



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRESSÃO HIDROSTÁTICA: EFEITO NA VITRIFICAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

EMIVALDO DE SIQUEIRA FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA DF
MAIO/2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRESSÃO HIDROSTÁTICA: EFEITO NA VITRIFICAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

ALUNO: Emivaldo de Siqueira Filho

ORIENTADOR: Rodolfo Rumpf

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 015/2009

**BRASÍLIA DF
MAIO/2009**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRESSÃO HIDROSTÁTICA: EFEITO NA VITRIFICAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS**

EMIVALDO DE SIQUEIRA FILHO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

RODOLFO RUMPF, PhD (Embrapa)
E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br

JAIRO PEREIRA NEVES, PhD (FAV-UnB)
E-mail: jpneves@unb.br

SÔNIA NAIR BÁO, Doutorado (UFRJ)
E-mail: snbao@pq.cnpq.br

BRASÍLIA/DF, 29 de MAIO de 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

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

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

1. Pressão hidrostática 2. Vitrificação. 3. Embriões produzidos *in vitro*

CDD ou CDU
Agris / FAO

**A Deus,
À minha família, meus pais Emivaldo e Fátima
e minha irmã Sandra,
sempre presentes, mesmo na distância.....
Amo vocês!**

AGRADECIMENTOS

Sempre é bom agradecer a Deus por tudo que passou e ver como Ele sempre coloca sua mão em cada detalhe da nossa vida.

Aos meus pais e irmã, pois mesmo indo pra qualquer lugar, Cuiabá, Brasília, Colômbia, Uberaba, sei que tenho um local seguro, com pessoas em que posso confiar.

À Tia Prel, ao Nilson e meus primos em Brasília, Thaiana, Suiara e Franklin, que sempre me ajudaram desde a época da faculdade, onde me receberam em sua casa e me trataram como filho e irmão.

À minha vó, Sebastiana, com carinho e respeito sempre.

Aos meus familiares, que mesmo distantes, sempre torceram por mim.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf, agradeço pela orientação e confiança, por acreditar no trabalho proposto e fazer todo o possível para que ele se concretizasse.

À Dra Margot, por sempre estar de portas abertas pra discutir ciência, por cobrar e sempre buscar o melhor de nós, estudantes. Tenho uma grande admiração pela senhora.

Aos amigos húngaros, Csaba e Miklos, fundamentais na realização deste trabalho, companheiros por 2 meses no desafio de fazer o experimento de mestrado.

Aos pesquisadores da Embrapa, pela presença, dedicação, abertura e conhecimento. Vocês colaboraram muito na formação profissional e pessoal, vão fazer muita falta.....Maurício, Roberto e Eduardo.

Ao Dr. Maurício Machaim, pela enorme orientação na parte de Biomol, sugerindo, criticando e analisando, sendo fundamental na realização desta etapa do trabalho. E claro a Esterzinha, que assumiu o trabalho como se fosse seu, realizando como sempre faz, com dedicação e afinco.

À Dra. Sônia Bão e Carolina Lucci, por abrir as portas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e pela disposição nas avaliações dos resultados. E a Renatinha, pelo empenho, dedicação e excelente trabalho realizado na parte prática e pelas avaliações críticas na parte escrita. Obrigado, principalmente, pela enorme paciência nas minhas “sumidas”.

Ao Urias e a Dona Zefa, que sempre estiveram dispostos a ajudar e colaborar no que fosse necessário dentro do laboratório, pelas longas e intermináveis conversas com o amigo Urias e pelo carinho da Dona Zefa.

Ao grande Rambinho, que sempre chegava as 5 da manhã buzinando no alojamento pra pegar algum estagiário... mas sempre trazia ovários, que foi a matéria prima pra tudo o que saiu nessa dissertação...Valeu Rambinho.

Em dois anos de mestrado muitas pessoas desconhecidas se tornaram vizinhos de alojamento, com a convivência diária, alguns se tornaram grandes amigos e companheiros. Essa Sucupira vai fazer muita falta, principalmente, pelas pessoas especiais como: Aline (Baxinha), Michele, Monique, Marquinhos, Ana Cláudia (Anexo), Vinicius, Leandro, Thiago (Bil), Zé, Tiago, Rosiara, Maria Clara, Junior, Andrei, Heitor, Nádia, Lígia, Toca, Teco, Dona Lia, Tonha.

Aos amigos de mestrado, que sempre me acolheram quando estava no Cenargem: Grazieli, Ligiane, Marcelo, Tatiane, Alice, Fernanda, Valquíria.

Aos funcionários e amigos da Fazenda Sucupira, que fizeram da vida na fazenda um prazer ainda maior.

A todos os estagiários, pela colaboração e companherismo.

À empresa Nutricell pelo apoio para realização deste trabalho.

À UnB pela oportunidade concedida para a realização deste mestrado.

À Embrapa – Cenargen, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

ÍNDICE

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral	3
1.2 Objetivos Específicos	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Criopreservação de Embriões	4
2.1.1 Princípios da criopreservação	4
2.1.2 Crioprotetores	7
2.1.3 Métodos de criopreservação	10
2.1.3.1 Congelamento clássico ou lento	10
2.1.3.2 Congelamento rápido e ultra-rápido	11
2.1.3.3 Vitrificação	12
2.2 Pressão Hidrostática	15
2.2.1 Aspectos biológicos da pressão hidrostática	16
2.2.2 Uso da pressão hidrostática em técnicas de reprodução assistida	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA VITRIFICAÇÃO E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES BOVINOS	37
1 RESUMO	37
2 ABSTRACT	38
3 INTRODUÇÃO	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Produção <i>In vitro</i> de Embriões	41
4.1.1 Coleta e seleção dos ovócitos	41

4.1.2	Maturação <i>in vitro</i>	41
4.1.3	Fecundação <i>in vitro</i>	42
4.1.4	Cultivo <i>in vitro</i>	42
4.2	Pressão Hidrostática	43
4.3	Vitrificação	43
4.4	Desvitrificação	44
4.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão	44
4.6	Delineamento Experimental	45
4.6.1	Experimento 1 – Efeito da pressão hidrostática em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> .	45
4.6.2	Experimento 2 – Efeito de diferentes níveis e tempos de pressão hidrostática antes da vitrificação de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> .	45
4.6.3	Experimento 3 – Avaliação ultraestrutural de embriões bovinos submetidos a pressão hidrostática antes da vitrificação.	46
4.7	Análise Estatística	47
5	RESULTADOS	47
5.1	Experimento 1	47
5.2	Experimento 2	51
5.3	Experimento 3	54
5.3.1	Embriões produzidos <i>in vitro</i> – Controle	54
5.3.2	Embriões submetidos a pressão hidrostática	57
5.3.3	Embriões vitrificados	59
5.3.4	Embriões submetidos a pressão hidrostática e vitrificados	61
6	DISCUSSÃO	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
CAPÍTULO 3 – MELHOR MOMENTO PARA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRÉ-TRATADOS COM PRESSÃO HIDROSTÁTICA: AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i> E DE EXPRESSÃO GÊNICA		74
1	RESUMO	74
2	ABSTRACT	76
3	INTRODUÇÃO	78
4	MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1	Produção <i>In vitro</i> de Embriões	79
4.1.1	Coleta e seleção dos ovócitos	80

4.1.2	Maturação, Fecundação e Cultivo <i>in vitro</i>	80
4.2	Pressão Hidrostática	81
4.3	Vitrificação	81
4.4	Desvitrificação	82
4.5	Avaliação da Expressão Gênica	82
4.6	Delineamento Experimental	85
4.6.1	Experimento 1 –Embriões submetidos a pressão hidrostática e vitrificados após diferentes tempos	85
4.6.2	Experimento 2 – Avaliação da expressão gênica de embriões bovinos submetidos a pressão hidrostática	86
4.7	Análise Estatística	86
5	RESULTADOS	86
6	DISCUSSÃO	91
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	98

RESUMO

PRESSÃO HIDROSTÁTICA: EFEITO NA VITRIFICAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS

Apesar do enorme crescimento obtido pela técnica de produção *in vitro* de embriões nos últimos anos, uma limitação continua evidente, os embriões são mais susceptíveis à criopreservação que embriões produzidos *in vivo*. Pesquisadores buscam melhorar a qualidade do embrião produzido *in vitro* ou alterar os sistemas de criopreservação visando obter melhores resultados no procedimento de criopreservação. O presente trabalho teve como objetivo definir os melhores parâmetros para o uso da pressão hidrostática como nova ferramenta no processo de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* e avaliar ultraestruturalmente e pela análise de expressão gênica os efeitos causados pela pressão hidrostática e pelo procedimento de criopreservação nestes embriões. Os resultados indicaram que a pressurização de embriões a partir de 80 MPa passou a ser deletéria para o desenvolvimento embrionário. Mas o uso da pressão no nível de 60 MPa por 1 hora promoveu um incremento na taxa de eclosão dos embriões após a vitrificação comparado ao grupo apenas vitrificado (79% vs 66%). E que 1 hora após a pressurização seria o melhor momento para a vitrificação, com melhores taxas de re-expansão, eclosão (90% e 74%, respectivamente), maior velocidade de re-expansão após vitrificação/desvitrificação e maior abundância de transcritos do gene ERG 25 nesse momento comparados com grupo controle, imediatamente e 2 horas após a pressão. Ultraestruturalmente embriões submetidos a pressão apresentavam maior quantidade de microvilosidades e aumento de mitocôndrias tipo *hooded* que os embriões controle. No grupo de embriões vitrificados após a pressão

observou-se uma maior quantidade de núcleos por área de MCI quando comparados ao grupo apenas vitrificado. Determinados níveis de tratamento com pressão hidrostática melhoraram a sobrevivência *in vitro* de embriões bovinos vitrificados. Células embrionárias reagem em resposta ao estresse, aumentando a expressão de genes específicos, como o ERG 25 e alterando sua ultraestrutura, o que pode promover uma maior resistência a outros processos estressantes, como a vitrificação.

Palavras chave: pressão hidrostática, vitrificação, ultraestrutura, expressão gênica.

ABSTRACT

HYDROSTATIC PRESSURE: EFFECT ON VITRIFICATION, ULTRASTRUCTURE AND GENE EXPRESSION IN BOVINE EMBRYOS

Despite the enormous growth achieved by the technique of bovine embryo *in vitro* production in recent years, a limitation is still evident, these embryos are more susceptible to cryopreservation than their counterparts *in vivo* produced. To obtain better results in the cryopreservation procedure, researchers are seeking improve embryos *in vitro* produced quality or change cryopreservation systems. The aim of this work was to define parameters for the use of hydrostatic pressure as a new tool in the process of vitrification of bovine embryos produced *in vitro* by evaluating the effects of it on ultrastructurally and gene expression on these embryos. The results indicated that embryo pressurization at 80 MPa had become deleterious to embryonic development. But pressure level at 60 MPa for 1 hour improved hatching rate after embryo vitrification compared to only vitrified group (79% vs 66%). And 1 hour after pressurization would be the best time to vitrification, with higher rates of re-expansion, hatching (90% and 74% respectively), increased speed of re-expansion after vitrification/devitrification and higher abundance of ERG 25 transcripts at this time, compared with the control group, immediately and 2 hours after the pressure. Ultrastructurally, embryos submitted to pressure had greater amount of microvilli and increased mitochondria *hooded* that control embryos. In the group of vitrified embryos after pressure there were a greater number of nuclei per area when compared to the only vitrified group. Certain levels of hydrostatic pressure treatment improved the *in vitro* survival vitrified bovine embryos. Embryonic cells react in response to stress,

increasing the expression of specific genes, such as ERG 25, and changing ultrastructure, which may promote increased resistance to other stressful procedures, such as vitrification.

Key words: hydrostatic pressure, vitrification, ultrastructure, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
 Capítulo 1	
1.1 – Relação de tempo-temperatura para congelamento de água pura e solução de açúcar (adaptado Franks, 1982).	5
 Capítulo 2	
2.1 – Embriões submetidos a 60 MPa por 1 hora, mostrando a compactação da blastocele.	50
2.2 – Taxa de compactação da blastocele dos embriões após serem submetidos a pressão hidrostática (diferenças do grupo controle: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)	50
2.3 – Taxas de re-expansão e eclosão de embriões dos grupos 40 MPa 30 min, 40 MPa 60 min e 60 MPa 30 min, comparando embriões que sofreram compactação (linha vermelha), com aqueles que não sofreram (linha azul).	54
2.4 – Blastocisto controle. (a) Micrografia eletrônica mostrando a massa celular interna do embrião, com células cubóides, núcleo (N) seguindo a mesma forma. Presença de grande quantidade de gotas lipídicas (GL), observa-se espaços entre as células (asteriscos), mas com prolongamentos celulares (setas) e comunicação com células vizinhas. (b) Célula do trofoblasto com núcleo alongado (N) e mitocôndrias distribuídas pelo citoplasma. (c) Presença de diferentes junções celulares, como junções de adesão (JA) e desmossomos (Des), e microvilosidades (Mv) no pólo apical da célula. (d) Mitocôndria madura com várias cristas atravessando sua matriz (M). (e) Presença de retículo endoplasmático rugoso (RER). (ZP zona pelúcida).	55

2.5 – Blastocisto submetido a pressão hidrostática. (a) Espaço perivitelínico maior (EPv) com presença de debris celulares (setas) e grande quantidade de microvilosidades (Mv). (b) Junções entre duas células do trofoblasto (asterisco). (c) Presença de grande quantidade de mitocôndrias hooded (MH) e gotas lipídicas em associação com retículo endoplasmática (GL). (d) Detalhe de uma mitocôndria hooded. (e) Observação de corpos apoptóticos (setas) nos embriões submetidos a pressão. (MV) microvilosidades. 58

2.6 – Blastocisto vitrificado. (a) Corte semifino do embrião após 4 horas de desvitrificação. (b) Micrografia eletrônica mostrando os vários danos causados ao embrião após a vitrificação, rompimento de célula e liberação de conteúdo citoplasmático na blastocele (setas), corpos de inclusão (asteriscos). (c) Espaço perivitelínico bem evidente (EPV), com grande quantidade de debris. (d) Célula com citoplasma granular e presença de vesícula de degradação (VD). (e) Presença de junções (setas) entre células adjacentes. (MCI) massa celular interna, (N) núcleo, (MI) mitocôndria intumescida. 60

2.7 – Blastocisto submetido a pressão e vitrificado. (a) Micrografia eletrônica do embrião mostrando o efeito deletério da vitrificação, com presença de vesículas de degradação (VD), conteúdo citoplasmático na blastocele (setas) e blastômero extruso (BE). (b) Embrião apresentando retorno na sua forma, com junções de adesão entre células adjacentes (seta) e desmosomos (DES), além da presença de mitocôndrias normais (MN). (c) Embrião com grande quantidade de núcleos intactos (N) após a vitrificação. (MI) mitocôndria intumescida. 62

Capítulo 3

3.1 – Nível de transcritos de MnSOD, GPX4, HSP 70 e ERG 25 em embriões bovinos PIV submetidos a pressão hidrostática de 60 MPa por 1 hora e 89

avaliados imediatamente, com 1 hora e 2 horas após a pressão. Como grupo controle foram usados embriões que estavam em cultivo *in vitro*. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene Actina.

a-bDiferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

3.2 – Quantidade relativa de transcritos (Média \pm EPM) de todos os genes avaliados (MnSOD, GPX4, HSP 70 e ERG 25) dentro de cada tratamento (controle, pressão imediatamente, pressão + 1 hora e pressão + 2 horas) 90

a-bDiferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

3.3 – Eletroforese em gel de agarose, representando a não amplificação do gene CIRP-b nos grupos controle e tratados com pressão e a alta expressão no controle positivo (C+). 90

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 1	
1.1 – Comparativo entre congelamento clássico e a vitrificação nas injúrias causadas no sistema de criopreservação.	14
Capítulo 2	
2.1 – Avaliação do efeito da tolerância de embriões bovinos a pressão hidrostática.	48
2.2 – Avaliação da tolerância de embriões nos estágios Bl e Bx nos diferentes níveis de pressão hidrostática.	49
2.3 – Taxa de re-expansão e eclosão de embriões submetidos a diferentes níveis e pressão hidrostática e tempo, e vitrificados.	51
2.4 - Avaliação da taxa de eclosão (%) dos embriões vitrificados imediatamente após serem submetidos a pressão hidrostática. Os resultados foram agrupados nos tratamentos 40 e 60 MPa, 30 minutos e 1 hora, e 80 MPa, 30 minutos e 1 hora.	52
2.5 – Avaliação da criotolerância de embriões nos estágios Bl e Bx nos diferentes níveis de pressão hidrostática e tempo.	53
Capítulo 3	
3.1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados.	83

3.2 - Alterações utilizadas na PCR de cada gene.	84
3.3 - Taxa de re-expansão e eclosão de embriões vitrificados após diferentes momentos de recuperação pós pressão hidrostática (PH imed – vitrificados imediatamente após a pressão; PH 1 hora - vitrificados após 1 hora e PH 2 horas – vitrificados após 2 horas).	87

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** = Análise de Variância
AWN = Espermaesina
Bl = Blastocisto
BSA = Albumina Sérica Bovina
Bx = Blastocisto Expandido
CAP = Meio de Lavagem de Sêmen
CCO = Complexo Cumulus Oócito
CIRP-b = *Cold Inducible RNA – binding Protein*
CSP = *Cold Shock Protein*
DMSO = Dimetilsulfóxido
DNA = Ácido Desoxirribonucléico
EG = Etilenoglicol
ERG 25 = Metil Esterol Oxidase
FSH = Hormônio Folículo Estimulante
GLY = Glicerol
GMP = *Glass Micropipette*
GPH = Glutaciona
GPX4 = Glutaciona Peroxidase
HSP = *Heat Shock Protein*
IETS = Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LH = Hormônio Luteinizante
M = Molar
MCI = Massa Celular Interna
MnSOD = Magnésio Superóxido Dismutase
MPa = Megapascal
N₂ = Nitrogênio Líquido
OLE 1 = Esterol coA Desaturase
OPS = *Open Pulled Straw*
pb = Pares de Base
PBS = Solução Salina em Tampão Fosfato
PEG = Polietilenoglicol

PHE = Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina

PI = Pós-inseminação

PG = Propilenoglicol

PH = Pressão Hidrostática

PIV = Produção *in vitro*

PVP = Polivinilpirrolidona

RNA = Ácido Ribonucléico

RNA_m = Ácido Ribonucléico Mensageiro

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

RT = Transcrição Reversa

RT-PCR = Reação de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase

SBTE = Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões

SFB = Soro Fetal Bovino

SOF = Fluido Sintético do Oviduto

SSV = Superfície Sólida de Vitrificação

SV = Solução de Vitrificação

TCM = Meio de Cultivo de Tecido

TE = Transferência de Embriões

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O primeiro nascimento bovino resultante da fecundação *in vitro* ocorreu em 9 de junho de 1981 nos EUA (Brackett et al., 1982). Desde então, considerável avanço foi alcançado nas técnicas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, permitindo a produção de embriões em condições artificiais (PIV).

No final da década de 90 iniciou-se o uso comercial desta técnica, mas só a partir do ano de 2000 observou-se um contínuo e expressivo aumento na produção *in vitro* de embriões. Na última divulgação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, embriões PIV representavam cerca de 30% do total de embriões produzidos no mundo (Thibier, 2007).

O Brasil apresenta uma característica peculiar nessa estatística, pois produz quase 70% do total de embriões PIV no mundo. Essa evolução começou em 2000, com aumento gradual de embriões produzidos por essa técnica, e já em 2005, ocorreu uma inversão entre embriões produzidos pela técnica clássica de TE e pela PIV e essa diferença aumentou significativamente nos anos subsequentes. Em 2006 foram transferidos 2700.000 embriões bovinos no Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), sendo que deste total 70.000 foram produzidos pela técnica clássica de Transferência de Embriões (TE) e 200.000 pela técnica de Produção *in Vitro* (PIV) (Viana & Camargo, 2007). Esta informação reflete o enorme crescimento que obteve a técnica de PIV nos últimos anos.

Uma limitação, contudo, continua evidente no sistema de PIV, os embriões são mais susceptíveis à criopreservação que embriões produzidos *in vivo* (Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2003). A criopreservação é uma ferramenta que permite o armazenamento de material biológico por tempo indeterminado sem que este perca sua atividade funcional, permitindo, portanto, a conservação de germoplasma animal.

Desde o primeiro relato de congelamento de embrião de camundongo por Whittinghan *et al.* (1972) e de bovino por Wilmut *et al.* (1973) inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos visando melhorar os métodos e resultados da criopreservação.

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo* permite a obtenção de resultados de taxa de prenhez próximas às obtidas com embriões transferidos a fresco, principalmente utilizando o método clássico de congelamento (Hasler, 2003). Contudo, quando se trabalha com embriões produzidos *in vitro* (PIV) os resultados são insatisfatórios (Agca et al., 1998; Tominaga, 2004, Seidel, 2006).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características diferentes daqueles produzidos *in vivo*: maior quantidade de lipídeos, menor grau de compactação (Van Soom *et al.*, 1992), disco embrionário geralmente menor (Iawasaki *et al.*, 1990), junções incompletas entre células do trofoblasto e botão embrionário (Shamsuddin *et al.*, 1992), entre outras. Estas diferenças podem explicar, em parte, a maior sensibilidade dos embriões produzidos *in vitro* ao processo de criopreservação.

Trabalha-se em duas vertentes para solucionar esse problema, uma voltada na melhoria da qualidade do embrião, passando por: a) modificações nas condições de cultivo para melhor mimetizar o microambiente encontrado *in vivo*, com adição de fatores de crescimento, hormônios, anti-oxidantes e outras moléculas regulatórias (Nedambale et al., 2006, Block et al., 2009); b) uso de meios definidos, sem a presença de soro fetal bovino (SFB) (Nedambale *et al.*, 2004, Gómez et al., 2008), sendo substituído por álcool polivinílico ou ácido hialurônico (Stojkovic *et al.*, 2002); ou c) substituindo o SFB por albumina sérica bovina (BSA) (Rizos *et al.*, 2002). Nos trabalhos em que se realiza a substituição do SFB observa-se uma melhor qualidade nos embriões produzidos, contudo com uma menor taxa de produção de embriões.

Outra vertente seria a modificação do sistema de criopreservação. A vitrificação tem sido descrita como método de eleição para a criopreservação de embriões PIV, essa técnica usa altas concentrações de crioprotetores e altas taxas de resfriamento. Vários protocolos de vitrificação foram desenvolvidos: grades de cobre de microscopia eletrônica (Martino *et al.*, 1996a), técnica de open pulled straw – OPS (Vajta *et al.*, 1998), cryoloop (Lane *et al.*, 1999a), microgotas (Papis *et al.*, 2000), superfície sólida – SSV (Dinnyes *et al.*, 2000), grades de nylon (Matsumoto *et al.*, 2001), sistema hemi-straw (Vanderzwalmen *et al.*, 2003), entre outros. Apesar de resultados satisfatórios de taxa de sobrevivência desses embriões avaliados *in vitro*, o uso comercial tem mostrado resultados inconstantes, sendo na maioria dos casos, baixas taxas de prenhez.

Pribenszky *et al.* (2005a) relataram uma melhora na taxa de sobrevivência de embriões murinos submetidos a pressão hidrostática antes de serem vitrificados. O estresse subletal causado pela pressão hidrostática ativaria a transcrição de genes que

produziriam proteínas capazes de proteger as células da crioinjúria (Wouters *et al.*, 1999). Essa técnica tem sido empregada em diferentes biotécnicas reprodutivas (Pribenszky *et al.*, 2005b; Kuo *et al.* 2007; Du *et al.*, 2008a,b) e pode surgir como nova ferramenta no procedimento de criopreservação de embriões PIV com melhoras nos resultados.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso da pressão hidrostática antes do processo de vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a taxa de sobrevivência de embriões submetidos a diferentes níveis e tempos de pressão hidrostática, para determinar o melhor parâmetro (nível de pressão e tempo) para uso da pressão hidrostática antes do processo de vitrificação.
- 2- Caracterizar o efeito da pressão hidrostática na ultra-estrutura de embriões bovinos produzidos *in vitro*.
- 3- Determinar o melhor momento para vitrificação de embriões submetidos a pressão hidrostática, imediatamente, 1 hora ou 2 horas após serem submetidos a pressão.
- 4- Quantificar a expressão dos genes Glutathione Peroxidase (GPX), Magnésio Superóxido Dismutase (Mn-SOD), Metil Esterol Oxidase (Erg 25), Heat shock protein 70 (HSP 70) e Cold inducible RNA- binding protein (Cirp-B) imediatamente, 1 hora e 2 horas após os embriões serem submetidos a pressão hidrostática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação de Embriões

A descoberta de Polge, Smith e Parkes (1949) que o glicerol proporciona proteção à célula espermática no processo de congelamento e descongelamento, iniciou um novo campo de estudos, a criobiologia, permitindo a conservação do material genético por período indeterminado e com possibilidade de comercialização de forma prática e segura.

Já a criopreservação de embriões começou a se tornar uma realidade a partir da década de 60, pelo trabalho e dedicação de três pesquisadores, Stanley Leibo, Peter Mazur e David Whittingham. Eles conseguiram preservar ovos fertilizados de camundongo em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, que depois de descongelados mantiveram sua viabilidade. Essa técnica pioneira foi primeiramente publicada na revista Science de Outubro de 1972. No mesmo ano, Wilmut relatou sucesso nos seus resultados.

Wilmut e Rowson obtiveram nascimento de um bezerro após transferência de embrião previamente congelado em 1973. A partir daí, a criobiologia se desenvolveu paralelamente ao avanço das pesquisas relacionadas à produção de embriões, transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIV), sofrendo modificações graduais para ser usada como rotina (Mezzalira & Vieira, 2006). Alguns protocolos permitem que embriões produzidos *in vivo* sejam criopreservados, descongelados e transferidos para receptoras com taxas de prenhez próximas às obtidas com embriões transferidos a fresco (Hasler, 2003). Contudo, a criopreservação de embriões PIV ainda apresenta baixas taxas de prenhez após a transferência (Agca et al., 1998; Tominaga, 2004).

