,65 | 160,0 | 7,83 |
| NaH ₂ PO ₄ H ₂ O | 8,65 | 138,0 | 1,25 |
| KH ₂ PO ₄ | 7,80 | 136,0 | 1,15 |
| H ₂ O ultrapura | q.s.p. 50 mL | - | - |

Fonte: WHITTINGHAM, 1971.

Legenda: mg - miligrama; PM - Peso molecular; mM - Milimol, q.s.p = quantidade suficiente para.

Obs. Na hora do uso, filtrar para um frasco contende 0,4% de BSA.

ANEXO C – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA/UFRGS

| | | | |
|--|--|--|---|
|  | U F R G S UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL | PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais |  |
| CARTA DE APROVAÇÃO | | | |
| Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto: | | | |
| Número: 27397 | | | |
| Título: Viabilidade de blastocistos de <i>Mus musculus domesticus</i> expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação. | | | |
| Pesquisadores: | | | |
| Equipe UFRGS: | | | |
| JOSE LUIZ RIGO RODRIGUES - coordenador desde 01/10/2014 BRUNO SILVEIRA BECKER - Aluno de Mestrado desde 01/10/2014 LUIZA PETERS DE SOUZA - desde 01/10/2014 | | | |
| Equipe Externa: | | | |
| Marcelo Bertolini - pesquisador desde 01/10/2014 Luciana Bertolini - pesquisador desde 01/10/2014 | | | |
| <i>Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 29/09/2014 - Sala 330 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 279 animais, espécie <i>Mus musculus</i>, 25 machos + 254 fêmea, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.</i> | | | |
| Porto Alegre, Quinta-Feira, 9 de Outubro de 2014 | | | |
|  <hr style="width: 30%; margin: 0 auto;"/> | | | |
| STELA MARIS KUZE RATES Coordenador da comissão de ética | | | |

Figura 4. Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais/UFRGS