2.1.1 Princípios da criopreservação

No processo de congelamento são observadas três fases distintas: uma fase líquida, uma fase de transição e uma fase sólida. A fase líquida é a de menor

importância nos processos convencionais, pois poucas células são afetadas neste período. As fases de transição e a sólida de congelamento são críticas, já que os principais eventos são desencadeados entre estas fases, quando a água é retirada sob forma de gelo e ocorre concentração dos solutos (Mazur, 1980).

A figura 1.1 mostra o comportamento de tempo e temperatura no processo de criopreservação de água pura e solução aquosa (solução de açúcar). O primeiro evento térmico observado no diagrama é o fenômeno chamado de subresfriamento (A a B ou B'), que refere-se a situação onde o líquido pode ser resfriado, temporariamente, abaixo do ponto de congelamento sem que ocorra a formação de gelo. Este evento acontece quando o calor é removido de um líquido tão rápido que as moléculas, literalmente, não tem tempo de assumir sua estrutura sólida.

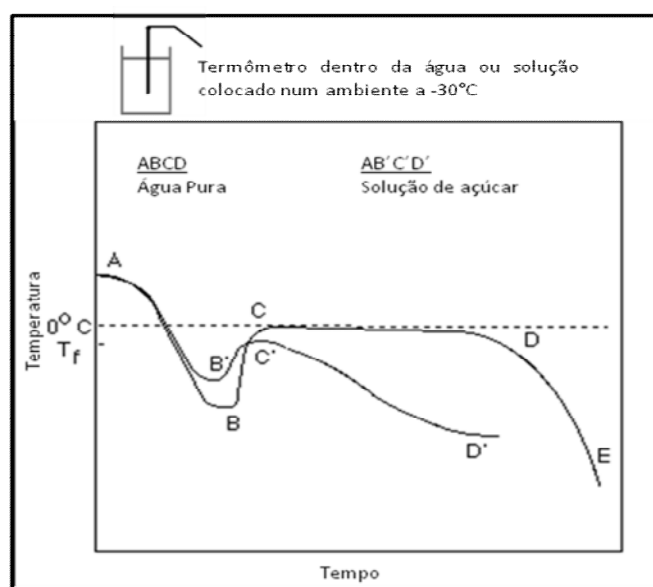


Figura 1.1 – Relação de tempo-temperatura para congelamento de água pura e solução de açúcar (adaptado Franks, 1982).

Para ocorrer o congelamento nas condições de subresfriamento é necessário que se forme um grupo pequeno e compacto de moléculas (chamado de “seed” ou nucleação), que tem uma estrutura transiente similar ao gelo. No subresfriamento, tais agrupamentos formam e dissolvem rapidamente, este é um estado de não-equilíbrio. Contudo, se um aglomerado é maior que o tamanho crítico, ele torna-se energeticamente

favorável para que outras moléculas se unam à estrutura crescendo através da amostra, levando à cristalização ou congelamento.

A partir do ponto B ou B' inicia-se a formação do "seed", ocorre liberação do calor latente de fusão e a temperatura aumenta instantaneamente, até a temperatura inicial de congelamento, ponto C ou C'. A solução de açúcar apresenta diminuição do subresfriamento quando comparado com água pura por dois motivos: início da formação de "seed" mais rápido e ponto de congelamento mais baixo.

Para evitar um excessivo subresfriamento no processo de criopreservação a cristalização é induzida no meio extracelular, pois quando ocorre a liberação do calor latente de fusão, a brusca variação de temperatura seria letal ao embrião. A indução da cristalização no meio extracelular é realizada com o auxílio de uma pinça, previamente mergulhada em nitrogênio líquido, que é colocada em contato com a palheta, este processo é denominado de "seeding".

Na água pura, a linha de C a D reflete o tempo em que está ocorrendo o crescimento de cristais, e só iniciará o resfriamento quando toda a água congelável tenha sido cristalizada. Durante a criopreservação da solução de açúcar, ocorre o congelamento da água fora da solução, na forma de cristais de gelo puro. A solução restante fica com alta concentração de soluto. Este evento leva a uma queda da temperatura de congelamento desta solução, por isso em temperaturas bem abaixo do ponto de congelamento, ainda permanece água na forma líquida.

No processo de criopreservação de uma célula, o maior volume da solução extracelular congela primeiro que a solução intracelular, quando isto ocorre os solutos extracelulares são concentrados em uma pequena quantidade de água não congelada, pela maior concentração de soluto na solução extracelular a água sai do interior da célula por osmose, causando a desidratação da célula, diminuindo a ocorrência de formação de cristais de gelo no interior da célula.

De acordo com Mazur (1980), a formação de gelo intracelular e o efeito de solução, são os principais danos causados à célula no congelamento e descongelamento.

Se a velocidade de congelamento é mais rápida que a ótima, a célula não tem tempo suficiente para desidratar, conseqüentemente a água irá congelar no interior da célula. Os cristais de gelo formado ocupam de forma irregular os compartimentos intracelulares, podendo afetar a microestrutura de membranas e organelas, comprometendo a função celular (Fahy et al., 1987), dependendo da quantidade e forma dos cristais de gelo intracelulares podem ser irreversíveis (Mazur, 1980). Se a

velocidade de congelamento é mais lenta que a ótima, leva a uma severa desidratação e o chamado “efeito de solução” será o causador da redução da sobrevivência.

O “efeito de solução” é causado nas células pelo aumento da concentração de solutos intracelulares durante a desidratação. Altas concentrações de eletrólitos afetam interações iônicas, incluindo aquelas que ajudam a estabilizar o estado nativo das enzimas. Desdobramento e desnaturação de enzimas são frequentemente irreversíveis.

A correlação entre taxa de congelamento e injúria celular segue as seguintes regras:

- danos causados pelo efeito de solução é minimizado durante rápido congelamento, mas permite a formação de cristais de gelo;

- congelamento lento aumenta os danos pelo efeito da solução por causa do amplo tempo que a célula tem para desidratar.

Baseado nessas informações, a taxa de resfriamento deve ser rápida o suficiente para minimizar o “efeito de solução” e ao mesmo tempo devagar o suficiente para prevenir a formação de cristais de gelo.

Além destes, outros fatores podem causar danos a célula no processo de criopreservação, como: toxicidade do crioprotetor; injúria pelo resfriamento e danos de fratura.

2.1.2 Crioprotetores

Segundo Dobrinsky (1996), crioprotetores são solutos orgânicos adicionados ao meio com o intuito de proteger os embriões dos efeitos deletérios da formação de cristais de gelo intra e extracelular durante o processo de congelamento e descongelamento. Uma das principais funções dos crioprotetores é justamente substituir e/ou remover a água intracelular.

Agentes crioprotetores reduzem os danos causados pelo congelamento, mas são tóxicos para as células, essa toxicidade refere-se ao estresse osmótico e toxicidade química (Leibo, 1981). Características necessárias para um bom crioprotetor são alta solubilidade, baixa toxicidade e baixo peso molecular, para facilitar a permeabilidade na membrana (Hafez, 1993).

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua habilidade de difusão através da membrana celular, denominados de crioprotetores permeáveis e não permeáveis (Hafez, 1993).

Crioprotetores permeáveis são moléculas de baixo peso molecular que facilmente penetram nas membranas celulares. Após adicionado ao meio, o crioprotetor diminui o ponto de fusão e aumenta a viscosidade da solução, reduzindo a difusão pela solução. Estas características permitem ao embrião ser resfriado suficientemente devagar para que ocorra maior grau de desidratação, o que previne a formação de cristais de gelo intracelulares (Schneider e Mazur, 1984).

Os crioprotetores permeáveis mais utilizados são glicerol (GLY), dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PG) e etilenoglicol (EG). O primeiro crioprotetor usado foi o glicerol, em 1949. Cada um desses crioprotetores apresentam diferentes características, como maior ou menor permeabilidade e toxicidade, isto determina sua eficiência e seu uso de forma prática (Hafez, 1993).

Quando o embrião é exposto ao glicerol, inicialmente, ele contrai pela saída de água, isto ocorre pela solução hiperosmótica extracelular e pela membrana celular ser muito mais permeável à água do que ao crioprotetor. A contração continua até que efluxo de água seja balanceado pelo influxo de crioprotetor, forçando um aumento gradual no volume (Wolfe e Bryant, 2001).

A remoção do crioprotetor no pós-descongelamento é uma etapa igualmente importante na sobrevivência do embrião. Se o embrião for colocado diretamente no meio de cultivo ocorre um influxo de água excessivo podendo romper a célula, já que a entrada de água ocorre mais rápido que a saída do crioprotetor. Duas alternativas foram, inicialmente, sugeridas para promover a rehidratação, a primeira seria a passagem dos embriões por concentrações decrescentes de glicerol até a solução de manutenção do embrião (Bilton e Moore, 1979; Pettit, 1985; Wright, 1985). Já Leibo (1982) postulou uma segunda forma, que incluiria uma solução de 0,25 M de sucrose na palheta, esta concentração no meio de rehidratação previniria a rápida entrada de água para a célula e o crioprotetor deixaria o interior da célula por difusão passiva. A partir destes, várias outros métodos foram propostos para retirada do crioprotetor sem causar danos à célula (Fahing e Garcia, 1992).

O etilenoglicol foi utilizado como crioprotetor a partir de 1977 (Miyamoto e Ishibashi), apresentando menor toxicidade e menor peso molecular dentre os demais. A maior permeabilidade pela membrana celular permite utilizá-lo sem que seja necessário

diferentes etapas no processo de descongelamento, como banhos em diferentes concentrações de crioprotetor ou uso de sucrose (Bracke e Nieman, 1995). Desta forma, o embrião pode ser descongelado e transferido diretamente para a receptora, tornando muito prático a sua utilização.

Os crioprotetores não permeáveis permanecem no compartimento extracelular e carregam água livre do interior da célula, causando a desidratação do espaço intracelular. Além disso, tem função de estabilizar e preservar proteínas da membrana celular durante o remoção do crioprotetor (Borland et al., 1976) e alterar a formação dos cristais pra um tamanho e formato inócuos (Palasz & Mapletoft, 1996). Estes crioprotetores são utilizados em associação com os permeáveis, principalmente durante a fase de descongelamento (Jain e Paulson, 2006). A sucrose é o crioprotetor não permeável mais comumente usado, mas outros dissacarídeos também são empregados, como galactose, glicose e trealose.

Vários organismos são capazes de sobreviver ao congelamento, incluindo alguns sapos, insetos, nematóides, bactérias e fungos, através do acúmulo de açúcares, tais como trealose, sucrose e glicose, contudo a membrana celular de mamíferos é praticamente impermeável a açúcares. Para superar a barreira de permeabilidade das membranas celulares a açúcares, Eroglu et al (2000) transformaram células de fibroblastos e queratinócitos, que passaram a formar poros transmembrânicos na bicamada lipídica. Estes poros podiam ser abertos ou fechados pela remoção ou adição de concentrações micromolares de íons de zinco. Após a introdução de trealose intracelular eles reportaram melhora na sobrevivência de células mamíferas pós descongelamento. Contudo, quando foi introduzido trealose diretamente em oócitos e zigotos de camundongos, pela técnica de microinjeção, não se observou melhoras nas taxas de produção de embriões e de prenhez (Eroglu et al., 2003).

Polímeros ou macromoléculas também são usados como crioprotetores extracelulares, tais como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), álcool polivinil, hialuronato de sódio, ficoll e dextran (Palasz, 1993). Mesmo não penetrando na célula, eles podem reduzir a quantidade de crioprotetor intracelular necessário para vitrificação, reduzindo a toxicidade da solução. Um polímero pode reduzir a concentração mínima de crioprotetor que é requerido para vitrificação em 7% e em até 24% em combinação com o aumento da pressão hidrostática (Fahy et al., 1984).

Vários trabalhos avaliaram o potencial efeito da adição de macromoléculas na solução de vitrificação. Lane et al. (1999b) obtiveram melhores taxas de

sobrevivência congelando embriões bovinos usando ficoll, já Laowtamathron et al (2005) não encontraram efeito benéfico usando esse polímero. O'Neill et al (1997) observaram que a adição de PEG resultou numa melhora na viabilidade de ovócitos criopreservados.

2.1.3 Métodos de criopreservação

Existem duas formas básicas de criopreservação das células, ambas têm sido usadas com sucesso para preservar uma variedade de diferentes tipos celulares, incluindo espermatozoides, ovócitos e embriões:

- criopreservação com equilíbrio – onde as células são colocadas em baixas concentrações de crioprotetores (em torno de 10% - 1,5M) e com taxa de resfriamento entre 0.3 a 2 °C/min.

- criopreservação sem equilíbrio – onde as células são expostas muito rapidamente a altas concentrações de crioprotetores (em torno de 40% - 6 a 8 M) e com altas taxas de resfriamento >500°C/min.

2.1.3.1 Congelamento lento ou clássico

O congelamento lento é o principal método aplicado na criopreservação de embriões. Durante a fase inicial, os embriões são expostos e equilibrados com crioprotetores, então, são submetidos ao resfriamento, a taxa de resfriamento ocorre numa velocidade entre 0,3 a 0,5 °C/min. O resfriamento controlado inicia entre -5°C e -7°C, nesse momento é necessário induzir a cristalização do meio extracelular (seeding - detalhado anteriormente). A temperatura em que as palhetas são imersas no nitrogênio líquido varia de -30 a -89 °C (Whittingham et al., 1972; Willadsen, 1977).

Embriões com curva de resfriamento mais longa chegando a -60 °C desidratam mais que aqueles que são imergidos no nitrogênio líquido a -30 °C, este último ainda mantém resíduo de água, para evitar recristalização no momento do descongelamento, a taxa de aquecimento deve ser rápida, em torno de 300 °C/min, por isso as palhetas são

retiradas do nitrogênio e descongeladas em água com temperatura entre 25 e 36 °C. Na curva mais longa de resfriamento, o descongelamento deve ocorrer de forma mais gradual, numa taxa em torno de 20°C/min (Willadsen, 1977).

O último passo após o descongelamento é a remoção dos crioprotetores dos embriões, com diferenças dependendo do crioprotetor utilizado (detalhado no item anterior).

Wilmut e Rowson obtiveram sucesso na criopreservação de embrião mamífero utilizando uma curva de resfriamento longa, chegando a -80°C, obtendo o nascimento de um bezerro em 1973.

Em 1977, Willadsen modificou o método proposto por Whittingham et al. (1972). Willadsen criopreservou embriões de ovinos e bovinos numa velocidade de resfriamento de 0,3 °C/min, até a temperatura de -36 °C, então as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido. O ponto crítico para o sucesso dessa técnica é que as amostras devem ser aquecidas rapidamente. Este é considerado o método clássico para criopreservação de embriões de diferentes espécies, utilizado nos laboratórios de reprodução humana e reprodução animal.

Resumidamente, essa técnica por ser descrita da seguinte forma, embriões são expostos ao crioprotetor a +20 °C por período entre 10 e 15 minutos, resfriados a -7 °C, momento em que o “seeding” é realizado. Então, entram numa descida de resfriamento entre 0,3 a 0,5 °C/min até uma temperatura de -30 a -35 °C, antes de serem emergidos em nitrogênio líquido. Esta curva de resfriamento pode ser efetuada através de equipamento manual com auxílio do cilindro de congelamento ou por meio de equipamentos eletrônicos, que permitem de forma automática a obtenção de uma curva precisa (Rumpf et al, 2004).

Rall (2001) relatou que embriões de 22 espécies de mamíferos foram congelados usando este método.

2.1.3.2 Congelamento rápido e ultra-rápido

Métodos rápidos de congelamento incluem um curto período de equilíbrio entre embrião e crioprotetor, seguido pela manutenção da palheta a baixa temperatura (-5 até -

30°C) por 25 a 30 minutos (Chupin 1986, 1987) ou colocá-la no vapor de nitrogênio por 1 ou 2 minutos antes de serem imergidas no nitrogênio líquido.

Os parâmetros para sucesso dessa técnica incluem diferentes tipos, combinações e concentrações de crioprotetores, o estágio de desenvolvimento do embrião e o tempo de pré-exposição para que ocorra a desidratação (Cseh et al., 1997).

Esta técnica pode ser aplicada utilizando glicerol, propilenoglicol e DMSO, mas o melhor resultado foi utilizando etilenoglicol, sempre em associação com um crioprotetor não permeável, como a sucrose (Gutierrez et al., 1993). Etilenoglicol penetra facilmente pela membrana e restringe a formação de cristais de gelo, além de ser menos tóxico que os demais mesmo em altas concentrações (Kasai et al., 1981)

Apesar de resultados satisfatórios, essa técnica alcançou pouco emprego comercial.

2.1.3.3 Vitrificação

O processo da vitrificação é rápido, dispensa o uso de equipamentos caros e sofisticados. As taxas de sobrevivência são aceitáveis tanto para o embrião *in vivo* como *in vitro*, apesar das grandes diferenças bioquímicas e morfológicas existentes entre os dois (Massip *et al.*, 1995; Pugh *et al.*, 2000; Dobrinsky, 2002; Nedambale et al., 2004; Xu et al., 2006).

A técnica de vitrificação consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores associado a uma alta velocidade de resfriamento, passando do estado líquido ao estado vítreo sem a formação de cristais de gelo (Kasai et al., 1990). Nessa técnica é necessário manter um balanço entre vários fatores que causam danos ao embrião, como formação de cristais de gelo, injúrias osmóticas, efeitos tóxicos do crioprotetor entre outros (Vajta, 2000; Kaidi *et al.*, 2001).

Se um líquido é resfriado suficientemente rápido, pode evitar o congelamento e ser vitrificado. As taxas de resfriamento são extremamente altas para líquidos puros (por exemplo, 10 milhões de graus por segundo para água pura), porém, mais realista para soluções, taxas de resfriamento entre 100-1000 °C/min são suficientes para alcançar a vitrificação em soluções de crioprotetores.

As altas concentrações de crioprotetores apresentam toxicidade e podem causar danos às células. Esta toxicidade pode ser minimizada através da exposição breve aos crioprotetores ou através de rápidas taxas de resfriamento (Vajta *et al.*, 1998), que também tem a vantagem de diminuir as injúrias celulares pela passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e -5°C (Martino *et al.*, 1996b; Zeron *et al.*, 1999).

Rall e Fahy (1985) foram os primeiros a relatarem a vitrificação como nova técnica de criopreservação de embriões, usando combinação de três crioprotetores permeáveis e um não-permeável, DMSO, acetamina, propilenoglicol e polietilenoglicol. Em 1992, Ishimori *et al.* compararam seis diferentes soluções de vitrificação e concluíram que glicerol e DMSO assim como etilenoglicol e DMSO seriam as melhores opções para uso como soluções de vitrificação, sendo que a segunda solução tem a vantagem de poder ser usada tanto em mórulas quanto blastocistos (Cseh *et al.*, 1999). Durante os últimos anos inúmeros agentes crioprotetores vêm sendo utilizados em diferentes concentrações e combinações (Dattena *et al.*, 2004).

Além disso, novas técnicas de vitrificação vem sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Tendo como princípio básico a utilização de pequenos volumes de solução de vitrificação, que permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (Arav *et al.*, 2002), ou uso de nitrogênio líquido super-resfriado, que chega a temperatura de -210 °C (Werlich *et al.*, 2005; Yavin *et al.*, 2009). Algumas técnicas de vitrificação são descritas abaixo.

A técnica de microgota, consiste em colocar uma gota de solução, juntamente com o embrião, diretamente no nitrogênio líquido. Foi utilizada em embriões de camundongo e bovinos (Landa & Tepla, 1990, Riha *et al.*, 1991, Papis *et al.*, 2000). A melhora desse método foi a colocação dos embriões em grades de cobre de microscopia eletrônica antes de serem vitrificados em nitrogênio líquido (Martino *et al.*, 1996a).

Outro avanço no uso da técnica microgotas foi a utilização de uma superfície de metal resfriada na temperatura do nitrogênio líquido, chamada de superfície sólida de vitrificação, SSV, nessa superfície era colocada as microgotas com os embriões (Dinnyes, 2000; Bagis *et al.*, 2002, 2004). Xu *et al.* (2006) obtiveram boas taxas de prenhez de embriões obtidos *in vitro* usando sêmen sexado e vitrificados usando SSV.

Vajta *et al.* (1998) propuseram uma nova técnica, utilizando uma palheta de 0,25 ml esticada no calor, tendo seu volume interno metade do volume da original,

denominada de “open pulled straw” – OPS. Com a palheta de 0,25 ml se consegue uma taxa de resfriamento, quando colocadas diretamente no nitrogênio líquido, de 2.500°C/min, enquanto com a OPS essa taxa sobe para 20000 °C/min. Uma alternativa para a OPS é a técnica de micropipeta de vidro, GMP (Kong et al., 2000), que permite maior taxa de congelamento do que a OPS, pela maior condutividade do vidro e pelo menor volume da solução onde está o embrião. Entretanto, não foi observada diferença nos resultados obtidos de embriões vitrificados pelo método de OPS e GMP (Cho *et al.*, 2002). Esta técnica ainda possui uma limitação devido a fragilidade da micropipeta, sendo freqüentemente quebrada ou rachada próximo a extremidade mais fina.

A técnica de cryotop segue o princípio de mínimo volume, este sistema consiste de um fino filme de polipropileno conectado a uma haste de plástico. Neste filme os ovócitos ou embriões são colocados num volume muito pequeno (<0,1µl) e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido (Kuwayama et al., 2005). Cryotops têm sido usados com sucesso na criopreservação de ovócitos e embriões humanos (Antinori et al., 2007; Cobo et al., 2008), e ovócitos de éguas, vacas, ovelhas e búfalas (Chian et al., 2004; Bogliolo et al., 2006; Succu et al., 2007).

Comparando os danos da criopreservação causadas ao embrião durante o congelamento clássico e a vitrificação (Tabela 1.1) pode-se observar que na vitrificação não há a formação de gelo e que durante o resfriamento o risco de danos ao embrião é baixo. Entretanto, os embriões vitrificados têm um maior risco de sofrer as injúrias osmóticas e tóxicas, devido à alta concentração do crioprotetor utilizado nas soluções de vitrificação (Vajta *et al.*, 1998).

Tabela 1.1 – Comparação entre congelamento clássico e a vitrificação nas injúrias causadas no sistema de criopreservação.

Injúrias	Congelamento clássico	Vitrificação
Formação de cristais de gelo	+++	-
Injúrias osmóticas	+	+++
Injúrias tóxicas	+	+++
Danos de rompimento	++	++
Injúrias ao resfriamento	+++	+

+++ = risco alto; ++ = médio risco; + = risco baixo; - = não apresenta. Fonte: Vajta, G. (comunicação pessoal)

Porém, as injúrias causadas neste método diminuem com uma maior velocidade de congelamento, fato comprovado pelos resultados obtidos na comparação direta entre técnicas de vitrificação e congelamento lento usando embriões PIV (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006), com taxas de sobrevivência e eclosão sempre maiores nos grupos vitrificados.

Por essas características a vitrificação tem sido a técnica de eleição para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.2 Pressão Hidrostática

Pressão hidrostática (PH) é uma variável termodinâmica presente na biosfera que pode variar de 1 a 1100 atmosferas (atm), da superfície da terra até as maiores profundidades dos oceanos (1 atm = 0,101 megapascal, MPa = 1,013 bar; para evitar confusão MPa será utilizado em todo texto). Em termos de volume ocupado a maioria da biosfera é composta de ambientes com alta pressão, já que os oceanos cobrem 70% da superfície da terra.

Os efeitos físico-químicos causados pela pressão são bem estabelecidos e estão relacionados com mudanças no sistema de volume, sendo que a resposta desse sistema é governada pelo princípio de Le Chatelier. O princípio postula que quando uma reação é acompanhada por um aumento de volume ela é inibida pelo aumento da pressão e quando a reação é acompanhada por uma diminuição no volume ela é acelerada pelo aumento da pressão (Palou et al., 1997). Uma definição distinta entre pressão e temperatura é que a temperatura simplesmente acelera as reações definidas pela equação de Arrhenius, enquanto a pressão pode acelerar, inibir ou não afetar a reação, dependendo da mudança no sistema de volume.

Contudo, os efeitos da pressão hidrostática em sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* são muito complexos e ainda não estão totalmente definidos. Mesmo conhecendo o resultado de uma reação bioquímica, ainda é difícil prever como a pressão hidrostática pode afetar vias metabólicas ou aumentar o pool de metabólitos de organismos vivos.

Existe um crescente interesse no entendimento e potencial aplicações de organismos que vivem em ambientes sobre extrema pressão, piezófilos (Abe et al.,

1999; Bartlett, 2002), e também sobre a influência da pressão hidrostática em organismos que vivem na pressão de 1 atmosfera, mesófilos, principalmente em microorganismos patogênicos, uma vez que a pressão hidrostática tem sido utilizada como nova técnica na pasteurização de alimentos (Knorr, 1999; Hayashi, 2002, Ritz, et al., 2002; Spilimbergo et al., 2002).

2.2.1 - Aspectos biológicos da pressão hidrostática

Pressão hidrostática, como um importante fator ambiental, possui grande efeito sobre funções biológicas e viabilidade de organismos. O estresse causado pela pressão hidrostática pode levar a alterações nas membranas biológicas (Yager e Chang, 1983; Aldridge e Bruner, 1985; Schuster and Sleytr, 2002; Tauc et al., 2002), proteínas (Jaenicke, 1991; Gross e Jaenicke, 1994; Silva, et al., 2001;), RNA e DNA (Murakami e Zimmerman, 1973) e o metabolismo celular (Ernest, et al. 1966; Abe, et al., 1999). Estas alterações podem causar inibição de crescimento ou morte celular, dependendo da magnitude utilizada, assim como do tempo de exposição em combinação com temperatura, pH, suporte de oxigênio e, também, pela sensibilidade dos diferentes organismos à pressão.

A desnaturação protéica e danos na membrana são os principais fatores correlacionados com a inativação de bactérias submetidas a pressão hidrostática (Erijman & Clegg, 1998; Ganzle & Vogel, 2001). Contudo, permanece incerto se esses danos são a causa direta da morte celular.

Um modelo alternativo foi proposto, baseado nos estudos de inativação térmica em *Salmonella*, onde os danos causados por um estresse subletal induziu desequilíbrio metabólico, levando a um grande aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) que são responsáveis pela morte celular (Aldsworth et al., 1998). As ROS causam peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inativando enzimas, além de induzir a fragmentação do DNA nuclear. O estresse oxidativo também foi induzido em *E. coli* submetidas a pressão hidrostática, tendo grande aumento quando usado uma pressão acima de 150 MPa (Aertsen et al., 2005). O efeito causado pelo estresse oxidativo será letal se o sistema de reparo não entrar em ação o mais rápido possível, atuando na retirada destas ROS, estes agentes de reparo são definidos como anti-oxidantes

(Halliwell & Gutteridge, 1989) e podem ser divididos em não-enzimáticos (glutathiona/GSH, cistina, hipotaurina, piruvato, entre outros) e enzimáticos (superóxido desmutase/Mn-SOD, catalase e glutathiona peroxidase/GPX)

Utilizando pressão hidrostática no intervalo de 30 a 50 MPa ocorre inibição de crescimento na maioria dos organismos (Bartlet, 2002), já que o início da replicação do DNA é um dos processos mais sensíveis à pressão (Abe et al., 1999). Além disso, ribossomos livres se dissociam em pressões acima de 60 MPa (Gross et al., 1993), isto acontece pois a dissociação de ribossomos livres é acompanhada por uma grande diminuição do volume, este evento também limita o crescimento celular em condições de pressão.

Já o efeito causado pela pressão acima de 200 MPa é letal em grande parte dos organismos. Procariotos, contudo, são mais resistentes à pressão que eucariotos, por exemplo, o fungo *Saccharomyces cerevisiae* é morto sobre pressão de 150 MPa (Iwahashi et al., 1991), já para bactéria *Escherichia coli* é necessário uma pressão de 550 MPa para ser letal (Sonoike et al., 1993).

A temperatura exerce forte relação no efeito letal causado pela pressão hidrostática. Sonoike et al. (1993) demonstraram que *Lactobacillus casei* após submetidos a pressão de 300 MPa e temperatura de 0°C e 60°C apresentavam maior taxa de morte do que utilizando a mesma pressão na temperatura de 20°C. Para *Saccharomyces cerevisiae*, pressão de 40 MPa na temperatura de 4°C é letal, contudo na mesma pressão e temperatura de 25°C os fungos permanecem aptos a crescerem (Iwahashi et al., 2003). *Escherichia coli* submetidas a 150 e 250 MPa e temperatura de -10°C e -20°C apresentaram uma maior taxa de inativação do que a 25°C. Já na pressão de 450 e 550 MPa esse efeito da temperatura se inverte, sendo a taxa de inativação maior a 25°C do que a -10 e -20°C (Moussa et al., 2007).

A membrana celular é considerada o sítio primário para danos causados pela pressão (Palou et al., 1997). Avaliações por microscopia eletrônica mostraram que pressão induz mudanças na parede celular e citoesqueleto de fungos, por conseguinte na dinâmica das membranas celulares (Fernandes et al., 2001), alterando sua funcionalidade como o transporte ativo ou permeabilidade passiva e também perturbando o balanço físico-químico da célula.

As alterações observadas nas membranas estão relacionadas com a sensibilidade de lipídeos a pressão, o aumento da pressão acentua a ordem das cadeias de hidrocarbono, provocando um aumento da espessura da bicamada lipídica (Braganza &

Worcester, 1986). O estado físico dos lipídeos que envolvem as proteínas de membrana tem papel importante na ligação entre membrana-enzima e existe considerável evidência que a pressão promove mudanças neste estado físico, acarretando a perda deste contato.

Outro efeito observado após a pressão hidrostática é alteração na composição das membranas celulares, muitos organismos marinhos modulam a fluidez da membrana em resposta a pressão (Cossins & Macdonald, 1989), aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados em peixes capturados em maiores profundidades.

Bactérias *Photobacterium profundum* (SS9), encontradas em grandes profundidades, apresentavam uma maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (Allen & Bartlett, 2002). A presença de ácidos graxos poliinsaturados é incomum na maioria das bactérias, mas presente em alta proporção em bactérias isoladas de ambientes com baixa temperatura e oceanos profundos (Yano et al., 1997). Esse aumento na proporção de ácidos graxos insaturados estaria relacionado com a resistência de bactérias a alta pressão e baixa temperatura (Sahara et al., 2002).

Algumas hipóteses foram levantadas visando explicar o aumento da insaturação na membrana de organismos que vivem em alta pressão. A pressão causaria o estreitamento das cadeias de ácidos graxos na membrana de fosfolipídeos, alterando a estrutura física da mesma. Pelo forte empacotamento das cadeias acil, a membrana assume uma forma onde a movimentação molecular fica restrita, então, o aumento da insaturação de ácidos graxos poderia ser para manter a membrana com certo alcance de viscosidade (Macdonald & Cossins et al., 1985). Também foi sugerido que organismos buscam uma otimização na permeabilidade de íons através da membrana com um propósito energético, como a translocação de prótons e síntese de ATP, ou seja, após a pressão a membrana sofreria uma reestruturação visando manter a permeabilidade de íons (Van de Vossenberg et al., 1995). O aumento na insaturação de ácidos graxos pode compensar a alteração da membrana quando submetida a alta pressão.

A indução da expressão de determinados genes foi relacionada com o aumento da insaturação na membrana lipídica das células. Em fungos, ficou caracterizado que após o estresse por pressão hidrostática ocorre uma indução do gene OLE 1 que codifica para $\Delta 9$ desaturase, aumentando a insaturação de ácidos graxos (Fernandes et al., 2004).

Estresses induzidos por choque osmótico, variação de temperatura, pressão hidrostática e etanol causam desestabilização de membrana e aumentam a expressão do gene ERG 25, que é uma enzima esterol desaturase envolvida na biosíntese do

ergosterol. O ergosterol é uma molécula similar ao colesterol, contudo apresenta uma cadeia insaturada, já o colesterol apresenta cadeia saturada. A biosíntese deste esterol envolve duas etapas, de acetato a farnesil pirofosfato e então a ergosterol. Fernandes et al. (2004) avaliando o padrão de expressão em fungos submetidos à pressão hidrostática, demonstraram que ERG 25 estava altamente expresso, sugerindo que esta molécula pode ser um importante protetor de membranas celulares sob pressão hidrostática.

A influência da pressão na expressão de genes e produção de proteínas tem sido muito estudada (Gross & Jaenicke, 1994; Takahashi et al., 1997; Fernandes, 2005). Foguel & Silva (2004) mostraram que a associação de proteína e DNA é menos estável sob pressão, demonstrando que alta pressão pode interferir com processos transcricionais, alterando expressão genômica.

Mentré e Hui (2001) revisaram o efeito da pressão em células vivas, demonstrando que, na maioria dos casos, a expressão de genes é inibida quando as células são submetidas à pressão, contudo algumas proteínas específicas de estresse são sintetizadas, como por exemplo, “heat shock proteins” (HSP) e “cold shock proteins” (CSP) (Welch et al., 1993; Wemekamp-Kamphuis et al., 2002). Além de inibir ou estimular a síntese protéica, pressão hidrostática pode alterar a sua estrutura, levando a conformações parcialmente ou completamente desdobradas e até mesmo a desnaturação protéica (Yayanos e Pollard, 1969).

Análise de 6.200 genes conhecidos de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou que 5% dos genes foram afetados pela pressão hidrostática, sendo que genes envolvidos na defesa, no estresse e no metabolismo de carboidratos foram altamente induzidos pela pressão, enquanto genes envolvidos na transcrição celular, síntese protéica e regulação do ciclo celular tiveram uma diminuição na expressão (Fernandes et al., 2004).

A exposição de *Escherichia coli* à pressão de 53 MPa resultou na indução de 55 proteínas, incluindo 11 HSPs e 4 CSPs. Pressão é o único agente indutor de estresse conhecido que, simultaneamente, induz tanto as proteínas HSP e CSP (Welch et al., 1993). Alta pressão induzindo proteínas heat shock têm sido confirmado em outros estudos com *E. coli* assim como em células humanas (Haskin et al., 1993). Alguns dos efeitos conhecidos da pressão nos sistemas biológicos podem explicar o aparente paradoxo de estimulação simultânea de “heat shock” e “cold shock”. Alta pressão e alta temperatura desestabilizam a proteína quaternária e promovem a perda da estrutura

terciária. E por outro lado, alta pressão e baixa temperatura tem efeito similar na síntese de proteínas e estrutura de membrana.

As HSPs foram originalmente identificadas como proteínas, cuja expressão foi marcadamente aumentada pelo calor. São, tradicionalmente, classificadas pelo peso molecular. Apesar da intensidade e duração do estímulo do calor necessário para induzir a expressão das HSPs variar consideravelmente entre os tecidos celulares, uma exposição que envolve o aquecimento das células de mamíferos a 42-45°C por 20 a 60 minutos, revertendo-os depois para temperatura de manutenção (37-39°C), já promove alteração. A indução da expressão das HSPs inicia poucos minutos após o princípio do estresse térmico, podendo seu pico de expressão ocorrer até diversas horas depois do procedimento (SONNA et al., 2002).

Proteínas associadas ao estresse apresentam funções variadas: a) regulação do estado oxidativo das células, atuando como antioxidantes; b) regulação protéica; c) participam da síntese de trealose, que é um estabilizador de membranas; e d) como chaperonas. As chaperonas ajudam a evitar a agregação de proteínas desnaturadas e auxiliam no retorno dessas proteínas à sua forma nativa, além de auxiliar na montagem final, bem como na síntese, dobramento e degradação de proteínas (Ellis, 1987). As chaperonas mais comuns são as HSP-40, HSP-60, HSP-70, HSP-90 e HSP-100 (Hohman & Mager, 1997).

As HSPs podem estar relacionadas ao processo de criopreservação, Huang et al. (1999) publicaram que a diminuição da proteína de choque HSP 90 está associada ao declínio na motilidade espermática durante o resfriamento de espermatozóide suíno.

As CSPs são induzidas por um choque subletal causado pelo resfriamento (Phadtare et al., 1999). Estas proteínas têm como funções fisiológicas proteger e restaurar conformações nativas de RNA durante o estresse, atuando como chaperonas de RNA e também como ativadoras de transcrição (Graumann e Marahiel, 1999), evidenciando sua importante função na proteção ao congelamento (Wouters et al., 1999). Contudo, as CSPs não são induzidas apenas pelo choque de resfriamento, em *Escherichia Coli*, por exemplo, um tipo de CSP é induzido por estresse nutricional (Yamanaka et al., 1998).

Sabendo que diferentes agentes estressores promovem um aumento na expressão de HSPs e CSPs (Welch et al, 1993), algumas pesquisas foram conduzidas com o intuito de obter uma proteção-cruzada utilizando estes diferentes fatores estressantes. Wemekamp-Kamphuis et al. (2002) encontraram um nível de sobrevivência de *Listeria*

monocytogenes 100 vezes maior quando estas bactérias foram submetidas a um choque por resfriamento antes da pressurização do que as células que foram mantidas apenas a 37⁰C e depois pressurizadas.

Diferente das pesquisas de microbiologistas de alimentos que usam a pressão hidrostática como forma de eliminação de agentes patológicos, este trabalho busca usar a pressão hidrostática como alternativa na melhora da sobrevivência de embriões bovinos PIV criopreservados, tendo como princípio básico a proteção cruzada. Este princípio está sendo confirmado em pesquisas usando diferentes tecnologias de reprodução assistida, como descrito no tópico seguinte.

2.2.2 Uso da pressão hidrostática em técnicas de reprodução assistida

Mais recentemente, a pressão hidrostática tem sido empregada em associação com técnicas de criopreservação de gametas e embriões. Utilizando como princípio o aumento da resistência ao estresse, principalmente pela alteração de perfil de proteínas, aumentando e estabilizando proteínas de choque nas células submetidas ao pré-tratamento com pressão hidrostática.

Embriões murinos foram pré-tratados com pressão hidrostática antes da criopreservação e obtiveram uma taxa de sobrevivência e eclosão melhor do que os embriões não tratados e igual ao grupo controle (Pribenszky et al., 2005a). Nesse primeiro trabalho também foi observado que à medida que se aumenta o nível de pressão utilizada, menos tempo esse embrião suporta a pressão hidrostática.

Em bovinos, o sêmen tratado com pressão hidrostática usando 30 MPa por 90 minutos apresentou melhora na motilidade e morfologia espermática pós descongelamento de touros que apresentavam histórico de sêmen com baixa congelabilidade. Além disso, aumentou em 8% a taxa de não retorno ao cio após inseminação artificial (Pribenszky et al., 2007).

Em suínos, igualmente, o sêmen submetido a PH demonstrou melhora na motilidade após o descongelamento usando 20 ou 40 MPa por 80 ou 120 minutos (Pribenszky et al., 2005b). MARRAS inseminadas com sêmen congelado após o tratamento com PH apresentavam tamanho de leitegada igual ao grupo de animais inseminadas com sêmen fresco (Kuo et al., 2007), resultado importante já que o uso de sêmen

criopreservado apresenta como principal característica o menor tamanho da leitegada quando comparado com inseminação usando sêmen fresco (Roca et al., 2006).

Para entender os possíveis mecanismos pelos quais o tratamento com PH melhora as taxas de motilidade e fertilidade de sêmen congelado de suínos e bovinos, Huang et al. (2009) avaliaram o perfil de proteínas antes e após o congelamento de sêmen suíno, tratados ou não com PH. Sete proteínas apresentavam níveis diferentes após o congelamento quando comparadas ao sêmen suíno à temperatura ambiente. Sendo que destas, três estavam significativamente maiores apenas nas amostras tratadas com PH, tanto nas amostras resfriadas a 5^o C quanto nas descongeladas. A primeira, complexo ubiquinol-citocromo c-redutase, é uma das cinco enzimas envolvidas no sistema de fosforilação oxidativa, ou seja, na geração bioquímica do ATP (Schilling et al., 2006). A segunda, uma perilipina, é proteína presente na membrana de gotas lipídicas dos adipócitos e tem função na regulação da hidrólise de triacilglicerol (Greenberg et al., 1991). E a terceira, é o precursor da espermedesina AWN, as espermadesinas estão envolvidas no processo de capacitação, reconhecimento e ligação entre os gametas masculinos e femininos (Calvete et al., 1994; Dostálová et al., 1995). Estes diferentes níveis de proteínas são atribuídos ao tratamento com PH e associados com melhoras do sêmen porcino após congelamento e descongelamento.

O ovócito de mamíferos é uma célula grande e volumosa que quando criopreservada sofre vários danos morfológicos e funcionais (Hyttel et al., 2000; Ledda et al., 2001). Além disso, a zona pelúcida pode enrigecer durante o congelamento (Da Silva & Metelo, 2005), podendo afetar a fertilização desse ovócito (Le Gal & Massip, 1999). Em alguns casos, ocorre uma má formação do fuso mitótico formando ovócitos com diploidia (Chen et al., 2003; Men et al., 2003). Todos esses eventos impedem o desenvolvimento do ovócito até embrião (Brandão, 2002). A PH também foi avaliada na criopreservação de ovócitos, um dos grandes desafios na reprodução assistida.

Ovócitos porcinos, ativados partenogeneticamente, apresentaram melhora na taxa de clivagem quando submetidos a PH entre 20 e 40 MPa, por 30 ou 60 minutos e na produção de embrião quando submetidos a 20 MPa, por 30 e 60 minutos, sendo que a vitrificação desses ovócitos imediatamente após a PH não melhorou a taxa de produção de blastocistos (Pribenszky et al., 2008). Contudo, quando esses ovócitos foram vitrificados após 70 ou 130 minutos de serem submetidos à PH observou-se uma significativa melhora nas taxas de blastocisto, chegando a índice de produção de 14% (Du et al., 2008a), bem maior do que se encontra na literatura com ovócitos

criopreservados (Le Gal and Massip, 1999; Hyttel et al., 2000, Yamada et al., 2007). Além disso, temperatura no momento da aplicação da PH tem influência na melhora nos resultados de produção de embriões com ovócitos criopreservados, sendo a temperatura de 37,5⁰C melhor quando comparada com 25⁰C (Du et al., 2008a)

Estes resultados mostram a aplicabilidade da PH para melhorar os índices técnicos de diferentes tecnologias associadas à reprodução assistida. Os mecanismos de ação da PH sobre os diferentes sistemas biológicos são pouco conhecidos e a pesquisa tem o desafio de buscar essas explicações e tentar usá-la em diferentes áreas do conhecimento.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AERTSEN, A.; DE SPIEGELEER, P.; VANOIRBEEK, K.; LAVILLA, M.; MICHIELS, C.W. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n 5, p. 2226-2231, 2005.

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v. 50, p. 147-162, 1998.

ALDRIDGE, B. E.; BRUNER, L. J. Pressure effects on mechanisms of charge transport across bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 817, p. 343-354, 1985.

ALDSWORTH, T. G.; SHARMAN, R.L.; DODD, C.E.; STEWART, G.S. A competitive microflora increases the resistance of *Salmonella typhimurium* to inimical processes: evidence for a suicide response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1323–1327, 1998.

ALLEN, E.E.; BARTLETT, D.H. Structure and regulation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid synthase genes from the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. **Microbiology**, v. 148, p. 1903-1913, 2002.

ANTINORI, M.; LICATA, E.; DANI, G.; CERUSICO, F.; VERSACI, C.; ANTINORI, S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14 p. 72–79, 2007.

ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKER, I.; GACITUA, H. News trends in gameta's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 18, p. 77-81, 2002.

BAGIS, H.; ODAMAN, H.; SAGIRKAYA, H.; DINNYES, A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 173-9, 2002.

BAGIS, H.; SAGIRKAYA, H.; MERCAN, H.O.; DINNYES, A. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 186-192, 2004.

BARTLETT, D.H. Pressure effects on in vivo microbial processes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 367-381, 2002.

BILTON, R.J.; MOORE, N.W. Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. **Aust. Journal Biology Science**, v.32, p.11, 1979.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J.; Effect of addition of hyaluron to embryo culture on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, 2009.

BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; ROSATI, I.; ZEDDA, M.T.; PAU, S.; NAITANA, S. Vitrification of immature and in vitro matured horse oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 149-150, 2006.

BORLAND, R.M.; BIGGERS, J.D.; LECHENE, C.P. Kinetic aspects of rabbit blastocoel fluid accumulation: an application of electrone probe analysis. **Development Biology**, v. 50, p.201, 1976.

BRACKE, C.; NIEMANN, H. **New aspects in the freezing of embryos from livestock**. In: Proc.11th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. Fondation Marcel Merieux, Lyon, France. 101-111, 1995.

BRACKETT B.G.; BOUSQUET D.; BOICE M.L.; DONAWICK W.J.; EVANS J.F.; DRESSEL M. A.. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BRAGANZA, L.F.; WORCESTER, D.L. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused hydrostatic pressure. **Biochemistry**, v. 25, p. 7484-7488, 1986.

BRANDÃO, Daniela Oliveira. **Vitrificação de oócitos bovinos em diferentes momentos de maturação**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

CALVETE J.J.; SOLÍS D.; SANZ, L.; DIAZ-MAURINO, T.; TÖPFER-PETERSEN, E. Glycosilated boar spermadhesin AWN-1 isoforms: biological origin, structural characterization by lectin mapping, localization of O-glycosylation sites and effect of

glycosylation on ligand binding. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, p. 667-673, 1994.

CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; HO, H.N.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 202, p. 101-107, 2003.

CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification, **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 685–696, 2004.

CHO, S.K.; CHO, S.G.; BAE, I.H.; PARK, C.S.; KONG, I.K. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 151-158, 2002.

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.25, p.147, 1986.

CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. **Theriogenology**, v.27, p.219, 1987.

COBO, A.; KUWAYAMA, M.; PEREZ, S.; RUIZ, A.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. **Fertility and Sterility**, v. 89, p. 1957-1664, 2008.

COSSINS, A.R.; MACDONALD, A.G. The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, p. 115-135, 1989.

CSEH, S.; CORSELLI, J.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L.; BAILEY, L.L.; SZALAY, A.A. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. **Theriogenology**, v.48, p.43-50, 1997.

CSEH, S.; HORLACHER, W.; BREM, G.; CORSELLI, J.; SEREGI, J.; SOLTI, L.; BAILEY, L. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. **Theriogenology**, v. 52, p. 103-113, 1999.

DA SILVA, F.M.; METELO, R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 40 p. 205-209, 2005

DATTENA, M.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; ISACHENKO, V.; MARA, L.; CHESSA, B.; CAPPAL, P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v. 62, p. 481-493, 2004.

DINNYES, A.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.63, p.513-518, 2000.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of Embryos. **Theriogenology**, v.51, p.17-26, 1996.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

DOSTÀLOVÀ, Z.; CALVETE, J.J.; SANZ, L.; TÖPFER-PETERSEN, E. Boar spermadhesin AWN-1: oligosaccharide and zona pellucida binding characteristics. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, p. 239-336, 1995.

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

DU, Y.; LIN, L.; SCHMIDT, M.; BOGH, I.B.; KRAGH, P.M.; SORENSEN, C.B.; 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 Stem Cells**, v.10, p. 325-330, 2008b.

ELLIS, R. J. Proteins as molecular chaperones. **Nature**, v. 9, p. 328-378, 1987.

ERIJMAN, L.; R. M. CLEGG. Reversible stalling of transcription elongation complexes by high pressure. **Biophys. Journal**, v. 75, p. 453-462, 1998.

ERNEST, C.; WELLER, K.P.; WELLER, K.P. The effect of hydrostatic pressure on the synthetic processes in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 112, p. 573-580, 1966.

EROGLU, A.; RUSSO, M.J.; BIEGANSKI, R.; FOWLER, A.; CHELEY, S.; BAILEY, H.; TONER, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v.18, p.163-167, 2000.

EROGLU, A.; LAWITTS, J.A.; TONER, M.; TOTH T.L. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. **Criobiology**, v.46, p.121-134, 2003.

FAHING, M.L.; GARCIA, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v.29, p.1-18, 1992.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407-426, 1984.

FAHY, G.M.; LEVY, D.I.; ALI, S.E.. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solution. **Cryobiology**, v.24, p.196-213, 1987.

FERNANDES, P.M.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters and Applied Microbiology**, v. 32, p. 42-46, 2001.

FERNANDES, P.M.; DOMITROVIC, T.; KAO, C.M.; KURTENBACH, E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**, v. 556, p. 153-160, 2004.

FERNANDES, P.M.; How does yeast respond to pressure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v39, p. 1239-1245, 2005.

FOGUEL, D.; SILVA, J.L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry**, v. 43, p. 11361-11370, 2004.

FRANKS, F. **The properties of aqueous solutions at subzero temperatures**. In: Water: a comprehensive treatise. Vol. 7. (Ed.: Franks, F.) Plenum Press, New York, 1982.

GANZLE, M. G.; R. F. VOGEL. 2001. On-line fluorescence determination of pressure mediated outer membrane damage in *Escherichia coli*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 477-485, 2001.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUNOZ, M. CAAMANO, J.N.; CARROCERA, S. MARTÍN, D.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Development and quality of bovine morulae cultured in serum-free medium with specific retinoid receptor agonists. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 884-891, 2008.

GRAUMANN, P.L.; MARAHIEL, M.A. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. **Archives of Microbiology**, v. 171, p. 135- 138, 1999.

GREENBERG A.S.; EGAN, J.J.; WEK, S.A.; GARTY, N.B.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J.; LONDOS, C. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. **Journal Biological Chemistry**, v. 266, p. 11341-11346, 1991.

GROSS, M.; LEHLE, K.; JAENICKE, R.; NIERHAUS, K.H. Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates: stabilizing and identification of the most sensitive functional state. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, p. 463-468, 1993.

GROSS, M.; JAENICKE, R. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. **European Journal of Biochemistry**, v. 221, p. 617-630, 1994.

GUTIERREZ, A., ARTIGA, C., GARDE, J. AND PINTADO, B. Effect of equilibration period and cryoprotectant in quick freezing of mouse morulae. **Theriogenology**, v.39, p.229, 1993.

HAFEZ, E.S.E. Preservation and cryopreservation of Gametes and Embryos. Lea and Febinger, Philadelphia. p.503-525, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of oxygen radicals and others derived species. In: Halliwell B. and Gutteridge, JMC (eds). **Free Radical in Biology and Medicine**. 2nd edn, Clarendon Press, Oxford, p. 22-85, 1989.

HASKIN, C.L.; ATHANASIOU, K.A.; KLEBE, R.; CAMERON, I.L. A heat shock – like response with cytoskeletal disruption occurs following hydrostatic pressure in MG-63 osteosarcoma cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 71, p. 361-371, 1993.

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

HAYASHI, R. High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 25, p. 397-399, 2002.

HOHMAN, S.; MAGER, W.H. Yeast Stress Responses, R.G. Landes Company, Austin, TX, 1997.

HUANG, S.Y.; KUO, Y.H.; LEE, W.C.; TSOU, H.L.; LEE, Y.P.; CHANG, H.L.; WU, J.J.; YANG, P.C. Substantial decrease of heat-shock protein HSP90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 1007-1016, 1999.

HUANG, S.Y.; PRIBENSZKY, C.; KUO, Y.H.; TENG, S.H.; CHEN, Y.H.; CHUNG, M.T.; CHIU, Y.F. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 136-149, 2009.

HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 80-88, 2000.

ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**, v. 37, p. 21-24, 1992.

IWAHASHI, H.; KAUL, S.C.; OBUCHI, K.; KOMATSU, Y. Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. **FEMS Microbiology Letters**, v. 64, p. 325-328, 1991.

IWAHASHI, H.; SHIMIZU, H.; ODANI, M.; KOMATSU, Y. Piezophysiology of genome wide gene expression levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Extremophiles**, v. 7, p. 291-298, 2003.

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

JAENICKE, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 715-728, 1991.

JAIN, J.K.; PAULSON, R.J; Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1037-1046, 2006.

KAIDI, S.; BERNARD, P.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.65, p. 1127-1134, 2001.

KASAI, M., NIWA, K. AND IRITANI, A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. **Journal Reproduction and Fertility**, v.63, p.175-180, 1981.

KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.91-97, 1990.

KONG, I.K.; LEE, S.I.; CHO, S.G.; CHO, S.K.; PARK, C.S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs Glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, p. 1817-1826, 2000.

KNORR, D. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. **Current opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 485-491, 1999.

KUO, Y.H.; PRIBENSZKY, C.; HUANG, S.Y. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. Proceedings of the 6th **International Conference of Boar Semen Preservation**, 2007.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, p. 300-108, 2005.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biologica Praha**, v. 36, p. 153–158, 1990.

LANE, M.; FOREST, K.T.; LYONS, E.A.; BAVISTER, B.D. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel container-less technique. **Theriogenology**, v.51, p.167, 1999a.

LANE, M.; BAVISTER, B.D.; LYONS, E.A.; FOREST, K.T. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**, v.17, p.1234-1236, 1999b.

LAOWTAMMATHRON, C.; LORTHONQPANICH, C.; KETUDAT-CAIRNS, M.; HOCHI, S.; PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology**, v.64, p.1185-1196, 2005.

LEDDA, S.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v. 55, p. 1359-1371, 2001.

LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, p. 290-300, 1999.

LEIBO, S.P. **Preservation of ova and embryos by freezing**. In: New technologies in animal breeding. (Eds.: Brackett, B.G., Seidel, G.E.Jr. and Seidel, S.M.). Academic Press, London, p.127-139, 1981.

LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *International Congr. Embryo Transf. Mammals* 97, 1982.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424-1431, 2003.

MACDONALD, A.G.; COSSINS, A.R. The theory of homeoviscous adaptation of membranes applied to deep-sea animals. **Symposia of the Society of Experimental Biology**, v. 39, p. 301-322, 1985.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P., Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996a.

MARTINO, A.; POLLARD, J.A.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction Development**, v. 45. p. 503-512, 1996b.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, n. 11, p.3004-3011, 1995.

MATSUMOTO, H.; JIANG, J.Y.; TANAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Vitrification of large quantities of immature oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144, 2001.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *Proc. 9th Int. Congr. Animal Reproduction*. p.99, 1980.

MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J.; RUTLEDGE, J.J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. ***Molecular and Reproduction Development***, v. 64, p. 245-250, 2003.

MENTRÉ, P.; HUI BON HOA, G. Effects of high hydrostatic pressure on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecules-associated water. ***International Review of Cytology***, v. 201, p.1-84, 2001.

MEZZALIRA A. & VIEIRA A.D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. ***Acta Scientiae Veterinariae***. 34 (Supl 1): 191-196, 2006.

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. ***Journal of Reproduction and Fertility***, v.50, p.373-375, 1977.

MOUSSA, M.; PERRIER-CORNET, J.M.; GERVAIS, P. Damage in *Escherichia coli* cells treated with a combination of high hydrostatic pressure and subzero temperature. ***Applied and Environmental Microbiology***, v 73, n 20, p. 6508-6518, 2007.

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

MURAKAMI T.H.; ZIMMERMAN A.M. DNA synthesis in Tetrahymena: a pressure study. ***Cytobios***, v. 7, p. 171-181, 1973.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; GROENC, W.; DOBRINSKY, J. R.; TIAN, X. C.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM and SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. ***Theriogenology***, v.62. p.437-49, 2004.

NEDAMBALE, T.L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X.C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. ***Animal Reproduction Science***, v. 93, p. 61-75, 2006.

O'NEILL, L.; PAYNTER, S.J; FULLER, B.J. Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. ***Cryobiology***, v.34, p.295-301, 1997.

PALASZ, A.T.; ALKEMADE, S.; MAPLETOFT, R.J. The use of sodium hyaluronate in freezing media for bovine and murine embryos. ***Cryobiology***, v.30, p. 172-178, 1993.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. ***Biotechnology Advances***, v.14, p.127-149, 1996.

PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A.; BARBOSA CANOVAS, G.V.; WELTI-CHANES, J.; SWANSON, B.G. Kinetic analysis of *Zygosaccharomyces bailii* inactivation by high hydrostatic pressure. **Lebensm.-Wiss. U. Technology**, v. 30, p. 703-708, 1997.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.15, p.651-658, 2000.

PETTIT, W.H.Jr. Commercial freezing of bovine embryos in glass ampules. **Theriogenology**, v.23, p.13, 1985.

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

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, 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**, v.87, p.143–150, 2005a.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 162-163, 2005b.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; KÚTVOLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, p. 181-182, 2007.

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

PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryo following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal Reproduction Science**, v.58, p. 9-22, 2000.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.

RALL, W.F. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes and ovarian tissues: current issues and progress. In: **Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals**. (Eds.: Wolf, DP and Zelinski-Wooten, M), Humana Press, Totawa, NJ 173-187, 2001.

RIHA, J.; LANDA, V.; KNEISSL, J.; MATUS, J.; JINDRA, J.; KLOUCEK, Z. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. **Zivoc. Vir**, v. 36, p. 113–120, 1991.

RITZ, M.; THOLOZAN, J.L.; FEDERIGHI, M.; PILET, M. F. Physiological damages of *Listeria monocytogenes* treated by high hydrostatic pressure. **International Journal Food Microbiology**, v. 79, p. 47-53, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, J.; 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, p236–243, 2003.

ROCA, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; VÁZQUEZ, J.M.; BOLARÍN, A.; HERNÁNDEZ, M.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ, E.A. Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 62, p. 261-275, 2006.

RUMPF, R.; DE BEM, R.A.; PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; SOUSA, R.V.; ROSAS, C.A.; SILVA, A.E.D.F.; ZANENGA, C.A.; PEREIRA, D.C.; PIVATO, I.; MELO, L.M., SILVEIRA, L.L. **Manual de Transferência e Micromanipulação de Embriões nas Espécies Bovina e Equina**. Embrapa, 2004.

SAHARA, T.; GODA, T.; OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 50015-50021, 2002.

SCHILLING, B.; MURRAY, J.; YOO, C.B.; ROW, R.H.; CUSACK, M.P.; CAPALDI, R.A.; GIBSON, B.W. Proteomic analysis of succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome *c* reductase (Complex II and III) isolated by immunoprecipitation from bovine and mouse heart mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1762, p. 213–222, 2006.

SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, p. 122-131, 1984.

SCHUSTER, B.; SLEYTR, U. B. The effect of hydrostatic pressure on S-layer supported lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1563, p. 29-34, 2002.

SEIDEL, G.E. Modifying oocyte and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p. 228-235, 2006

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFFSON, H.; GUSTARI, S.; BARTOLOME, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of in vitro and in vivo produced embryos. **International Congress on Animal Reproduction**; v.3, p.1333-1335, 1992.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Biochemical Science**, v. 26, p. 612-618, 2001.

SONNA, L.A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S.L.; LILLY, C.M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725-1742, 2002.

SONOIKE, K.; SETOYAMA, T.; KUMA, Y.; SHINNO, T.; FUKUMOTO, K.; HIHARA, M. In: **High Pressure Bioscience and Food Science** (ed Hayashi, R.) Sanei, Kyoto, p. 213–219, 1993.

SPILIMBERGO, S.; ELVASSORE, N.; BERTUCCO, A. Microbial inactivation by high pressure. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 55-63, 2002.

STOJKOVIC, M.; KÖLLE, S.; PEINL, S.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; THOMPSON, J. G.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H-D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Effects of high concentration of hialuronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen – thawed bovine embryos produced in vitro. **Society for Reproduction and Fertility**, v.1, p.141-153, 2002.

SUCCU, S.; LEONI, G.G.; BEBBERE, D.; BERLINGUER, F.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; MADEDDU, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 1337–1344, 2007.

TAKAHASHI, K.; KUBO, T.; KOBAYASHI, K.; IMANISHI, J.; TAKIGAWA, M.; ARAI, Y.; HIRASAWA, Y. Hydrostatic pressure influences mRNA expression of transforming growth factor-beta 1 and shock protein 70 in condrocyte-like cell line. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, p. 150-158, 1997.

TAUC, P.; MATEO, C.R.; BROCHON, J. C. Investigation of the effect of high hydrostatic pressure on proteins and lipidic membranes by dynamic fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 103-115, 2002.

THIBIER, M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, n. 25, p. 15-20, 2007.

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

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, p.53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C. H.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; VAN ROOSENDAAL, E.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human Reproduction**, v.18, p.1504-11, 2003.

VAN DE VOSSENBERG, J.L.; UBBINK-KOK, T.; ELFERINK, M.G.; DRIESSEN, A.J.; KONINGS, W.N. Ion permeability of the cytoplasmatic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. **Molecular Microbiology**, v. 18, p. 925-932, 1995.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A.R.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v.38; p905-919, 1992.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35(Supl. 3) p. 915-924, 2007.

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

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 Environmental Microbiology**, v. 68, p. 456-463, 2002.

WERLICH DE, CRUZ FB, BUNN S, WENTZ KC, FRANCESCOTTO M, BARRETA MH, MEZZALIRA A. Embriões bovinos produzidos in vitro e vitrificados com diferentes crioprotetores, utilizando nitrogênio em atmosfera normal ou vácuo. **In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Goiânia, 2005.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. **Science**, v.178, p.411-414, 1972.

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

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

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

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, p.3185-3194, 1999.

WRIGHT, J.M. Commercial freezing of bovine embryos in straws. **Theriogenology**, v.23, p.17, 1985.

XU, J.; GUO, Z.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYÉS, A.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of

vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2510-2518, 2006.

YAGER, P.; CHANG, E. L. Destabilization of a lipid non-bilayer phase by high pressure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 731, p. 491-494, 1983.

YAMADA, C.; CAETANO, H.V.; SIMÕES, R.; NICACIO, A.C.; FEITOSA, W.B.; ASSUMPÇÃO, M.E.; VISINTIN, J.A. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.

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

YANO, Y.; NAKAYAMA, A.; YOSHIDA, K. Distribution of polyunsaturated fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2572-2577, 1997.

YAVIN, S.; AROYO, A.; ARAV, A. Embryo cryopreservation of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, v. 24, p. 797-804, 2009.

YAYANOS, A.A.; POLLARD, E.C. A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in Escherichia coli. **Biophysical Journal**, v. 9, p. 1464-1482, 1969.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 35-42, 1999.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA VITRIFICAÇÃO E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo definir os melhores parâmetros para o uso da pressão hidrostática como ferramenta no processo de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* e avaliar ultraestruturalmente o efeito causado pela pressão hidrostática e pelo procedimento de criopreservação nestes embriões. Primeiramente, foi avaliado a tolerância de blastocistos após serem submetidos a diferentes níveis de pressão e tempo. Na segunda parte do estudo, o pré-tratamento com pressão foi combinado ao protocolo de vitrificação. Definido o melhor parâmetro, este foi utilizado na terceira etapa, que foi a avaliação ultraestrutural do pré-tratamento com pressão e do processo de vitrificação nos embriões. Nossos resultados indicaram que a pressurização de embriões em 80 MPa passou a ser deletéria para o desenvolvimento embrionário. Mas o uso da pressão no nível de 60 MPa por 1 hora promoveu um incremento na taxa de eclosão dos embriões após a vitrificação comparado ao grupo apenas vitrificado (79% vs 66%). Ultraestruturalmente embriões submetidos à pressão apresentavam maior quantidade de microvilosidades e aumento de mitocôndrias tipo *hooded* que os embriões controle. No grupo de embriões vitrificados após a pressão observou-se uma maior quantidade de núcleos por área de MCI quando comparados ao grupo apenas vitrificado. Este trabalho demonstrou que embriões bovinos PIV são sensíveis à pressão hidrostática a partir de 80 MPa. Mas também demonstrou que a aplicação de determinados níveis de pressão hidrostática antes da vitrificação podem promover um efeito de proteção cruzada, melhorando as taxas de re-expansão e eclosão dos embriões. A pressão promoveu alterações na ultraestrutura dos embriões, que podem estar relacionadas a esta melhora nos resultados após a vitrificação.

Palavras Chave: pressão hidrostática, ultraestrutura, vitrificação.

2 ABSTRACT

The aim of this work was to define parameters for the use of hydrostatic pressure in bovine embryos vitrification protocol and to evaluate the pressure effect on these embryos ultrastructurally. First, the behavior of blastocysts was studied at different pressure conditions. In the second part of the study, pressure treatments were combined with a vitrification protocol. The best parameter defined on these previous tests was used on third experiment, which was the ultrastructural evaluation of the pressure before vitrification process in bovine embryos. Our results indicated that embryo pressurization at 80 MPa had become deleterious to embryonic development. But pressure at 60 MPa level for 1 hour improved hatching rate after embryo vitrification compared to the only vitrified ones (79% vs 66%). Ultrastructurally, embryos submitted to 60 MPa for 1 hour pressure had greater amount of microvilli and increased mitochondria hooded that control embryos. In the group of vitrified embryos after pressure there was a greater quantity of nucleous per area when compared to the group only vitrified. This study demonstrated that bovine IVP embryos are sensitive to hydrostatic pressure at 80 MPa, but also demonstrated that the application of certain levels of hydrostatic pressure before vitrification promoted the effect of cross-protection, improving embryos re-expansion and hatching rates. The pressure promoted changes in embryo ultrastructure, which may be related to the improvement in results after vitrification.

Keywords: hydrostatic pressure, ultrastructure, vitrification.

3 INTRODUÇÃO

Apesar do enorme crescimento obtido pela técnica de produção *in vitro* de embriões nos últimos anos, com melhoras nas taxas de produção de embriões e prenhez, o sucesso da criopreservação destes embriões continua sendo um obstáculo a ser vencido (Vajta & Nagy, 2006; Gómez et al., 2008b). Embriões produzidos *in vitro* apresentam uma série de características diferentes daqueles produzidos *in vivo*: maior quantidade de lipídeos, menor grau de compactação (Van Soom et al., 1992), disco embrionário geralmente menor (Iawsaki et al., 1990), junções incompletas entre células do trofoblasto e botão embrionário (Shamsuddin et al., 1992), entre outras. Estas diferenças podem explicar, em parte, a maior sensibilidade dos embriões produzidos *in vitro* ao processo de criopreservação.

Trabalha-se em duas vertentes para solucionar esse problema, uma voltada na melhoria da qualidade do embrião, passando por: a) modificações nas condições de cultivo para melhor mimetizar o microambiente encontrado *in vivo*, com adição de fatores de crescimento, hormônios, anti-oxidantes e outras moléculas regulatórias (Nedambale et al., 2006; Block et al., 2009); b) uso de meios definidos, sem a presença de soro fetal bovino (SFB) (Nedambale et al., 2004, Gómez et al., 2008a), sendo substituído por álcool polivinílico ou ácido hialurônico (Stojkovic et al., 2002); ou c) substituindo o SFB por albumina sérica bovina (BSA) (Rizos et al., 2002). Nos trabalhos em que se realiza a substituição do SFB observa-se a uma melhor qualidade nos embriões produzidos, contudo com uma menor taxa de produção de embriões.

Outra vertente seria a modificação do sistema de criopreservação. A vitrificação tem sido descrita como método de eleição para a criopreservação de embriões PIV, essa técnica usa altas concentrações de crioprotetores e altas taxas de resfriamento. Vários protocolos de vitrificação foram desenvolvidos: grades de cobre de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), técnica de open pulled straw – OPS (Vajta et al., 1998), cryoloop (Lane et al., 1999), microgotas (Papis et al., 2000), superfície sólida – SSV (Dinnyes et al., 2000), grades de nylon (Matsumoto et al., 2001), sistema hemi-straw (Vanderzwalmen et al., 2003), entre outros.

Contudo, resultados com taxas de prenhez constantes ainda não foram alcançados e novas alternativas são buscadas pra promover um melhor resultado no procedimento de criopreservação de embriões PIV.

O uso da pressão hidrostática no processo de criopreservação de embrião é uma idéia nova, embora Fahy et al., em 1984, tenham mencionado que o aumento da pressão hidrostática poderia facilitar o processo de vitrificação, mas também consideraram que isso teria pouca aplicabilidade prática para biologia reprodutiva. Em 2005, Pribenszky et al., contudo, observaram significativa melhora na sobrevivência de embriões murinos pós descongelamento, previamente submetidos a pressão hidrostática. Além da utilização em embriões murinos, à pressão hidrostática apresentou melhora na criotolerância de oócitos e sêmen suínos (Kuo et al., 2007; Pribenszky et al., 2008).

Pressão hidrostática (PH) é um importante fator ambiental apresentando grande influência sobre funções biológicas e na viabilidade de organismos. A pressão hidrostática funciona como fator estressante na célula, dependendo do tempo de exposição, amplitude da pressão e temperatura utilizada pode provocar danos irreversíveis e morte celular (Abe, 2004). Contudo, vários trabalhos mostram que a utilização de PH subletal promove um aumento na síntese de proteína de choque, “heat shock” (HSP) e “cold shock” (CSP) em bactéria (Welch et al., 1993), fungo (Fernandes et al., 2004, Miura et al., 2006) e em células de mamíferos (Kaarniranta et al., 1998). Essas proteínas tem funções variadas na célula e podem promover uma proteção a célula a um novo estresse, como por exemplo, a criopreservação.

O emprego da pressão hidrostática seria uma alternativa para promover uma condição bioquímica, na célula, que auxiliasse a sobrevivência do embrião ao procedimento de criopreservação. O presente trabalho teve como objetivo definir os melhores parâmetros para o uso da pressão hidrostática como ferramenta no processo de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* e avaliar ultraestruturalmente o efeito causado pela pressão hidrostática e pelo procedimento de criopreservação nestes embriões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção *In vitro* de Embriões

Os meios utilizados em todas as etapas da produção *in vitro* de embriões foram produzidos pela Nutricell® Nutrientes Celulares Ltda (Campinas, SP, Brasil).

4.1.1 Coleta e seleção de ovócitos

Ovários de vacas mestiças foram coletados de abatedouros e transportados em solução salina 0,9% a uma temperatura de 35°C até o laboratório. Os folículos de 2 a 8 mm foram puncionados usando agulha 18G e seringa. O líquido aspirado foi vertido num filtro de coleta de embriões e lavados com solução tampão de fosfato (PBS - Nutricell®) e então colocados numa placa de petri de 100mm (TPP®). A procura e seleção dos complexos cumulus ovócitos (CCO) foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon – SMZ 650) e somente os CCOs de qualidade I e II foram selecionados para os experimentos, sendo avaliados pela presença e quantidade de células do cumulus e pela coloração e característica do ooplasma.

4.1.2 Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 20-25 para gotas de 150µl de meio de maturação (MIV – Nutricell®) em placas de petri de 60 mm (TPP®). As gotas de MIV eram cobertas com óleo de parafina (360 Medical Fluid 350 CST – DOW CORNING®) e previamente ao uso eram estabilizadas por duas horas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Os CCOs permaneciam por um período de 22 horas em maturação.

4.1.3 Fecundação *in vitro*

Após o período de maturação, os CCOs foram lavados e transferidos para gotas de 150µl de meio de fecundação, FEC Nutricell[®]. O meio de fecundação era suplementado com penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) e heparina.

Em todos os experimentos foi utilizado sêmen do mesmo reprodutor e da mesma partida. A seleção espermática foi realizada utilizando a técnica de gradiente de percoll, sendo preparado com 1 ml de percoll 45% e 1 ml de percoll 90%. O sêmen era descongelado em banho-maria a 36°C, e depositado cuidadosamente sobre o gradiente, previamente preparado, em seguida, centrifugado a 700g por 15 minutos a uma temperatura de 30°C. O pellet formado era retirado e ressuspensionado em 1 ml de meio de capacitação (CAP - Nutricell[®]) e centrifugado por mais 5 minutos nas mesmas condições. O meio de capacitação era retirado e o pellet ressuspensionado em meio de fecundação. A concentração final da dose inseminante/gota era de 1×10^6 espermatozoides/ml. Ovócitos e espermatozoides foram co-incubados por 15-18 horas em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O dia da fecundação foi considerado D0.

4.1.4 Cultivo *in vitro*

As 15-18 horas pós-inseminação (*pi*), os possíveis zigotos eram transferidos para o meio fluido sintético do oviduto (SOF - Nutricell[®]). As placas de cultivo eram preparadas com gotas de 150µl cobertas com óleo de parafina (360 Medical Fluid 350 CST – DOW CORNING[®]) e estabilizadas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Os embriões foram avaliados em D2 para clivagem e em D6 e D7 para observação da taxa de blastocisto. No sétimo dia de cultivo, os embriões foram classificados de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS - Robertson e Nelson, 1998), apenas blastocistos grau 1 foram utilizados nos experimentos.

4.2 Pressão Hidrostática

No sétimo dia de cultivo os embriões foram retirados do SOFaaci e lavados em meio de manutenção (TQC, AB Technology, Brasil) aquecido a 32°C. Estes embriões foram envasados em palhetas de 0,25 ml, sem presença de bolhas e seladas com lacradores de palhetas de plástico. Estas palhetas foram colocadas dentro da câmara de pressão hidrostática (Cryoinnovation Ltda, Budapeste, Hungria) pré-aquecida e cheia de água como meio de pressão. Embriões foram submetidos à pressão hidrostática de 40, 60 e 80 MPa por 30 ou 60 minutos.

4.3 Vitrificação

Os embriões foram vitrificados segundo metodologia de Vajta et al. (1998). Esta técnica utiliza uma palheta especial denominada de “open pulled straw” (OPS - Minitub[®], Brasil). Duas soluções de vitrificação foram utilizadas, a solução de vitrificação 1 (SV1) era composta de TCM 199 com sais de Hank’s (Gibco BRL[®]) suplementado com 20% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma[®]) e 10% de etilenoglicol (EG - Merck[®]). A solução de vitrificação 2 (SV2) apresentava uma concentração de 20% de DMSO, 20% de EG e 0,5 M de sacarose (Sigma[®]).

Para o processo de vitrificação, os embriões foram mantidos em meio TCM 199 com sais de Hank’s (Gibco BRL[®]) suplementado com 20% de SFB, meio de manutenção e durante todo o processo os meios eram mantidos entre 38 e 39°C. Grupos de 3 a 4 embriões eram retirados do meio de manutenção e expostos a SV1 por 1 minuto. Os embriões eram retirados da SV1 com o auxílio de um pipetador automático e transferidos para uma gota de 20 µl de SV2, lavados e retirados com um volume de 2 µl, fazendo uma nova gota de SV2. Com os embriões na gota de 2 µl, a ponta da OPS era encostada na gota e o meio entrava na OPS por capilaridade juntamente com os embriões, a palheta era, então, mergulhada diretamente em nitrogênio líquido (N₂). O tempo do início da exposição dos embriões à SV2 até a imersão no N₂ não podia ultrapassar os 20 segundos.

4.4 Desvitrificação

Os embriões vitrificados permaneceram no N₂ por pelo menos 1 hora. O processo de desvitrificação foi realizado dando 3 banhos com soluções que apresentavam quantidade decrescente de sucrose (Vajta et al., 1998). A OPS era imersa na primeira solução, TCM 199 suplementado com 20% de SFB e 0,5M de sucrose, e os embriões permaneciam por 5 minutos, depois eram passados para segunda solução, TCM 199 suplementado com 20% de SFB e 0,25M de sucrose por mais 5 minutos e finalmente em solução de manutenção, TCM 199 suplementado com 20% de SFB, onde também eram mantidos por 5 minutos. Todas as soluções foram pré-aquecidas na estufa e se mantinham entre 38 e 39°C durante o processo de desvitrificação.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os embriões foram fixados em solução de Karnovsky (5 mM de CaCl₂, 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído, 3% de sacarose em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2) à temperatura ambiente por 3 horas e mantidos no tampão cacodilato 0,1M a 4°C até o processamento. Os embriões foram pós-fixados em solução de 2% de tetróxido de ósmio, 1,6% de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio a 0,1M por 1 hora. As amostras então foram contrastadas com acetato de uranila aquoso 0,5% por 3 horas, desidratadas em acetona e incluídas em resina Spurr. Os cortes semi-finos (2µm) foram corados com azul de toluidina, examinados ao microscópio ótico objetivando detectar a presença de massa celular interna. Os cortes ultrafinos (70 nm) foram coletados em grades de cobre e avaliados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011C).

4.6 Delineamento Experimental

4.6.1 Experimento 1 – Efeito da pressão hidrostática em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Neste experimento foi avaliado o efeito da pressão hidrostática na sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*. Para tal, embriões foram submetidos à pressão hidrostática de 40, 60 e 80 MPa, por um período de 30 minutos ou 1 hora. Após a pressão, os embriões foram avaliados pela compactação ou não da blastocele e, então, retornavam para o sistema de cultivo e eram avaliados 2, 24, 48 e 72 horas após a pressão.

Foram utilizados como grupos controles, embriões que foram mantidos na incubadora (grupo controle incubadora) e embriões que foram retirados e colocados nas mesmas condições dos embriões mantidos na câmara de pressão hidrostática, contudo permaneceram em banho-maria a 32°C (grupo controle bancada).

Um total de 526 embriões foram utilizados, sendo 317 divididos entre os tratamentos de pressão hidrostática, 134 no grupo controle incubadora e 75 no grupo controle bancada.

4.6.2 Experimento 2 – Efeito de diferentes níveis e tempos de pressão hidrostática antes da vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Neste experimento foi avaliado o efeito da pressão hidrostática na taxa de sobrevivência dos embriões após o procedimento de vitrificação. Foram utilizados os mesmos parâmetros de pressão e tempo do experimento 1.

Embriões foram divididos nos seguintes grupos:

- 1 – (controle) – embriões mantidos na incubadora;
- 2 – (vitrificados incubadora) – embriões foram mantidos na incubadora até o momento da vitrificação;

3 – (vitrificados bancada) – embriões foram retirados da incubadora, colocados em meio de manutenção e mantidos em banho-maria no mesmo período que embriões foram mantidos na câmara de pressão até o momento da vitrificação;

4 – (pressão e vitrificação) – embriões submetidos a pressão de 40, 60 e 80 MPa por 30 e 60 minutos, após esse período foram vitrificados.

Aqueles embriões que sofreram compactação após a pressão hidrostática foram vitrificados, desvitrificados e cultivados separadamente aos que não sofreram compactação e avaliados quanto a taxa de re-expansão e eclosão após 4, 24, 48 e 72 horas.

4.6.3 Experimento 3 – Avaliação ultraestrutural de embriões bovinos submetidos à pressão hidrostática antes da vitrificação.

Para avaliação das características ultraestruturais, os embriões foram divididos em 4 grupos:

- 1- Grupo controle;
- 2- Embriões submetidos apenas à vitrificação
- 3- Embriões submetidos apenas à pressão hidrostática;
- 4- Embriões vitrificados após serem submetidos à pressão hidrostática.

Os parâmetros de pressão hidrostática (nível e tempo) usados neste experimento foram definidos no Experimento 2, apenas o grupo que apresentou melhor resultado pós-descongelamento foi avaliado ultraestruturalmente, 60 MPa por 1 hora.

O número de embriões avaliados em cada grupo foi: 5 no grupo controle, 4 no grupo vitrificado, 5 no grupo pressão hidrostática e 6 no grupo submetido a pressão e vitrificado. Após pressão (grupo 3) ou desvitrificação (grupos 2 e 4), os embriões foram mantidos na incubadora em meio de cultivo por 4 horas, aqueles que apresentavam características morfológicas normais, avaliados por estereomicroscópio, foram fixados para microscopia eletrônica de transmissão. Embriões do grupo 1 foram mantidos na incubadora e fixados no mesmo momento que os demais grupos.

Estes embriões foram avaliados de forma descritiva quanto às características observadas em cada grupo.

4.7 Análise Estatística

Os dados relativos à taxa de re-expansão e eclosão dos embriões nos diferentes tratamentos, nível, tempo de pressão hidrostática e o efeito de compactação da blastocele foram analisados pelo teste Chi-quadrado (χ^2). Foram consideradas significativas diferenças com $P < 0,05$.

Avaliações relativas à microscopia eletrônica foram apresentadas de forma descritiva nos resultados.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento 1

Na avaliação de tolerância dos embriões bovinos à pressão hidrostática foram utilizados 526 embriões divididos entre os diferentes tratamentos e grupos controle, com 3 repetições para cada tratamento. Sendo considerado como parâmetros de avaliações as taxas de re-expansão e eclosão das estruturas, mediante os fatores tratamento (diferentes níveis de pressão e tempo) e estágio embrionário (B1 vs. Bx).

Os embriões mantidos na incubadora (controle) e no banho-maria (controle bancada), apresentaram taxa de re-expansão semelhante a todos os grupos que foram submetidos à pressão hidrostática (Tabela 2.1).

Avaliando a taxa de eclosão, com 24 horas de cultivo, os embriões submetidos a 60 MPa por 30 minutos e 60 MPa por uma hora apresentaram uma maior taxa de eclosão quando comparados ao grupo controle. Com 48 horas, apenas o tratamento 60 MPa por 1 hora manteve essa diferença na taxa de eclosão. Contudo, após 72 horas, a taxa de eclosão não diferiu entre os tratamentos, exceto nos embriões submetidos à pressão de 80 MPa por 1 hora, onde a taxa de eclosão foi menor (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Avaliação do efeito da tolerância de embriões bovinos a pressão hidrostática.

<i>Tratamento</i>	<i>N</i>	2h pós-pressão (%)		24h pós-pressão (%)		48h pós-pressão (%)		72h pós-pressão (%)	
		<i>Total</i>	Re-expansão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão
Controle	134		94,78 ^a	97,76 ^a	42,5 ^a	97,76 ^a	79,1 ^a	98,51 ^a	93,3 ^a
Cont. Bancada	75		94,67 ^a	94,67 ^a	53,33 ^{a,b}	98,67 ^a	88 ^{a,b}	98,67 ^a	89,33 ^a
40MPa-30min	36		100 ^a	100 ^a	55,6 ^{a,b}	100 ^a	83,3 ^{a,b}	100 ^a	91,67 ^a
40MPa-60min	48		100 ^a	95,83 ^a	35,42 ^a	100 ^a	85,42 ^{a,b}	97,92 ^a	91,67 ^a
60MPa-30min	59		98,31 ^a	98,31 ^a	64,4 ^b	100 ^a	83,05 ^{a,b}	98,31 ^a	91,53 ^a
60MPa-60min	57		100 ^a	100 ^a	57,9 ^b	98,25 ^a	89,47 ^b	98,25 ^a	96,49 ^a
80MPa-30min	57		94,74 ^a	92,98 ^a	56,1 ^{a,b}	96,49 ^a	82,46 ^{a,b}	96,49 ^a	91,2 ^a
80MPa-60min	60		96,67 ^a	98,33 ^a	40 ^a	95 ^a	75 ^a	95 ^a	80 ^b

^{a, b} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente (P<0.05).

Para melhor compreensão da resposta aos tratamentos propostos, avaliaram-se os mesmos parâmetros (re-expansão e eclosão) quanto aos estágios embrionários de desenvolvimento (Bl e Bx).

Nota-se, na tabela 2.2, que a taxa de re-expansão entre embriões Bl e Bx se manteve igual em todos os momentos avaliados. Quanto à eclosão, nota-se que embriões Bx apresentam uma maior tolerância à pressão, já que estes não apresentaram diferença na taxa de eclosão quando comparados com o grupo controle após 80 MPa por 1 hora, já os blastocistos apresentaram uma diminuição na taxa de eclosão a partir de 24 horas após essa pressão, que se manteve até 72 horas.

Além disso, fica evidente o efeito positivo do tratamento 60 MPa por 1 hora em embriões Bl. Apresentando maior velocidade na taxa de eclosão e após 48 horas foi o único tratamento que não diferiu na taxa de eclosão quando comparado aos embriões Bx.

Tabela 2.2 – Avaliação da tolerância de embriões no estágio de Bl e Bx nos diferentes níveis de pressão hidrostática.

<i>Estágio</i>	<i>Tratamento</i>	<i>N</i>	2h pós- pressão (%)		24h pós- pressão (%)		48h pós- pressão (%)		72h pós- pressão (%)	
			<i>Total</i>	Re-expansão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão
Blastocisto	Controle	47	89,36 ^a	95,74 ^a	25,53 ^{d,e}	97,87 ^a	68,1 ^{c,d}	97,87 ^a	91,5 ^{a,b}	
	Cont Bancada	30	93,33 ^a	93,33 ^a	26,67 ^{d,e}	96,67 ^a	76,67 ^{b,c}	96,67 ^a	80 ^b	
	40MPa-30min	15	100 ^a	100 ^a	26,67 ^{d,e}	100 ^a	66,67 ^{c,d}	100 ^a	86,67 ^{a,b}	
	40MPa-60min	19	100 ^a	89,47 ^a	15,79 ^e	100 ^a	78,95 ^{b,c}	94,74 ^a	84,21 ^{a,b}	
	60MPa-30min	22	100 ^a	95,45 ^a	27,27 ^{d,e}	100 ^a	63,64 ^{c,d}	95,45 ^a	86,36 ^{a,b}	
	60MPa-60min	22	100 ^a	100 ^a	36,36 ^{c,d,e}	95,45 ^a	90,91 ^a	100 ^a	95,45 ^a	
	80MPa-30min	21	90,5 ^a	95,24 ^a	33,33 ^{c,d,e}	95,24 ^a	76,2 ^{b,c}	95,24 ^a	85,71 ^{a,b}	
	80MPa-60min	24	95,83 ^a	95,83 ^a	4,17 ^f	87,5 ^a	50 ^d	91,67 ^a	54,17 ^c	
Blastocisto expandido	Controle	87	97,7 ^a	98,85 ^a	51,72 ^{b,c}	97,7 ^a	85,06 ^{a,b}	98,85 ^a	94,25 ^a	
	Cont. Bancada	45	95,56 ^a	95,56 ^a	71,11 ^a	100 ^a	95,56 ^a	100 ^a	97,78 ^a	
	40MPa-30min	21	100 ^a	100 ^a	76,19 ^a	100 ^a	95,24 ^a	100 ^a	95,24 ^a	
	40MPa-60min	29	100 ^a	100 ^a	48,28 ^{b,c,d}	100 ^a	89,66 ^a	100 ^a	96,55 ^a	
	60MPa-30min	37	97,3 ^a	94,6 ^a	86,5 ^a	100 ^a	94,6 ^a	100 ^a	94,6 ^a	
	60MPa-60min	35	100 ^a	100 ^a	71,43 ^a	100 ^a	94,3 ^a	100 ^a	97,14 ^a	
	80MPa-30min	36	97,22 ^a	91,67 ^a	69,44 ^{a,b}	97,22 ^a	86,11 ^{a,b}	97,22 ^a	94,44 ^a	
	80MPa-60min	36	97,22 ^a	100 ^a	63,69 ^{a,b}	100 ^a	91,67 ^a	97,22 ^a	94,44 ^a	

^{a, b, c, d, e} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente (P<0.05).

Um evento observado após a pressão hidrostática é a compactação da blastocele (Figura 2.1), avaliando esse efeito nos diferentes tratamentos, fica evidente que é dependente do nível e tempo de pressão hidrostática em que os embriões são submetidos, aumentando a porcentagem de embriões compactados quando se aumenta a pressão e/ou o tempo de exposição (Figura 2.2). E a partir de 60 MPa por 60 minutos praticamente todos os embriões sofreram contração da blastocele.

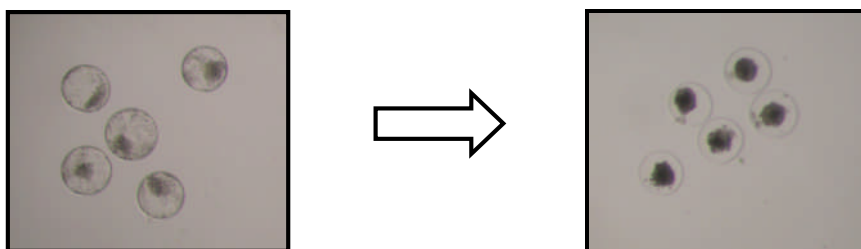


Figura 2.1 – Embriões submetidos a 60 MPa por 1 hora, mostrando a compactação da blastocele.

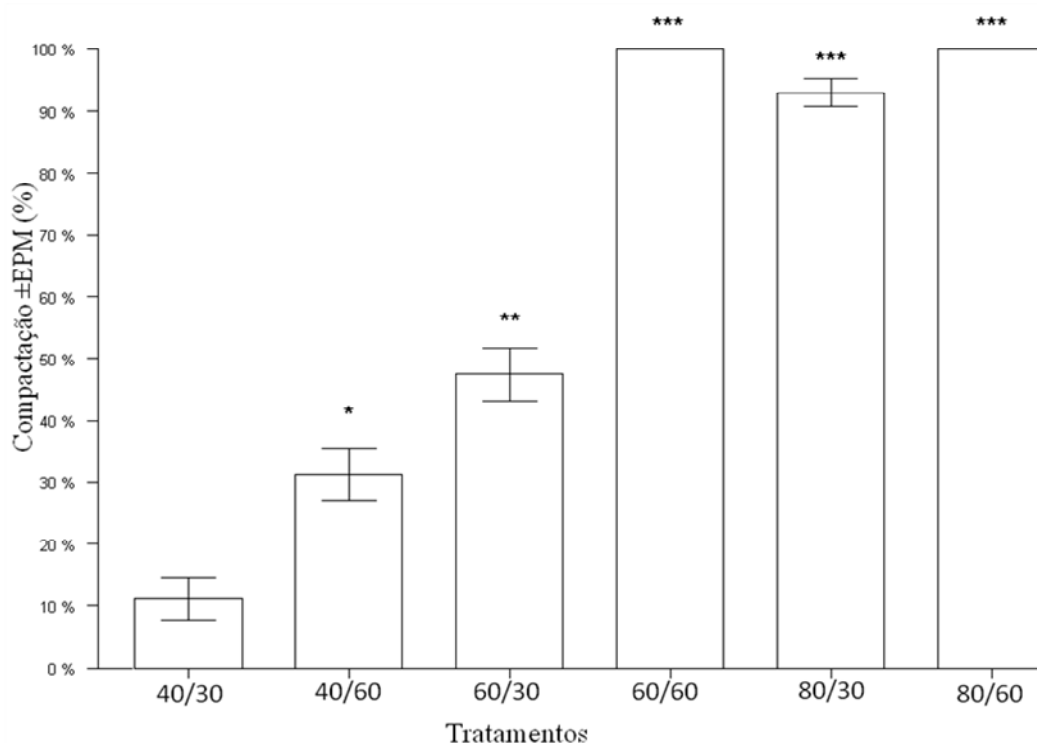


Figura 2.2 – Taxa de compactação da blastocele dos embriões após serem submetidos à pressão hidrostática (diferenças do grupo controle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.2 Experimento 2

Neste experimento foram avaliados os mesmos parâmetros do experimento 1, porém após a pressão hidrostática os embriões foram vitrificados. Foram utilizados 898 embriões divididos entre os diferentes tratamentos.

Na tabela 2.3 estão apresentados os resultados, todos os tratamentos demonstraram uma menor taxa de eclosão quando comparados com o grupo não vitrificado, onde a taxa de eclosão após 72 horas ficou próxima a 90%.

Porém, quando compararam-se os embriões controle vitrificados com aqueles submetidos à pressão por 40 ou 60 MPa, independente do tempo empregado, observou-se um efeito positivo na taxa de eclosão após 72 horas (Tabela 2.3). Sendo que os tratamentos 40 e 60 MPa por 60 minutos diferiram significativamente do grupo controle vitrificado ($p < 0,05$) e do grupo vitrificado bancada ($p < 0,01$).

Já os embriões submetidos a 80 MPa apresentaram uma menor taxa de eclosão que o grupo controle e os submetidos a 40 e 60 MPa. E o uso da pressão de 80 MPa por 1 hora teve taxa de re-expansão e eclosão piores que todos os outros tratamentos.

Tabela 2.3 – Taxa de re-expansão e eclosão de embriões submetidos a diferentes níveis de pressão hidrostática e tempo, e vitrificados.

<i>Tratamento</i>	<i>N</i>	4h pós- pressão(%)		24h pós- pressão (%)		48h pós- pressão (%)		72h pós- pressão (%)	
		Re- expansão	Re- expansão	Eclosão	Re- expansão	Eclosão	Re- expansão	Eclosão	
Não vitrificado	87	96,25 ^a	94,25 ^a	24,13 ^{a,b}	96,55 ^a	65,5 ^a	100 ^a	87,35 ^a	
Vitrificado	216	57,87 ^c	70,83 ^b	23,61 ^{a,b}	81,48 ^b	52,31 ^b	83,8 ^{b,c}	66,2 ^c	
Vitri. Bancada	182	65,38 ^{b,c}	76,92 ^b	19,23 ^{a,b}	76,92 ^b	39,01 ^c	78,57 ^c	59,34 ^c	
40MPa-30min	47	74,47 ^b	82,98 ^b	25,53 ^{a,b}	87,23 ^b	55,32 ^b	91,49 ^b	72,34 ^{b,c}	
40MPa-60min	84	75 ^b	73,81 ^b	14,29 ^{b,c}	82,14 ^b	52,38 ^b	88,1 ^b	77,38 ^b	
60MPa-30min	62	61,29 ^{b,c}	75,81 ^b	17,74 ^{a,b}	82,26 ^b	61,29 ^{a,b}	85,48 ^{b,c}	70,97 ^{b,c}	
60MPa-60min	82	69,51 ^{b,c}	81,71 ^b	8,54 ^{c,d}	82,93 ^b	57,32 ^{a,b}	91,46 ^b	79,27 ^b	
80MPa-30min	59	55,93 ^c	71,19 ^b	30,51 ^a	77,97 ^b	45,76 ^{b,c}	76,27 ^{c,d}	59,32 ^c	
80MPa-60min	57	36,84 ^d	56,14 ^c	3,51 ^d	52,63 ^c	26,32 ^c	66,67 ^d	33,33 ^d	

^{a, b} Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente ($P < 0,05$).

O efeito positivo do tratamento usando pressão hidrostática nos níveis de 40 e 60 MPa podem ser observados na tabela 2.4, quando agrupou-se 40 e 60 MPa por 30 minutos e 1 hora. Desta maneira, houve um incremento na taxa de eclosão de 12% quando utilizou-se a pressão hidrostática, num nível tolerante para os embriões, como pré tratamento na vitrificação.

Tabela 2.4 - Avaliação da taxa de eclosão (%) dos embriões vitrificados após serem submetidos à pressão hidrostática. Os resultados foram agrupados nos tratamentos 40 e 60 MPa, 30 minutos e 1 hora, e 80 MPa, 30 minutos e 1 hora.

Tratamento	N	Eclosão pós desvitrificação (%)		
		24 horas	48 horas	72 horas
Não Vitrificado	109	23,8 ^a	66,1 ^a	91,7 ^a
Vitrificado	216	23,6 ^a	52,3 ^b	65,3 ^c
Vitrificado bancada	182	19,2 ^a	39,0 ^c	59,3 ^c
40 e 60 MPa + vitri	261	15,7 ^a	54,8 ^b	77,4 ^b
80 MPa + vitri	116	17,2 ^a	36,2 ^c	46,5 ^d

^{a, b, c, d} Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente (P<0.05).

Quando averiguou-se separadamente Bl e Bx, fica evidente que após a vitrificação, os embriões Bx apresentam maior taxa de eclosão que embriões Bl.

Nos tratamentos 40 MPa por 60 minutos e 60 MPa por 30 ou 60 minutos, para os embriões Bx, ocorreu um aumento na taxa de eclosão em torno de 17% comparado ao controle vitrificado (Tabela 2.5). Já o tratamento de 60 MPa por 60 minutos foi o que resultou na maior taxa de eclosão em embriões Bl (Tabela 2.5), sendo o tratamento de escolha para uso em embriões Bl e Bx.

Tabela 2.5 – Avaliação da criotolerância de embriões nos estágios Bl e Bx nos diferentes níveis de pressão hidrostática e tempo.

<i>Estágio</i>	<i>Tratamento</i>	<i>N</i> <i>Total</i>	4h pós- pressão (%)			24h pós- pressão (%)		48h pós- pressão (%)		72h pós- pressão (%)	
			Re-expansão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão		
Blastocisto	Não vitrificado	43	95,34 ^a	94,25 ^{a,b}	11,62 ^{d,e}	94,25 ^{a,b}	53,5 ^{b,c}	100 ^a	81,4 ^{a,b}		
	Vitrificação	93	61,29 ^{c,d}	64,52 ^{c,d}	16,1 ^{c,d,e}	76,34 ^{c,d}	45,16 ^{c,d}	78,49 ^{c,d}	61,3 ^{c,d}		
	Vitri. bancada	77	57,14 ^d	67,53 ^c	13 ^{c,d,e}	70,13 ^d	32,47 ^{d,e}	71,43 ^{c,d}	58,44 ^{c,d}		
	40MPa-30min	21	66,67 ^{b,c,d}	66,67 ^{c,d}	4,76 ^e	71,43 ^{c,d}	38,1 ^{c,d,e}	80,95 ^{b,c}	66,67 ^{b,c}		
	40MPa-60min	34	67,65 ^{b,c,d}	61,76 ^d	8,82 ^e	73,53 ^{c,d}	50 ^{b,c}	82,35 ^{b,c}	64,71 ^{c,d}		
	60MPa-30min	30	46,67 ^{d,e}	56,67 ^d	3,33 ^e	66,67 ^d	40 ^{c,d,e}	73,3 ^{c,d}	53,33 ^{d,e}		
	60MPa-60min	34	76,47 ^{b,c}	85,29 ^{a,b}	5,88 ^e	82,35 ^{b,c}	50 ^{b,c}	91,18 ^{a,b}	76,47 ^{b,c}		
	80MPa-30min	25	40 ^{e,f}	52 ^d	8 ^e	68 ^d	32 ^{d,e}	76 ^{c,d}	48 ^{d,e}		
	80MPa-60min	25	32 ^f	48 ^d	4 ^e	36 ^e	20 ^e	68 ^{c,d}	32 ^e		
Blastocisto expandido	Não vitrificado	44	97,7 ^a	93,18 ^{a,b}	36,36 ^a	97,72 ^a	79,06 ^a	100 ^a	93,18 ^a		
	Vitrificação	123	55,28 ^{d,e}	75,61 ^{b,c}	29,27 ^{a,b}	85,37 ^{b,c}	57,72 ^b	87,8 ^{a,b}	69,92 ^{b,c}		
	Vitri. bancada	105	71,43 ^{b,c}	83,81 ^b	23,81 ^{b,c}	81,9 ^{b,c}	43,8 ^{c,d,e}	83,81 ^{b,c}	60 ^{c,d}		
	40MPa-30min	26	80,77 ^b	96,15 ^a	42,31 ^a	100 ^a	69,23 ^{a,b}	100 ^a	76,92 ^{b,c}		
	40MPa-60min	50	80 ^b	82 ^b	18 ^{b,c}	88 ^{a,b}	54 ^{b,c}	92 ^{a,b}	86 ^{a,b}		
	60MPa-30min	32	75 ^{b,c}	93,75 ^{a,b}	31,25 ^a	96,88 ^a	81,25 ^a	96,88 ^a	87,5 ^{a,b}		
	60MPa-60min	34	64,58 ^{b,c,d}	79,17 ^{b,c}	10,42 ^{de}	83,33 ^{b,c}	62,5 ^{a,b}	91,67 ^{a,b}	81,25 ^{a,b}		
	80MPa-30min	34	67,65 ^{b,c,d}	85,29 ^{a,b}	47,06 ^a	85,29 ^{b,c}	55,88 ^{b,c}	76,47 ^{c,d}	67,65 ^{b,c}		
	80MPa-60min	32	40,63 ^{e,f}	62,5 ^{c,d}	3,13 ^e	65,63 ^d	31,25 ^{d,e}	65,63 ^d	34,38 ^e		

^{a, b,c,d,e,f} Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.05).

Os grupos de embriões submetidos à pressão de 40 MPa 30 minutos, 40 MPa 60 minutos e 60 MPa 30 minutos apresentavam compactação da blastocele em 15%, 40% e 60% dos embriões, respectivamente (Figura 2.2). Não houve diferença nas taxas de re-expansão e e eclosão entre os embriões que sofreram compactação daqueles que não sofreram (Figura 2.3).

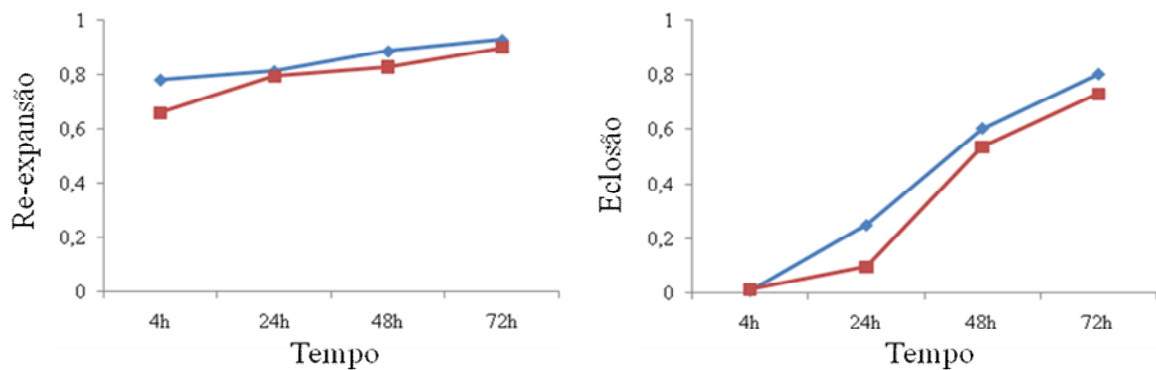


Figura 2.3 – Taxas de re-expansão e eclosão de embriões dos grupos 40 MPa 30 min, 40 MPa 60 min e 60 MPa 30 min, comparando embriões que sofreram compactação (linha vermelha), com aqueles que não sofreram (linha azul).

5.3 Experimento 3

5.3.1 Embriões produzidos *in vitro* – Controle

Os blastocistos mostraram uma clara diferença entre as células do trofoblasto e da massa celular interna (MCI). Esses embriões apresentavam células da MCI cuboidais, com núcleos seguindo a forma da célula e membrana nuclear bem delimitada. Na MCI, espaços intercelulares foram observados, contudo, grande quantidade de prolongamentos celulares estavam presentes, mantendo o contato entre as células (Figura 2.4a). Nestes pontos de encontro entre células vizinhas observou-se junções do tipo gap.

As células do trofoblasto apresentavam-se mais alongadas e com núcleos acompanhando a forma do citoplasma (Figura 2.4b). A justaposição existente entre essas células é maior do que a observada entre as células da MCI, apresentando complexos de junção bem evidentes, como junções de adesão e desmossomos (Figura 2.4c). A membrana das células do trofoblasto voltada para o espaço perivitelínico (polo apical) apresentava microvilosidades dispersas em grande quantidade em algumas regiões (Figura 2.4c). O espaço perivitelínico era estreito e apresentava pequena quantidade de debris. A zona pelúcida estava íntegra e apresentava porosidade na parte exterior em todos os embriões analisados.

Gotas lipídicas de diferentes tamanhos e eletrodensidades foram encontradas tanto nas células do trofoblasto como dispersas nas células da MCI, associadas ou não ao retículo endoplasmático liso (Figura 2.4a).

As células embrionárias apresentavam grande densidade de organelas, sendo mitocôndrias as mais predominantes. Diferentes tipos estavam presentes no citoplasma, as mais evidentes eram alongadas com maior número de cristas atravessando a matriz dividindo-a em diversos compartimentos (Figura 2.4d). Outra organela muito encontrada foi o retículo endoplasmático rugoso (Figura 2.4e), este estava em associação com mitocôndrias, vesículas, gotas de lipídeos ou livres no citoplasma. Além disso, poliribossomos e complexo de Golgi foram observados.

Na região entre a MCI e trofoblasto havia blastômeros extrusos em alguns embriões, apresentando grande quantidade de vesículas, mitocôndrias eletrodensas e aparência degenerada. Corpos apoptóticos e vesículas de degradação foram encontrados em pequena quantidade nas células embrionárias.

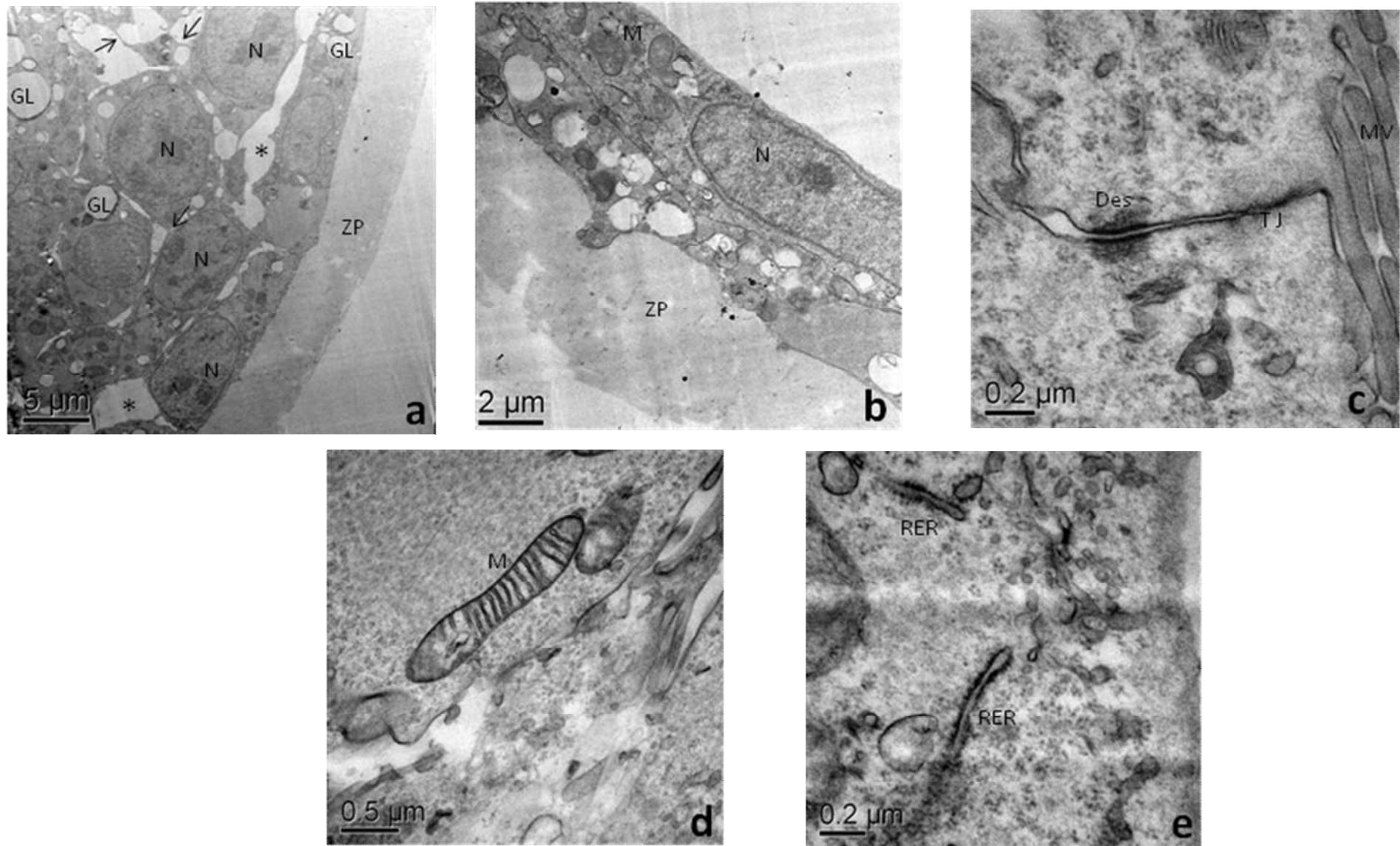


Figura 2.4 – Blastocisto controle. (a) Micrografia eletrônica mostrando a massa celular interna do embrião, com células cubóides, núcleo (N) seguindo a mesma forma. Presença de grande quantidade de gotas lipídicas (GL), observa-se espaços entre as células (asteriscos), mas com prolongamentos celulares (setas) e comunicação com células vizinhas. (b) Célula do trofoblasto com núcleo alongado (N) e mitocôndrias distribuídas pelo citoplasma. (c) Presença de diferentes junções celulares, como junções de adesão (JA) e desmossomos (Des), e microvilosidades (Mv) no pólo apical da célula. (d) Mitocôndria madura com várias cristas atravessando sua matriz (M). (e) Presença de retículo endoplasmático rugoso (RER). (ZP) zona pelúcida.

5.3.2 Embriões submetidos à pressão hidrostática

Após a passagem pela pressão hidrostática os embriões sofreram contração da blastocele, como mostrado na figura 2.1. Após 4 horas de cultivo, momento em que foram retirados para serem fixados, os embriões recuperaram sua forma característica. Contudo, apresentaram uma série de características ultraestruturais diferentes dos embriões controle.

Nas células do trofoblasto foi notado um aumento na quantidade de microvilosidades dispersas por todas as células (Figura 2.5a). Além disso, ficou característico o aumento do espaço perivitelínico com presença de vesículas, lipídeos e debris celular nessa região (Figura 2.5b).

Apesar da contração ocorrida após a pressão hidrostática, as junções entre as células do trofoblasto se mantiveram normais (Figura 2.5c).

As células da MCI apresentavam espaços intercelulares menores que as dos embriões controle, aumentando o contato entre células vizinhas, mas mantiveram os longos prolongamentos citoplasmáticos entre as células.

Outra alteração observada foi na característica das mitocôndrias encontradas neste tratamento, com grande aumento no número de mitocôndrias *hooded* (Figura 2.5d), as quais são caracterizadas pela maior eletrodensidade e um prolongamento formando um capuz (Figuras 2.5e), distribuídas por todas as células embrionárias e bem evidente nas células extrusadas. Observou-se ainda associação entre mitocôndrias *hooded*, gotas lipídicas e retículo endoplasmático (Figura 2.5d).

Contudo, foi observado maior quantidade de corpos apoptóticos nos embriões submetidos à pressão. Esses corpos apoptóticos estavam dispersos no citoplasma, principalmente, das células da MCI (Figura 2.5f).

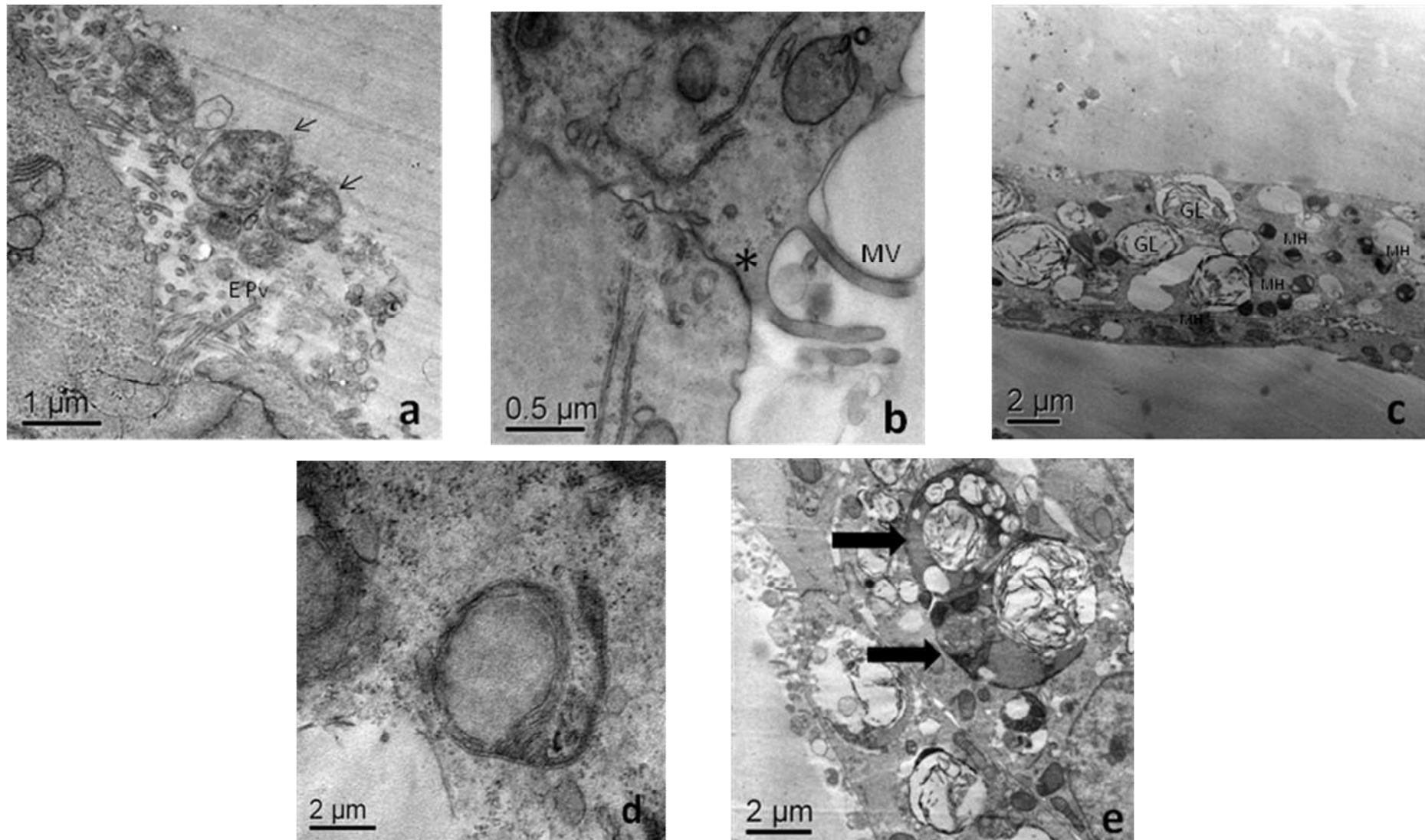


Figura 2.5 – Blastocisto submetido a pressão hidrostática. (a) Aumento da presença de microvilosidades distribuídas nas células do trofoblasto, espaço perivitelínico maior (EPv) com presença de debris celulares (setas pretas). (b) Junções entre duas células do trofoblasto (asterisco). (c) Presença de grande quantidade de mitocôndrias *hooded* (MH) e gotas lipídicas (GL) em associação com retículo endoplasmática. (d) Detalhe de uma mitocôndria *hooded*. (e) Observação de corpúsculos multivesiculares (setas grossas) nos embriões submetidos a pressão. (MV) microvilosidades.

5.3.3 Embriões vitrificados

Após 4 horas da desvitrificação, os embriões re-exapandiram apresentando características estruturais aparentemente normais, visualizados por estereomicroscópio. Nos cortes semifinos foi possível observar que os embriões mantiveram sua forma, visualizando a MCI e as células do trofoblasto (Figura 2.6a). Contudo, quando foram avaliados pela microscopia eletrônica as células apresentavam grande quantidade de corpos de inclusão e corpúsculos multivesiculares. O citoplasma tinha aparência granular e em alguns embriões foi notada a presença de conteúdo celular tanto na blastocele quanto no espaço perivitelinico, pelo rompimento da membrana celular (Figura 2.6b).

O espaço perivitelinico era mais evidente que nos embriões controle e nos submetidos a pressão, e com grande quantidade de debris celulares, vacúolos, lipídeos (Figura 2.6c), além de presença de células extrusadas em todos os embriões avaliados.

Danos severos foram observados na maioria das células, como diminuição da eletro-densidade da matriz citoplasmática, corpos apoptóticos e vesículas de degradação (Figura 2.6d). Mitocôndrias intumescidas (Figura 2.6c) foram encontradas tanto nas células da MCI quanto nas do trofoblasto, contudo mitocôndrias normais, alongadas e com muitas cristas, também foram observadas nos diferentes tipos celulares.

O citoplasma das células tanto da MCI quanto do trofoblasto apresentava granulação grosseira (Figura 2.6c). Foram encontradas junções de adesão entre as células, porém não foram observados desmossomos (Figura 2.6e). E em poucas regiões se observava a presença de microvilosidades.

Outra característica marcante foi a presença de pouca quantidade de núcleo por área de MCI nestes embriões (Figura 2.6b)

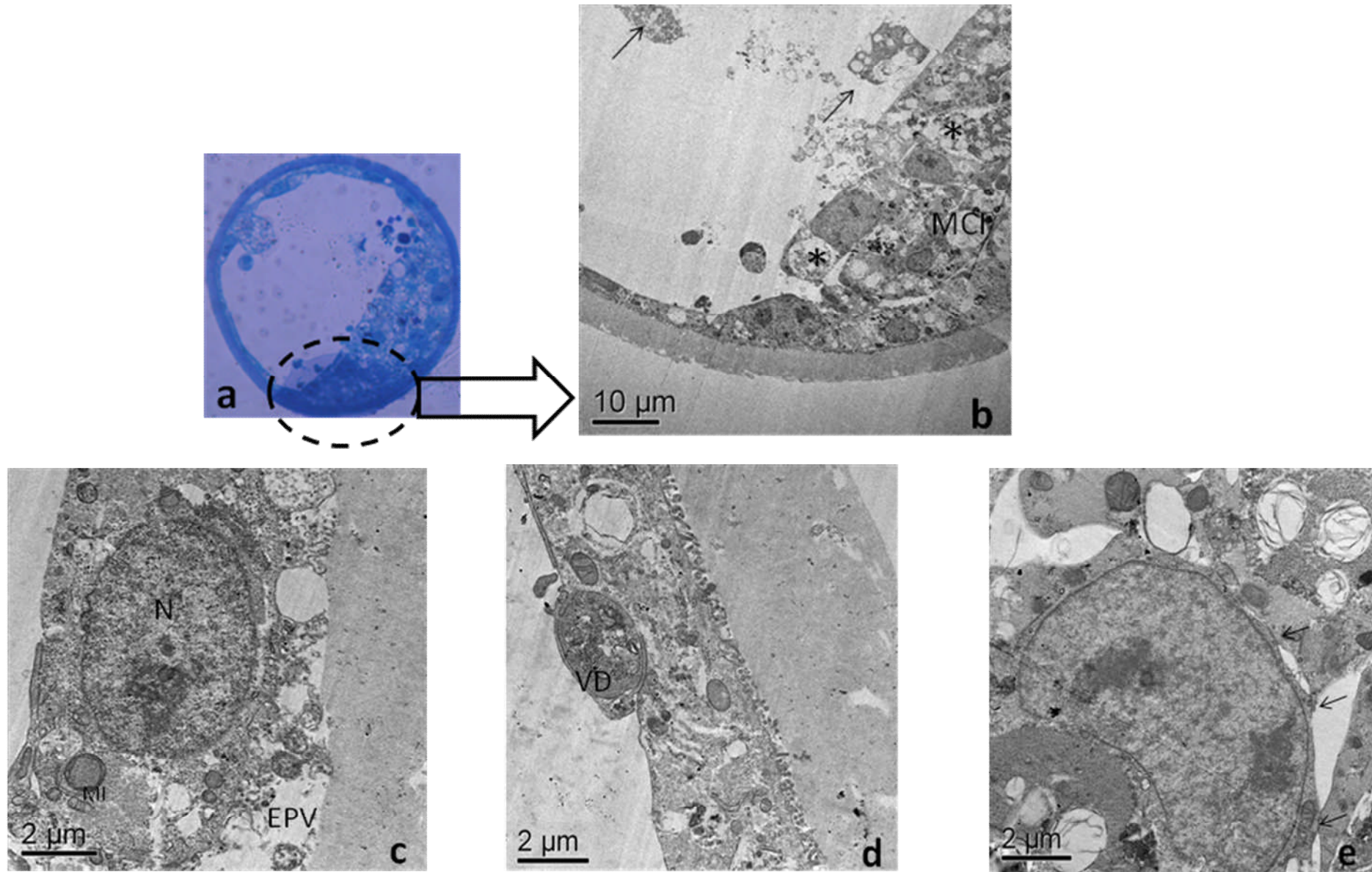


Figura 2.6 – Blastocisto vitrificado. (a) Corte semifino do embrião após 4 horas de desvitrificação. (b) Micrografia eletrônica mostrando os vários danos causados ao embrião após a vitrificação, rompimento de célula com liberação de conteúdo citoplasmático na blastocele (setas) e corpos de inclusão (asteriscos). (c) Espaço perivitelínico bem evidente (EPV), com grande quantidade de debris. (d) Célula com citoplasma granular e presença de vesícula de degradação (VD). (e) Presença de junções (setas) entre células adjacentes. (MCI) massa celular interna, (N) núcleo, (MI) mitocôndria intumescida.

5.3.4 Embriões submetidos à pressão hidrostática e vitrificados

A ultraestrutura dos embriões submetidos à pressão hidrostática e vitrificados estava bem próxima da observada nos embriões apenas vitrificados. Os embriões reexpandiram após 4 horas de cultivo, com identificação evidente de MCI e trofoblasto (Figura 2.7a). Espaço perivitelínico grande e com presença de debris, também observados na região da blastocele (Figura 2.7a). A zona pelúcida apresentava muitos poros, aparentemente maiores do que os embriões controle ou apenas submetidos à pressão.

Células do trofoblasto apresentavam microvilosidades na superfície da membrana plasmática voltada para o espaço perivitelínico. Junções de adesão entre células do trofoblasto estavam presentes, demonstrando a recuperação da forma normal do embrião. Mitocôndrias intumescidas e normais eram observadas tanto nas células da MCI quanto nas células do trofoblasto (Figura 2.7b).

Ponto importante observado nestes embriões foi a maior quantidade de núcleos por área de MCI quando comparados com aqueles apenas vitrificados (Figura 2.7c), apesar de apresentarem corpúsculos multivesiculares e vesículas de degradação, características marcantes nos embriões submetidos à vitrificação.

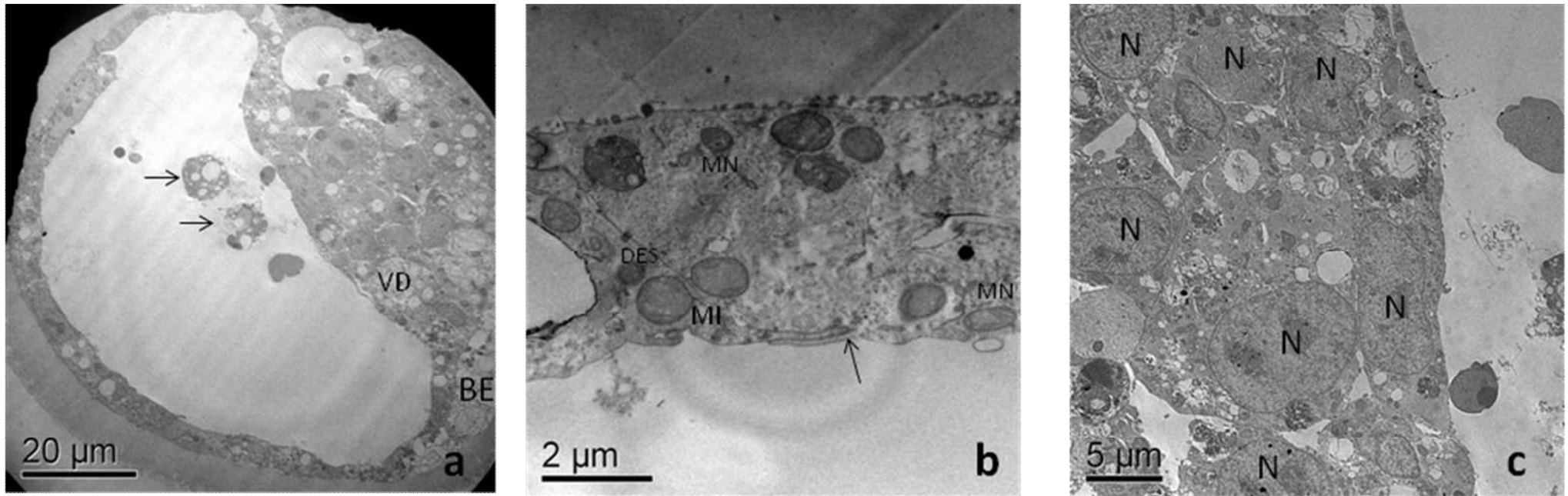


Figura 2.7 – Blastocisto submetido a pressão e vitrificado. (a) Micrografia eletrônica do embrião mostrando o efeito deletério da vitrificação, com presença de vesículas de degradação (VD), conteúdo citoplasmático na blastocele (setas finas) e blastômero extruso (BE). (b) Contudo, o embrião apresenta retorno da sua forma, com junções de adesão entre células adjacentes (seta grossa) e desmossomos (DES), além da presença de mitocôndrias normais (MN). (c) Embrião com grande quantidade de núcleos intactos (N) após a vitrificação (MI mitocôndria intumescida).

6 DISCUSSÃO

O acúmulo dos efeitos causados pela pressão hidrostática pode ser letal, dependendo do nível de pressão, tempo de exposição, temperatura, entre outros. Gametas e embriões respondem diferentemente ao estresse causado pela pressão hidrostática. Na avaliação de ovócitos e espermatozóides suínos, os gametas foram tolerantes à pressão no nível de 20-40MPa (Pribenszky et al., 2007a; Du et al., 2008; Huang et al., 2009), já embriões de camundongo suportaram níveis mais elevados de pressão, entre 60-80 MPa (Pribenszky et al., 2005).

Na primeira etapa deste trabalho observou-se que embriões bovinos PIV apresentavam a mesma baro-tolerância que embriões murinos, quando empregado os mesmos níveis de pressão e tempo (Pribenszky et al., 2005). E embriões num estágio de desenvolvimento maior (Bx) foram mais tolerantes a pressão que embriões menos desenvolvidos (Bl). A pressão de 80 MPa por 1 hora diminuiu a taxa de eclosão de embriões Bl e não causou esse efeito em embriões Bx.

A compactação da blastocle é um evento dependente da magnitude e da duração do tratamento de pressão empregado, ficando evidente que a partir de 60 MPa por 1 hora todos os embriões sofrem esse processo. Pribenszky et al. (2005) assumem que a pressão não é a responsável direta pela compactação, mas sim os efeitos causados por ela, como produção de diferentes proteínas, alteração reversível na estrutura de proteínas e mudanças nos processos metabólicos. Embriões compactados retomam suas morfologia normal após 2 horas de cultivo *in vitro*, re-expandem e eclodem, similarmente ao grupo controle.

No segundo experimento, avaliou-se o efeito de um choque subletal (pressão hidrostática) na capacidade de sobrevivência de embriões bovinos PIV a um outro choque (vitricificação), buscando o efeito de proteção cruzada. O tratamento com PH subletal induz a produção de proteínas específicas (como HSPs) que apresentam funções diversas, como na melhora de tolerância ao estresse, no dobramento de proteínas e na transdução de sinais em bactérias e células de mamíferos (Csermely et al., 1998). O efeito de proteção cruzada foi relatada em bactérias, Wemekamp-Kamphuis et al. (2002) encontraram um nível de sobrevivência 100 vezes maior quando bactérias foram submetidas a um choque por resfriamento antes da pressurização do que as bactérias que foram mantidas apenas a 37⁰C e depois pressurizadas.

No presente experimento foi observado que determinados níveis e tempos de pressão hidrostática antes da vitrificação podem promover um incremento em torno de 15% nas taxa de eclosão nas avaliações pós desvitrificação, confirmando o efeito de proteção cruzada.

As taxas de re-expansão e eclosão dos embriões controle vitrificados deste experimento estavam melhores ou iguais aos resultados obtidos em diferentes trabalhos utilizando procedimentos semelhantes com embriões produzidos *in vitro* (Martínez et al., 2002; Nedambale et al., 2006; Gómez et al., 2008; Block et al., 2009). Mesmo com esses resultados, foi possível obter uma melhora na taxa de eclosão quando utilizou-se um tratamento prévio a vitrificação aplicando pressão de 40 MPa e 60 MPa por 1 hora.

Neste segundo experimento ficou claro o efeito deletério da pressão hidrostática no nível de 80 MPa, onde 30 minutos promoveu uma pior taxa de re-expansão e não foi observado melhora quando comparado com os grupos controles, e 1 hora foi a pior taxa de re-expansão e eclosão entre todos os grupos avaliados.

O estresse causado pela pressão hidrostática pode levar a alterações nas membranas biológicas (Tauc et al., 2002), proteínas (Silva, et al., 2001;), RNA e DNA (Murakami e Zimmerman, 1973) e no metabolismo celular (Abe, et al., 1999). Estas alterações podem causar inibição de crescimento ou morte celular, dependendo da magnitude utilizada, assim como do tempo de exposição em combinação com temperatura, pH e, também, pela sensibilidade dos diferentes organismos a pressão. O uso do nível de pressão de 80 MPa em embriões bovinos com tempo de exposição de 1 hora promove mudanças na sua estrutura e metabolismo que levam à diminuição da sobrevivência.

Após vitrificação, os embriões Bx apresentaram melhores taxas de re-expansão e eclosão que Bl, sendo que o tratamento 60 MPa por 1 hora foi o que obteve melhor resultado usando embriões Bl. Já com embriões Bx, o tratamento de 40 MPa por 1 hora e 60 MPa por 30 minutos e 1 hora apresentaram resultados semelhantes ao grupo não vitrificado e melhores que os embriões apenas vitrificados e vitrificados bancada. Esses resultados indicam que o tratamento 60 MPa por 1 hora pode ser usado para embriões Bl e Bx.

A indução mecânica da compactação tem sido utilizado como alternativa no procedimento de congelamento de embriões humanos, visando promover uma melhor taxa de sobrevivência pós descongelamento (Vanderzwalmen et al. 2002; Son et al., 2003; Hiraoka et al., 2004; Mukaida et al., 2006) pois a saída de água da blastocelule

favorece a diminuição da formação de cristais de gelo no processo de criopreservação. No presente trabalho avaliou-se o efeito compactação e não compactação dos embriões após determinados níveis e tempos de pressão e não observamos um incremento nas taxas de sobrevivência dos embriões que sofreram compactação, isto sugere que as melhores taxas de sobrevivência após a desvitrificação são pelos efeitos indiretos da pressão hidrostática, como indução de proteínas de estresse.

Este é o primeiro trabalho que avalia ultraestruturalmente o efeito da pressão hidrostática em embriões bovinos PIV e o efeito no procedimento de vitrificação destes embriões.

Embriões controle produzidos *in vitro*, descritos neste trabalho, apresentavam ultraestrutura semelhante aos descritos na literatura (Abe et al., 1999; Boni et al., 1999; Crosier et al., 2001), principalmente, pela presença de grande quantidade de lípidos. Esta característica é determinante na alta susceptibilidade destes embriões ao processo de criopreservação (Pereira & Marques, 2008).

O estresse da pressão hidrostática promoveu um aumento nas microvilosidades das células do trofoblasto. Após a pressão hidrostática, ocorreu contração da blastocela e aumento da quantidade de debris celulares no espaço perivitelínico, este pode ter sido o fator que levou ao aumento das microvilosidades nestes embriões. Microvilosidades estão diretamente relacionadas com a maior capacidade de absorção (Betteridge & Flechon, 1988), pois aumenta a superfície de contato da célula. A maior quantidade de microvilosidades nos embriões submetidos à pressão pode melhorar o procedimento da vitrificação, pois aumentaria as taxas de troca entre água e crioprotetores.

A avaliação dos embriões também revelou um aumento na presença de mitocôndrias eletrodensas, *hordded*, nos embriões submetidos à pressão. Em embriões bovinos, 3 tipos de mitocôndrias são descritos: (a) mitocôndria madura, com cristas bem desenvolvidas; (b) mitocôndria imatura com poucas cristas periféricas e aparência tipo capuz (*hooded*); (c) mitocôndria vacuolizada apresentando vesícula no seu interior (Crosier et al., 2000; Kollé et al., 2004). Mitocôndrias imaturas são encontradas tipicamente em ovócitos e estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (Senger & Saacke, 1970; Ullmann & Butcher, 1996), controlando a produção de energia nessa fase (Devreker & Englert, 2000). Essa característica da mitocôndria limita a possibilidade de fosforilação oxidativa e reduz o potencial para geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem iniciar um estresse oxidativo seguido por necrose (Liu & Keefe, 2000; Liu et al., 2000). Por outro lado, mitocôndrias imaturas podem ter funções

especiais relacionadas com metabolismo energético que pode não ser preenchido pela mitocôndria madura, por esse motivo alguns autores classificam estas *hooded* como mitocôndrias embrionárias e não imaturas (Kolle et al., 2004).

Membranas da mitocôndria são estruturas dinâmicas capazes de mudar a forma rapidamente em resposta a uma alteração nas condições osmótica ou metabólica, ou seja, em resposta a um estresse (Hackenbrock, 1966; Frey & Mannella, 2000). Células de gânglio da retina de rato, RGC 5, cultivadas por 3 dias sobre pressão hidrostática apresentaram alterações deletérias nas características das mitocôndrias (Ju et al., 2007).

A modificação da morfologia da mitocôndria para a forma *hooded* indica um aumento na área de superfície da organela (Senger & Saacke, 1970), englobando uma parte do citoplasma da célula. Esta condição pode facilitar a troca de metabólitos entre o citoplasma englobado e o interior da mitocôndria (Stephens & Bills, 1965) e está relacionada com metabolismo de lipídeos (Kolle et al., 2004). O aumento desse tipo de mitocôndrias após a pressão hidrostática, pode estar correlacionado com as melhores taxas de sobrevivência dos embriões após a vitrificação, já que os embriões produzidos *in vitro* apresentam como característica marcante a presença de grande quantidade de gotas lipídicas que podem influenciar negativamente no processo de criopreservação.

Comparando a técnica de vitrificação às outras técnicas de criopreservação, esta apresenta uma melhor taxa na sobrevivência e prenhez de embriões PIV (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006). Contudo, quando observou-se a ultraestrutura desses embriões foi constatado o quanto a vitrificação ainda é deletéria ao embrião, com diminuição da eletro-densidade da matriz citoplasmática, corpúsculos multivesiculares e vesículas de degradação.

Na avaliação por estereomicroscopia, o embrião retornou à sua forma aparentemente normal após 4 horas de cultivo, momento em que foram fixados para avaliação ultraestrutural. Vajta et al. (1997) observaram uma reorganização diferente após 4 horas de cultivo, pois não era possível observar separação entre MCI e trofoblasto, contudo após 24 horas os embriões se reorganizavam e apresentavam alta taxa de reexpansão e eclosão. Já outros trabalhos utilizando técnica de curva de congelamento lento observaram uma total desorganização e não reestabelecimento dos embriões PIV após o congelamento e descongelamento (Kuwayama et al., 1994, Fair et al., 2001).

Os resultados deste trabalho indicam que embriões PIV suportam a vitrificação, conseguem se reestabelecer, contudo apresentam uma série de danos celulares. Mais estudos são necessários para minimizar esses danos.

Gómez et al. (2008b) observaram que os danos da vitrificação acontecem seletivamente nas células da MCI dos embriões, não afetando o número de células do trofoblasto, o que poderia explicar a sobrevivência *in vitro*, mas com baixos índices de prenhez quando transferidos, já que as células que originariam o feto estariam comprometidas. Fato também observado no presente trabalho, já que os embriões do grupo controle vitrificados apresentavam diminuição do número de núcleos por área de MCI.

Os embriões submetidos à pressão antes da vitrificação parecem ter melhorado a sua característica após o descongelamento, pois maior quantidade de núcleos por área de MCI foram encontradas, aumentando a possibilidade de retomada do desenvolvimento celular. Isto pode ser o indicativo na melhora das taxas de sobrevivência e eclosão após a desvitrificação observados neste trabalho, estes embriões apresentam uma reorganização mais rápida e com maior quantidade de núcleos.

Este trabalho demonstrou que embriões bovinos PIV são sensíveis à pressão hidrostática a partir de 80 MPa, e que embriões mais desenvolvidos apresentam maior baro-tolerância. Também demonstrou que a aplicação do tratamento de pressão hidrostática antes da vitrificação pode promover um efeito de proteção cruzada, melhorando as taxas de re-expansão e eclosão dos embriões. Com relação a ultraestrutura, embriões submetidos a pressão hidrostática de 60 MPa por 1 hora, apresentam alterações, principalmente no aumento das microvilosidades e presença de grande quantidade de hooded mitocôndrias, fato esse que pode estar relacionado com a melhora nas taxas de sobrevivência e eclosão após a criopreservação.

Mais trabalhos são necessários para suportar o entendimento do efeito de proteção cruzada causada pela pressão hidrostática e a confirmação deve ser feita com trabalhos *in vivo*, com obtenção de taxas de prenhez usando a pressão hidrostática no procedimento de criopreservação de embriões.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. **Anatomy Embriology**, v. 199, p. 519-527, 1999.
- ABE, F. Piezophysiology of yeast: occurrence and significance. **Cellular and Molecular Biology**, v.50, p.437-445, 2004.
- BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J.; Effect of addition of hyaluron to embryo culture on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, 2009.
- BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1050-1055, 1999.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.1459-1465, 2000.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, p.1375-1385, 2001.
- CSERMELY, P.; SCHNAIDER, T.; SOTIC, C.; PROHÁSZKA, Z.; NARDAI, G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, p. 129-168, 1998.
- DEVREKER, F. & ENGLERT, Y. *In vitro* development and metabolism of the human embryo up to the blastocyst stage. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 92, p. 51–56, 2000.
- DINNYES, A.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.63, p.513-518, 2000.
- DU, Y.; PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; ZHANG, X.; YANG, H. KUWAYAMA, M.; PEDERSEN, A.M.; VILLEMOES, K.; BOLUND, L.; VAJTA, G. High hydrostatic pressure (HHP): a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction**, v. 135, p. 13-17, 2008a.
- FAHY, G.M.; MACFARANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407–426, 1984.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 186-195, 2001.

FERNANDES, P.M.; DOMITROVIC, T.; KAO, C.M.; KURTENBACH, E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**, v. 556, p. 153-160, 2004.

FREY, T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 319-324, 2000

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUNOZ, M. CAAMANO, J.N.; CARROCERA, S. MARTÍN, D.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Development and quality of bovine morulae cultured in serum-free medium with specific retinoid receptor agonists. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 884-891, 2008a.

GÓMEZ, E.; MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, A.; CAAMANO, J.N.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. **Reproduction Domestic Animals**, 2008b.

HACKENBROCK, C.R. Ultrastructural base for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated lever mitochondria. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, p. 269-297, 1966.

HIRAOKA, K.; HIRAOKA, K.; KINUTANI, M.; KINUTANI, K. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2884-2888, 2004.

HUANG, S.Y.; PRIBENSZKY, C.; KUO, Y.H.; TENG, S.H.; CHEN, Y.H.; CHUNG, M.T.; CHIU, Y.F. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 136-149, 2009.

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

JU, W.K.; LIU, Q.; KIM, K.Y.; CROWSTON, J.G.; LINDSEY, J.D.; AGARWAL, N.; ELLISMAN, M.H.; PERKINS, G.A.; WEINREB, R.N. Elevated hydrostatic pressure triggers mitochondrial fission and decreases cellular ATP in differentiated RGC-5 cells. **Investigative ophthalmology & Visual Science**, v. 48, p. 2145-2151, 2007.

KAARNIRANTA, K.; ELO, M.; SIRONEN, R.; LAMMI, M.J.; GOLDRING, M.B.; ERIKSSON, J.E.; SISTONEN, L.; HELMINEN, H.J. Hsp 70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with

mRNA stabilization rather than transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy Sciences of USA**, v. 95, p. 2319-2324, 1998.

KOLLE, S.; STOJKOVIC, M.; REESE, S.; REICHENBACH, H.D.; WOLF, E.; SINOWATZ, F. Effects of growth hormone on the ultrastructure of bovine preimplantation embryos. **Cell Tissue Research**, v. 317, p. 101-108, 2004.

KUO, Y.H.; PRIBENSZKY, C.; HUANG, S.Y. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. **Proceedings of the 6th International Conference of Boar Semen Preservation**, 2007.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-steps procedures. **Cryobiology**, v. 31, p. 415-422, 1994.

LANE, M.; FOREST, K.T.; LYONS, E.A.; BAVISTER, B.D. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel container-less technique. **Theriogenology**, v.51, p.167, 1999a.

LIU, H.L., KEEFE, D.L. Cytoplasm mediates both developmental and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1828–1834, 2000

LIU, H.L., TRIMARCHI, J., KEEFE, D.L.. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1745–1753, 2000.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P., Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁRCEL, A.; de las HERAS, M.A.; de MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 11-21, 2002.

MATSUMOTO, H.; JIANG, J.Y.; TANAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Vitrification of large quantities of immature oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144, 2001.

MIURA, T.; MINEGISHI, H.; USAMI, R.; ABE, F. Systematic analysis of HSP gene expression and effects on cell growth and survival at high hydrostatic pressure in *Saccharomyces cerevisiae*. **Extremophiles**, v. 10, p. 279-284, 2006.

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

MUKAIDA, T.; OKA, C.; GOTO, T.; TAKAHASHI, K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. **Human Reproduction**, v. 21, p. 3246-3252, 2006.

MURAKAMI T.H.; ZIMMERMAN A.M. DNA synthesis in Tetrahymena: a pressure study. **Cytobios**, v. 7, p. 171-181, 1973.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYES, A.; GROENC, W.; DOBRINSKY, J. R.; TIAN, X. C.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM and SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.62. p.437-49, 2004.

NEDAMBALE, T.L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X.C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 61-75, 2006.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.15, p.651-658, 2000.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and Tissue Banking**, v. 9, p. 267-277, 2008.

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

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; KÚTVOLGYI, 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, p. 181-182, 2007.

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

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, J.; 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, p.236-243, 2003.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Savoy, IL: IETS, 1998.

SENGER, P.L.; SAACKE, R.G. Unusual mitochondria of the bovine oocyte. **The Journal of Cell Biology**, v. 46, p. 405-408, 1970.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFFSON, H.; GUSTARI, S.; BARTOLOME, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological

evaluation of in vitro and in vivo produced embryos. **International Congress on Animal Reproduction**; v.3, p.1333-1335, 1992.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends Biochemical Science**, v. 26, p. 612-618, 2001.

SON, W.Y.; YOON, S.H.; YOON, H.J.; LEE, S.M.; LIM, J.H. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. **Human Reproduction**, v. 18, p. 137-139, 2003.

STEPHENS, R.J.; BILS, R.F. An atypical mitochondria form in normal rat liver. **The Journal of Cell Biology**, v. 24, p. 500-504, 1965.

STOJKOVIC, M.; KÖLLE, S.; PEINL, S.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; THOMPSON, J. G.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H-D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Effects of high concentration of hialuronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen – thawed bovine embryos produced in vitro. **Society for Reproduction and Fertility**, v.1, p.141-153, 2002.

TAUC, P.; MATEO, C.R.; BROCHON, J. C. Investigation of the effect of high hydrostatic pressure on proteins and lipidic membranes by dynamic fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, p. 103-115, 2002.

ULLMANN, S.L.; BUTCHER, L. Mammalian oocyte organelles with special reference to pleomorphic mitochondria and vacuole formation in marsupials. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 491-508, 1996.

VAJTA, G.; HYTTEL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of in-vitro – produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p 9-17, 1997.

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, p.53-58, 1998.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrification. **Reproduction Biomedicine On line**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.H.; STANDAERT, V.; VAN ROOSENDAAAL, E.; VANDERVORST, M.; BOLLEN, N.; ZECH, H.; MUKAIDA, T.; TAKAHASHI, K. Birth after vitrification at morula and blastocyst stage: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. **Human Reproduction**, v. 17, p. 744-751, 2002.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.H.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; VAN ROOSENDAAAL, E.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.;

ZECH, H. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1802-1803, 2003.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I.; MAHMOUDZADEH, A.R.; DELUYKER, H.; KRUIF, A. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v38; p905-919, 1992.

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

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 Environmental Microbiology**, v. 68, p. 456-463, 2002.

CAPÍTULO 3

MELHOR MOMENTO PARA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRÉ-TRATADOS COM PRESSÃO HIDROSTÁTICA: AVALIAÇÕES *IN VITRO* E DE EXPRESSÃO GÊNICA

1 RESUMO

A pressão hidrostática tem sido empregada, recentemente, em diferentes tecnologias de reprodução assistida. O tratamento com pressão hidrostática induz produção e estabilização de proteínas específicas, que apresentam funções específicas aumentando a tolerância ao estresse e podem promover proteção cruzada a células submetidas a outras condições de estresse. O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes períodos de equilíbrio entre o tratamento com pressão hidrostática e a vitrificação (0, 1 e 2 horas) de embriões bovinos produzidos *in vitro* e correlacionar com o nível de expressão de genes relacionados a estresse oxidativo, metabolismo de lipídios e estresse térmico. Blastocistos PIV foram colocados em uma câmara de pressão hidrostática (Cryo-innovation Ltd., Budapeste, Hungria), a magnitude e duração da pressão foi otimizada em experimentos anteriores. Pressão de 60 MPa foi aplicada por 60 minutos a 32°C. Imediatamente após o tratamento com pressão (PH imed), ou após 1 hora (PH 1 hora) ou 2 horas (PH 2 horas) de incubação, os embriões foram separados em dois procedimentos: vitrificados e desvitrificados usando OPS ou congelados a -80°C até a análise de expressão gênica. Blastocistos não tratados foram vitrificados ou mantidos a -80°C como controles. Transcritos de MnSOD, GPX4, HSP 70, CIRP-b e ERG 25 foram quantificados por RT-PCR e normalizados pela expressão da beta-actina. Os grupos PH imed e PH 1 hora apresentaram melhores ($P < 0.05$) taxas de re-expansão e eclosão após vitrificação e desvitrificação (88% e 76%; 90% e 74%, respectivamente), comparados aos grupos não tratado (81% e 63%, respectivamente) e PH 2 horas (79% e 70%, respectivamente). Contudo, o grupo PH 1 hora mostrou uma maior velocidade de re-expansão quando comparados aos demais grupos. Apenas o gene ERG 25 diferiu entre

os grupos, com maior abundância de transcritos ($P < 0,05$) no grupo PH 1 hora com relação ao grupo controle. Os grupos PH imed e PH 2 horas apresentaram expressão intermediária. Apesar disso, foi possível observar o mesmo comportamento entre os genes avaliados, MnSOD, GPX4, HSP 70 e ERG 25, mostrando um aumento numérico na expressão destes genes no grupo PH 1 hora e retorno do nível de expressão no grupo PH 2 horas. O gene CIRP-b não foi expresso nas condições do experimento. Tratamento com PH melhorou a sobrevivência *in vitro* de embriões bovinos vitrificados. Células embrionárias reagem em resposta ao estresse, aumentando a expressão de genes específicos, como o ERG 25, que podem promover uma maior resistência a outros processos estressantes, incluindo a vitrificação.

Palavras chave: pressão hidrostática, vitrificação, expressão gênica.

2 ABSTRACT

The application of sublethal hydrostatic pressure (HP) treatment has been investigated recently in different assisted reproductive techniques. Sublethal HP treatment could induce production/stabilization of specific proteins, that plays essential roles in improving stress tolerance and may further cross-protect the cells in other stress condition. The aim of this study was to evaluate different equilibrium period between HP treatment and vitrification (0, 1 and 2 hours) of bovine embryo produced *in vitro* and correlate with the level of gene expression related to oxidative stress, lipid metabolism and temperature stress. Day 7 IVP blastocysts were aspirated in TQC holding medium (AB Technology, Brazil) to 0,25 ml straws. Straws were pressure treated in custom-made hydrostatic pressure chamber (Cryo-Innovation Ltd., Budapest, Hungary). The magnitude and duration of the pressure was optimized in earlier experiments. Six hundred bar pressure was applied for 60 min at 32°C. Immediately after pressure treatment (HP Imed group), or following 1 (HP 1 hour group) or 2 hours (HP 2 hours group) incubation, the embryos were separated in two different proceedings: embryos were vitrified and warmed using OPS or were stored at -80°C until gene expression analysis. Untreated blastocysts were vitrified or stored at -80°C as controls. Transcripts for manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase 4 (GPX4), heat shock protein 70 (HSP 70), cold inducible RNA-binding protein (CIRP-b) and methyl sterol oxidase 25 (ERG 25) were quantified by RT-PCR and normalized by beta-Actin expression. Data from re-expansion and hatching rates were analyzed by logistic regression. The relative abundance of mRNA for the target genes in embryos were evaluated by ANOVA and Tukey's test. The HP Imed and HP 1 hour groups had higher ($P<0.05$) re-expansion and hatching rates after vitrification/warming (88% and 76%; 90% and 74%, respectively), compared to untreated (81% and 63%, respectively) and HP 2 hours groups (79% and 70%, respectively). However, the HP 1 hour group showed improvement speed of the blastocysts re-expansion, compared to untreated control, HP Imed and HP 2 hours groups. Only 25 ERG differed among groups, with greater abundance of the transcript ($P<0.05$) in HP 1 hour group than in control group. The HP Imed and HP 2 hours groups showed an intermediary expression. No changes in transcript level were

observed for MnSOD, GPX4 and HSP 70 genes. However, it was possible to observe the same behavior among the different evaluated genes, MnSOD, GPX4, HSP 70 and ERG 25, showing a numerical increase in the expression of genes in HP 1 hour group and a return of the expression level in HP 2 hours group. CIRP-b gene did not express in these experimental conditions. Sublethal HP treatment was found to be efficient in increasing the in vitro development of vitrified bovine embryo. Embryo cells react with a specific response, increasing gene expression, like ERG 25 gene, that may make them more resistant to subsequent stressing processes, including vitrification.

Key Words: hydrostatic pressure, vitrification, gene expression.

3 INTRODUÇÃO

Em 1962, descobriu-se que a exposição de células de glândula salivar de *Drosophila busckii* a calor e outros agentes químicos produzia o surgimento de um novo espessamento em cromossomos, que representava sítios específicos de transcrição para síntese de proteínas (Ritossa, 1962).

As células estressadas produzem grande quantidade de uma determinada classe de proteínas, chamadas de “heat shock” (HSP) ou proteínas de estresse. Essas proteínas apresentam funções variadas, como regulação do estado oxidativo das células; regulação protéica; e como chaperonas, que ajudam a evitar a agregação de proteínas desnaturadas e auxiliam no retorno dessas proteínas à sua forma nativa (Ellis, 1987). Outro grupo de proteínas descrito que são induzidas após um período de estresse moderado por hipotermia são as cold shock (CSP), estas têm como funções fisiológicas proteger e restaurar conformações nativas de RNA durante o estresse, atuando como chaperonas de RNA (Graumann e Marahiel, 1999) e também como ativadoras de transcrição (La Teana et al., 1991).

Sabe-se que diferentes agentes, tais como calor, frio, agentes químicos, pressão hidrostática, entre outros, causam uma resposta da célula levando a mudanças no comportamento de expressão gênica.

Escherichia coli expostas à pressão hidrostática de 53 MPa (0,1 MPa = 1 bar = 1 atm) resultou na indução de 55 proteínas, incluindo 11 HSPs e 4 CSPs. Pressão hidrostática é o único estressor conhecido que, simultaneamente, induz tantas proteínas HSP e CSP (Welch et al., 1993). Huang et al. (2009) avaliando o perfil de proteínas de sêmen suíno tratados com pressão hidrostática e submetidos ao procedimento de criopreservação, encontraram 3 proteínas mais expressas após o resfriamento e o descongelamento das amostras de sêmen, relacionando essa alteração no perfil protéico com o melhor resultado do tamanho da leitegada usando sêmen suíno tratado com pressão previamente ao congelamento (Kuo et al., 2007).

Análise de 6200 genes conhecidos de *Saccharomyces cerevisiae* mostrou que 5% dos genes foram afetados pela pressão hidrostática, sendo que genes envolvidos na defesa, estresse e metabolismo de carboidratos e lipídios foram induzidos pela PH (Fernandes et al., 2004).

O uso da pressão hidrostática como ferramenta em técnicas de reprodução tem sido relatado nos últimos anos, seguindo a hipótese que células submetidas a um estresse subletal induzem uma série de proteínas que podem protegê-las a um novo desafio, a teoria de “proteção cruzada”.

O estresse subletal causado pela pressão hidrostática melhorou os resultados da criopreservação de embriões murinos (Pribenszky et al., 2005a) e bovinos (Pribenszky et al., 2005b). Sendo que os melhores resultados nas taxa de sobrevivência e eclosão para embriões bovinos foi obtido quando utilizou-se 60 MPa por 1 hora (Siqueira Filho et al., dados não publicados). Também foi relatado aumento de motilidade pós descongelamento e fertilização de sêmen de suíno e bovino após tratamento com pressão hidrostática (Kuo et al., 2007; Pribenszky et al., 2007).

Nos trabalhos de criopreservação de ovócitos, os melhores resultados foram alcançados quando permaneciam no meio de cultivo por período de 1 a 2 horas entre o tratamento com pressão hidrostática e a vitrificação, este período seria necessário para a produção de proteínas que poderiam proteger os ovócitos a novos danos (Du et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais a pressão hidrostática promove uma melhora nos resultados destas diferentes técnicas não estão totalmente elucidados. Este trabalho tem como objetivos avaliar o melhor momento após o tratamento com pressão hidrostática que embriões bovinos devem ser vitrificados. Além disto, correlacionar estas informações com o nível de expressão de alguns genes candidatos, envolvidos no estresse oxidativo (MnSOD e GPX4), resposta a estresse térmico (HSP 70 e CIRP-b) e metabolismo de lipídio (ERG-25).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção *In vitro* de Embriões

Todos os meios utilizados, da maturação ao cultivo, foram fornecidos pela Nutricell[®] Nutrientes Celulares Ltda (Campinas, São Paulo, Brasil).

4.1.1 Coleta e seleção de ovócitos

Ovários de vacas mestiças foram coletados de abatedouros e transportados em solução salina 0,9% a uma temperatura de 36°C até o laboratório. Os folículos de 2 a 8 mm foram puncionados usando agulha 18G e seringa. O líquido aspirado foi depositado em um tubo cônico de 15 ml (TPP®) e mantido em banho-maria a 35°C. Esse líquido foi vertido num filtro de coleta de embriões e lavados com solução tampão de fosfato (PBS - Nutricell®) e então colocados numa placa de 100mm (TPP®). A procura e seleção dos complexos cumulus ovócitos (CCO) foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon – SMZ 650), somente os CCOs de qualidade I e II foram selecionados para os experimentos, sendo avaliados pela presença e quantidade de células do cumulus, além da coloração e característica do ooplasma.

4.1.2 Maturação, fecundação e cultivo *in vitro*

Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 20-25 para gotas de 150µl de meio de maturação (MIV – Nutricell®). As gotas de MIV eram cobertas com óleo de parafina (360 Medical Fluid 350 CST – DOW CORNING®) e estabilizadas, previamente ao uso, por duas horas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ e umidade saturada. Os CCOs permaceiam por um período de 22 horas.

Após o período de maturação, os CCOs foram lavados e transferidos para gotas de 150µl de meio de fecundação, FEC Nutricell®, que foi suplementado com penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) e heparina.

A seleção espermática foi realizada utilizando a técnica de gradiente de percoll, sendo preparado com 1 ml de percoll 45% e 1 ml de percoll 90%, centrifugado a 700g por 15 minutos a uma temperatura de 30°C. O pellet formado era retirado, ressuspensionado em 1 ml de meio de capacitação (CAP - Nutricell®) e centrifugado por mais 5 minutos nas mesmas condições. Após a centrifugação, o sobrenadante era retirado e o pellet ressuspensionado em meio de fecundação. A concentração final de dose inseminante/gota era de 1×10^6 espermatozóides/ml. Ovócitos e espermatozóides eram

co-incubados por 15-18 horas em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. O dia da fecundação foi considerado D0.

Os possíveis zigotos foram transferidos para o meio fluido sintético do oviduto (SOF - Nutricell[®]) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, tri-citrato de sódio, myo-inositol e soro fetal bovino (SOFaaci). Sendo avaliados em D2 para clivagem e em D6 e D7 para observação da taxa de blastocisto. No sétimo dia de cultivo, os embriões foram classificados de acordo com o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS - Robertson & Nelson, 1998), apenas blastocistos e blastocistos expandidos grau 1 foram utilizados.

4.2 Pressão Hidrostática

No sétimo dia de cultivo os embriões foram envasados em palhetas de 0,25 ml, com meio de manutenção (TQC, AB Technology, Brasil) sem presença de bolhas e seladas com lacradores de palhetas de plástico. Estas palhetas foram colocadas dentro da câmara de pressão hidrostática (Cryoinnovation Ltda, Budapeste, Hungria), sendo submetidos à pressão hidrostática de 60 MPa por 1 hora a uma temperatura de 32°C.

4.3 Vitrificação

Os embriões foram vitrificados segundo metodologia de Vajta et al. (1998), esta técnica utiliza uma palheta especial denominada de open pulled straw (OPS - Minitub[®], Brasil). Duas soluções de vitrificação foram utilizadas, a solução de vitrificação 1 (SV1) era composta de TCM 199 com sais de Hank's (Gibco BRL[®]) suplementado com 20% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma[®]) e 10% de etilenoglicol (EG - Merck[®]). A solução de vitrificação 2 (SV2) apresentava uma concentração de 20% de DMSO, 20% de EG e 0,5 M de sacarose (Sigma[®]).

Os embriões eram retirados do meio de manutenção e expostos a SV1 por 1 minuto e 20 segundos na SV2. Nestes 20 segundos, os embriões eram colocados na

OPS e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido (N₂). O tempo do início da exposição dos embriões a SV2 até a imersão no N₂ não deve ultrapassar os 20 segundos.

4.4 Desvitrificação

Os embriões vitrificados permaneceram no N₂ por pelo menos 1 hora. O processo de desvitrificação foi realizado dando 3 banhos com soluções que apresentavam quantidade decrescente de sucrose. A OPS era imersa na primeira solução, TCM 199 suplementado com 20% de SFB e 0,5M de sucrose, onde os embriões permaneciam por 5 minutos, depois eram passados para segunda solução, TCM 199 suplementado com 20% de SFB e 0,25M de sucrose por mais 5 minutos e finalmente em solução de manutenção, TCM 199 suplementado com 20% de SFB, onde também eram mantidos por 5 minutos. Todas as soluções eram pré-aquecidas na estufa e se mantinham entre 38 e 39°C durante o processo de desvitrificação.

Após a desvitrificação, os embriões retornavam para placas de cultivo em meio SOF - Nutricell[®], separados de acordo com os tratamentos, e eram avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão até 72 horas após a desvitrificação.

4.5 Avaliação da Expressão Gênica

A técnica de RT-PCR semi-quantitativo foi utilizada para a avaliação de expressão gênica dos embriões. Foram avaliados 5 genes, 2 relacionados com estresse oxidativo, Glutathione Peroxidase (GPX) e Magnésio Superóxido Dismutase (Mn-SOD), 1 relacionado com metabolismo de lipídeo, Metil Esterol Oxidase (Erg 25) e 2 relacionados com estresse térmico, Heat shock protein 70 (HSP 70) e Cold inducible RNA-binding protein (Cirp-B). Como controle, foi utilizado o gene β -ACTINA. As sequências dos primers e o tamanho dos fragmentos são apresentadas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Sequência dos *primers* utilizados e tamanhos dos fragmentos amplificados.

Gene		Primer (5'-3')	Fragmento
Actina	Sense	5' TATTgCTgCgCTCgTggT 3'	344 pb
	Antisense	5' TCTTCTCACggTTggCCT 3'	
MnSOD	Sense	5' CCCATgAAgCCTTTCTAATCCTg 3'	307 pb
	Antisense	5' TTCAgAggCgCTACTATTTCCCTC 3'	
GPX-4	Sense	5' CgCCgAgTgTggTTTAC-3'	315 pb
	Antisense	5' AggTCCTTCTCTATCACCAg-3'	
CIRP-b	Sense	5' CTggATCCgCTCTCTTTgTC 3'	369 pb
	Antisense	5' CTACTCTgCCTgCCTCAAgC 3'	
HSP-70	Sense	5' CAAgATCACCATCACCAACg 3'	239 pb
	Antisense	5' AAATCACCTCCTggCACTTg 3'	
Erg 25	Sense	5' ATCCAgtTCCgTTgATTTg 3'	221 pb
	Antisense	5' CCAAATggAgCCTgAAACTC 3'	

Foram utilizados de 3 a 5 pools por tratamento, com 10 a 15 embriões por pool, sendo balanceado com mesma quantidade de embriões e mesmo grau de desenvolvimento entre todos os tratamentos do mesmo pool. Sendo coletados e congelados numa quantidade mínima de PBS em N₂.

O RNA total foi extraído utilizando Trizol Reagent (Invitrogen TM) seguindo as recomendações do fabricante, com modificações. Foi acrescentado nos pools de embriões 50µl de Trizol e 25µl de glicogênio, homogeneizados, e então adicionado 10 µl de clorofórmio. Centrifugados a 12.000g por 15 minutos a 4°C, o procedimento continua utilizando a fase aquosa do sobrenadante, isto foi feito retirando com cuidado essa fração para um novo tubo, neste tubo foi acrescentado 25 µl de isopropanol gelado para precipitar o RNA, permanecendo overnight a -20°C. Após este período, o material foi centrifugado a 13.000g por 10 minutos a 40°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 100 µl de etanol 75%. Centrifugado a 7.000g por mais 7 minutos a 4°C, o etanol foi retirado com cuidado para não ressuspender o pellet, e o tubo foi deixado aberto em temperatura ambiente para secagem do “pellet” por 10 minutos, que foi re-suspensionado com 8 µl de água “DNase e RNase free”.

O RNA foi tratado com DNase (Promega®), usando 1 UI de DNase, e tampão para uma concentração final de 1X, aquecido a temperatura de 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1 µl de “stop solution” e aquecido a 65°C por 10 minutos, para inativar a ação da DNase.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando 13 µl do RNA total, 0,5 µg/µL de oligo(dT) e 200 µM dos 4 dNTP's, sendo aquecido por 5 minutos a 65°C. Adicionou-se então o tampão (1X) da enzima transcriptase reversa (RT), 2 µL de DTT (0,1 M) e 40 UI de RNase-OUT. Em seguida a reação foi submetida a 42°C por 52 minutos, sendo que aos dois minutos, o programa foi parado e adicionado ao tubo 200 UI da enzima RT e foi dado segmento ao programa, terminando com um passo a 70°C por 15 minutos. Sendo mantidos no freezer -20 até serem utilizados para a PCR.

Antes da realização das reações de PCR, foi padronizado, para cada gene, o número de ciclos, temperatura de anelamento, quantidade de magnésio e primer usados. As condições utilizadas na reação para todos os genes foram: 1 µL de cDNA, tampão da Taq 1X, 0,8 mM dos 4 dNTP's e 2UI de Taq DNA polimerase. As variações utilizadas na reação para cada gene estão descritas na tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Alterações utilizadas na PCR de cada gene.

Gene	Magnésio (MgCl₂)	Primer	Ciclos	Temperatura anelamento
Actina	2 mM	0,50 µM	40	56°C
MnSOD	2 mM	0,50 µM	33	54°C
GPX-4	2 mM	0,50 µM	33	54°C
CIRP-b	1 mM	0,25 µM	40	54°C
HSP-70	1 mM	0,50 µM	36	55°C
Erg 25	1 Mm	0.50 µM	38	54°C

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio.

A quantificação relativa dos transcritos foi determinada por densitometria pelo programa Image J, versão 1.36b, utilizando o gene da β-ACTINA como constitutivo.

4.6 Delineamento Experimental

4.6.1 Experimento 1 –Embriões submetidos à pressão hidrostática e vitrificados após diferentes tempos

Neste experimento foram avaliados diferentes momentos entre o tratamento com pressão hidrostática e a realização da vitrificação. A escolha da pressão e tempo utilizados foi definida com base nos resultados obtidos em outros experimentos do nosso grupo (dados não publicados), onde 60 MPa por 1 hora apresentou os melhores resultados nas taxas de sobrevivência e eclosão.

Os embriões foram divididos nos seguintes grupos:

G1 – (controle) – embriões mantidos na incubadora;

G2 – (vitrificados incubadora) – embriões foram mantidos na incubadora até o momento da vitrificação;

G3 – (pressão e vitrificação) – embriões submetidos à pressão de 60 MPa por 1 hora, a vitrificação ocorreu em 3 diferentes tempos:

1 – embriões vitrificados imediatamente após submetidos à pressão hidrostática;

2 – embriões voltaram para a incubadora e foram vitrificados 1 hora após submetidos à pressão hidrostática;

3 – embriões voltaram para a incubadora e foram vitrificados 2 horas após submetidos à pressão hidrostática;

Foram utilizados 69 embriões no grupo controle, 88 no grupo vitrificado incubadora e 247 no grupo pressão e vitrificação dividido entre os diferentes tempos, num total de 5 réplicas. Após a desvitrificação os embriões foram avaliados pela taxa de re-expansão e eclosão após 4, 24, 48 e 72 horas.

4.6.2 Experimento 2 – Avaliação da expressão gênica de embriões bovinos submetidos a pressão hidrostática

Este experimento teve como objetivo avaliar a expressão de alguns genes no exato momento em que os embriões seriam vitrificados, ou seja, os embriões foram submetidos à pressão de 60 MPa por 1 hora e retirados para avaliação de expressão gênica imediatamente, com 1 hora ou 2 horas após a pressão hidrostática.

4.7 Análise Estatística

Os dados relativos à taxa de re-expansão e eclosão dos embriões submetidos a tratamento com pressão hidrostática e vitrificados em diferentes momentos foram analisados por regressão logística, sendo considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

Os dados de expressão gênica que apresentavam distribuição normal foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as diferenças determinadas pelo teste de Tukey. Nos dados não paramétricos, o teste utilizado foi o de Kruskal Wallis, utilizando o programa Prophet, versão 5.0, 1996, sendo considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

Os resultados do experimento 1 estão apresentados na Tabela 3.3 e perfazem 404 embriões obtidos em 5 réplicas. As taxas de re-expansão e eclosão do grupo controle (97%, 97%, 98% e 100% para re-expansão, 23%, 72%, 90% para eclosão), nos diferentes momentos de avaliação, foram superiores aos grupos vitrificados.

Tratamento com pressão hidrostática, nos diferentes momentos de equilíbrio (imediatamente, 1 hora e 2 horas), apresentou melhor resultado na taxa de eclosão comparada com o grupo controle vitrificado. Já o tratamento de pressão com tempo de equilíbrio para vitrificação de 0 (PH imed) e 1 hora (PH 1 hora) melhoraram

significativamente as taxas de re-expansão e eclosão dos blastocistos vitrificados/desvitrificados, comparados com o grupo tratado com pressão seguido de período de equilíbrio de 2 horas (Tabela 3.3).

O grupo PH 1 hora teve o melhor incremento dos grupos avaliados pelas taxas de re-expansão, eclosão e maior velocidade de recuperação dos embriões pós desvitrificação. Mostrando melhores resultado nos diferentes momentos de avaliação quando comparados com o grupo apenas vitrificado (taxa de re-expansão: 88%, 89%, 85 e 90%, taxa de eclosão: 22%, 51 e 75% vs. taxa de re-expansão: 63%, 69%, 71 e 81%., taxa de eclosão: 6%, 43 e 64%).

Tabela 3.3 - Taxa de re-expansão e eclosão de embriões vitrificados após diferentes momentos de equilíbrio pós pressão hidrostática (PH imed – vitrificados imediatamente após a pressão; PH 1 hora - vitrificados após 1 hora e PH 2 horas – vitrificados após 2 horas).

Tratamento	N	4h pós- pressão (%)		24h pós- pressão (%)		48h pós- pressão (%)		72h pós- pressão (%)	
		Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão	Re-expansão	Eclosão
Controle	69	97,1 ^a	23,2 ^a	97,1 ^a	72,46 ^a	98,55 ^a	100 ^a	91,3 ^a	91,3 ^a
Vitrificação	88	63,64 ^c	6,82 ^c	69,32 ^d	43,2 ^c	72,73 ^c	81,82 ^c	63,64 ^d	63,64 ^d
PH imed	88	69,32 ^c	12,5 ^b	80,7 ^c	51,14 ^b	84,1 ^b	88,36 ^b	76,14 ^b	76,14 ^b
PH 1 hora	82	86,6 ^b	21,95 ^a	89,02 ^b	51,22 ^b	85,37 ^b	90,24 ^b	74,95 ^b	74,95 ^b
PH 2 horas	77	76,62 ^c	20,7 ^a	77,92 ^c	49,35 ^b	80,52 ^b	79,22 ^c	70,13 ^c	70,13 ^c

^{a, b, c} Diferentes sobrescritos na coluna, diferem significativamente (P<0.05).

Outra avaliação que demonstrou a superioridade do grupo PH 1 hora foi a melhor qualidade dos embriões na avaliação usando estereomicroscópio, com maior quantidade de embriões grau 1, pela classificação da IETS, principalmente pelas características de coloração dos blastômeros e menor presença de células extrusadas.

No segundo experimento, dos cinco genes avaliados apenas o ERG 25 diferiu entre os grupos, com maior abundância de transcritos no grupo PH 1 hora comparado ao grupo controle, já os tratamentos PH imed e PH 2 horas não diferiram entre os tratamentos (Figura 3.1).

Não foi observada diferença entre os tratamentos nos genes MnSOD, GPX4 e HSP 70. Contudo, foi possível observar um mesmo comportamento entre os diferentes genes avaliados, MnSOD, GPX4, HSP 70 e ERG 25, com um aumento na expressão dos genes no grupo PH 1 hora e posterior retorno do nível de expressão no grupo PH 2 horas (Figura 3.1).

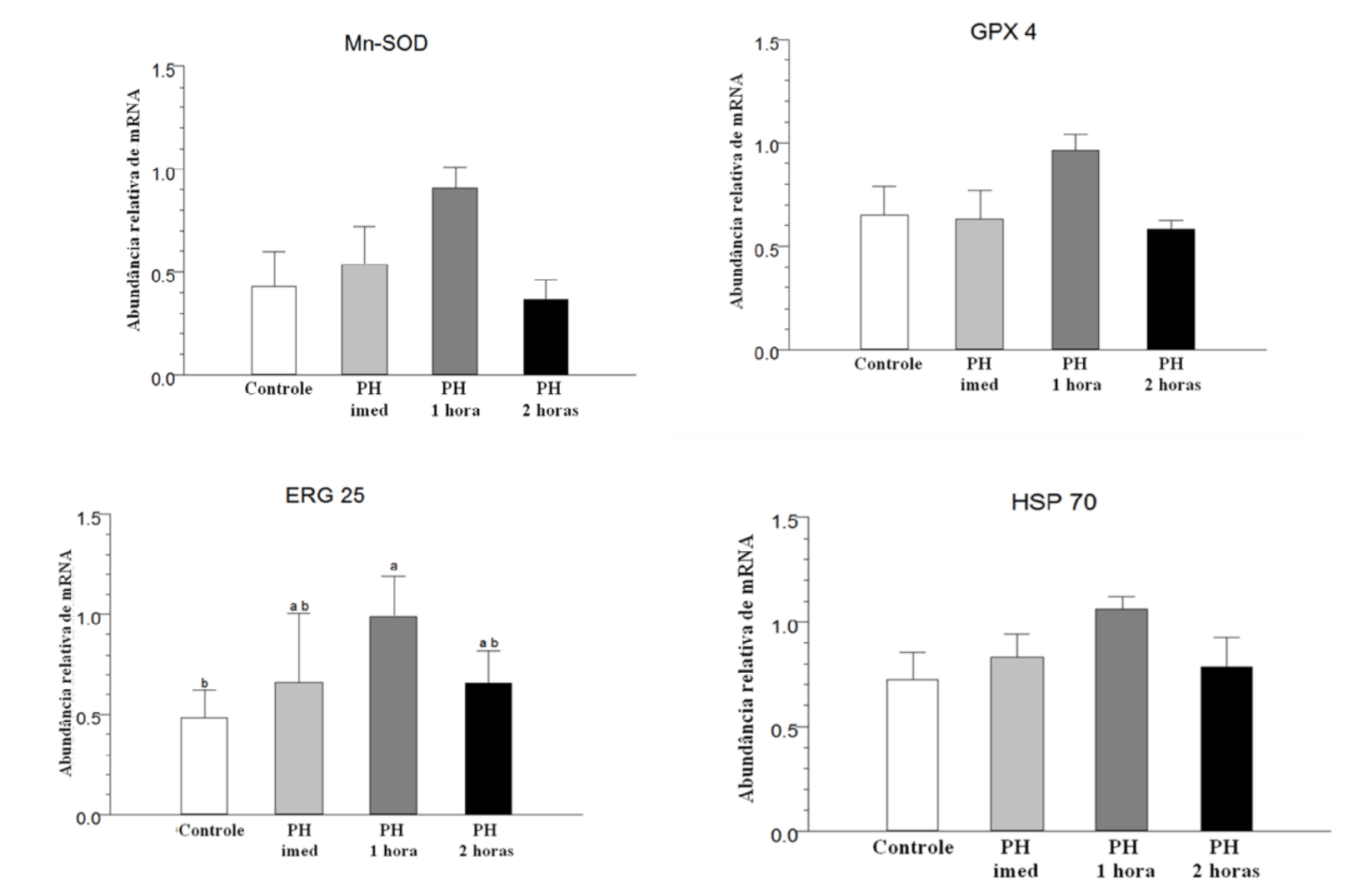


Figura 3.1 – Nível de transcritos de MnSOD, GPX4, ERG 25 e HSP 70 em embriões bovinos PIV submetidos a pressão hidrostática de 60 MPa por 1 hora e avaliados imediatamente, com 1 hora e 2 horas após a pressão. Como grupo controle foram usados embriões que estavam em cultivo *in vitro*. Os dados (média \pm EPM) foram normalizados pelo gene Actina.

a-b Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Avaliando todos os genes agrupados dentro de cada tratamento, controle, PH imed, PH 1 hora e PH 2 horas, o tratamento PH 1 hora apresentou maior quantidade relativa de mRNA ($P < 0,05$) comparado com os demais tratamentos (Figura 3.2).

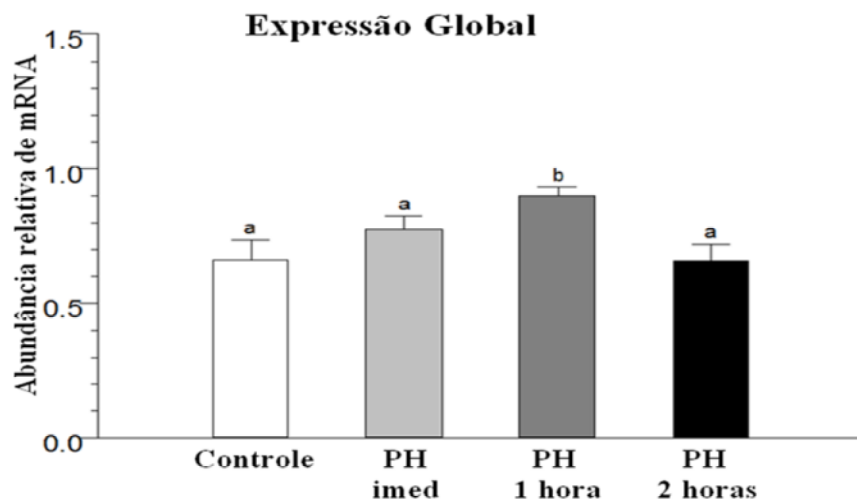


Figura 3.2 – Quantidade relativa de transcritos (Média ± EPM) de todos os genes avaliados (MnSOD, GPX4, HSP 70 e ERG 25) dentro de cada tratamento (controle, pressão imediatamente, pressão + 1 hora e pressão + 2 horas).

a-b Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Não foi detectada expressão do gene CIRP-b nos embriões controle e naqueles submetidos à pressão hidrostática. Um grupo controle positivo (amostra de fígado) foi amplificado juntamente com as amostras deste experimento (Figura 3.3)

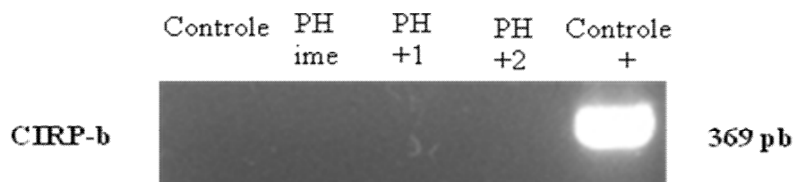


Figura 3.3: Eletroforese em gel de agarose, representando a não amplificação do gene CIRP-b nos grupos controle e tratados com pressão e a alta expressão no controle positivo (C+).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados diferentes momentos entre o tratamento com pressão hidrostática e a vitrificação. Foi observado que existem diferenças nas taxas de re-expansão e eclosão usando os mesmos níveis de pressão e tempo, mas variando o momento para vitrificação após a pressão hidrostática, com melhores resultados nos grupos PH imed e PH 1 hora comparados aos grupos PH 2 horas e vitrificados. Du et al (2008) também encontraram diferenças neste sentido, com melhores taxas de sobrevivência de oócitos porcinos vitrificados após 1 ou 2 horas do tratamento com pressão hidrostática.

Um período de equilíbrio após o tratamento com pressão hidrostática é necessário para aumentar a sobrevivência a um novo estresse, como por exemplo, um novo estresse de pressão ou baixa temperatura. O efeito de proteção foi observado em fungos após pressão (Palhano et al., 2004), iniciando 15 minutos após a descompressão e persistindo por 1 hora. Acredita-se que a maioria dos genes com maior expressão após pressão codificam proteínas relacionadas a proteção de membranas, que depois de produzidas, estabilizam a célula por um determinado período, resultando na proteção contra novos estresses por até 1 hora após a descompressão (Fernandes et al., 2005). Welch et al. (1993) observaram que o aumento de todas as proteínas induzidas pela pressão ocorria entre 0 e 1 hora após a pressão, com uma queda entre 1 e 2 horas e meia. Contudo, algumas proteínas mantiveram altos níveis de síntese até 3 horas após a pressão hidrostática.

Na avaliação de expressão gênica, cinco genes foram selecionados por terem sido relacionados com o aumento de expressão após a pressão hidrostática e por estarem correlacionados com possível efeito benéfico no processo de criopreservação, pela proteção que promoveriam as células. Quantificou-se a expressão relativa dos genes MnSOD e GPX4, relacionados a resposta ao estresse oxidativo (Côrrea et al., 2008); HSP-70 e CIRP-b, expressos após alterações de temperatura, apresentando função de chaperonas (Sonna et al., 2002); e ERG25, participante na via de síntese de ergosterol (Bard et al., 1996), relacionado com proteção de membranas. Foi realizado RT-PCR semi-quantitativo (Lequarré et al., 2001; Nowak-Imialek et al., 2008), usando a Actina como gene de referência.

Inicialmente, a expressão individual dos genes candidatos foi avaliada em cada momento após a pressão hidrostática (PH imed, PH 1 hora e PH 2 horas). A expressão relativa da maioria dos genes foi similar nos diferentes momentos de avaliação, exceto o ERG 25, que mostrou um aumento na expressão no grupo PH 1 hora. Estresses que causam desestabilização da membrana, tais como osmótico, etanol, baixa temperatura e pressão hidrostática, induzem a expressão do gene ERG 25 (Alexandre et al., 2001; Sahara et al., 2002;), que é um esterol desaturase envolvido na biosíntese do ergosterol. O ergosterol é uma molécula similar ao colesterol, contudo apresenta uma cadeia insaturada, já o colesterol apresenta cadeia saturada. A biosíntese deste esterol envolve duas etapas, primeiro de acetato a farnesil pirofosfato e depois a ergosterol. Fernandes et al. (2004) avaliando o padrão de expressão de genes em fungos submetidos a pressão hidrostática, demonstraram que o gene ERG 25 estava altamente expresso, sugerindo que esta molécula pode ser um importante protetor de membranas celulares sob pressão hidrostática.

Embriões bovinos PIV após vitrificados, normalmente tornam-se extremamente vulneráveis aos danos da criopreservação, pelas lesões intracelulares e de membrana (Dinnyés et al., 1999. Pugh et al., 2000, Gómez et al., 2008) e aos processos de resfriamento e descongelamento que resultam em estresse osmótico.

Acredita-se que embriões adquirem uma fragilidade estrutural após o processo de criopreservação, por tornarem-se particularmente susceptíveis a estresse oxidativo causado pelas espécies reativa a oxigênio (ROS) (Caamano et al., 1998; Feugang et al., 2004). Injúrias na membrana plasmática dos blastômeros e a destruição da viabilidade da célula tem sido vinculadas a radicais de oxigênio e ROS (Bilodeau et al., 2000; Ali et al., 2003). Estresse oxidativo ocorre quando ROS não são adequadamente removidos das células e é o causador de muitos tipos de injúrias, incluindo peroxidação lipídica, necroses e apoptoses (Hollwell et al., 1992).

No sistema antioxidante, as SODs são as enzimas iniciais, que permitem a conversão de ânions superóxidos em peróxido de hidrogênio, que por sua vez serão removidos pela GPX e catalase. O aumento da expressão desses genes tem sido relacionado com melhor qualidade do embrião (Rizos et al., 2003; Lonergan et al., 2003) e com maior capacidade de sobrevivência em ambientes adversos, como cultivo sob alta tensão de O₂ (Côrrea et al., 2008).

Pressão hidrostática a partir de 150 MPa induz estresse oxidativo, o dano subletal causado pela pressão resulta num desequilíbrio no balanço metabólico, levando a um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS) (Aertsen et al., 2005). Por causar essa indução do estresse oxidativo, hipotetizou-se que após a pressão hidrostática o embrião teria um aumento de enzimas capazes de promover uma proteção ao estresse oxidativo que seria provocado nos processos subsequentes de vitrificação e desvitrificação. Contudo, o nível de pressão utilizado no presente experimento (60 MPa) não foi suficiente pra elevar a expressão de genes relacionados a estresse oxidativo (MnSOD e GPX4).

A regulação de genes relacionados com resposta a estresse, tais como HSP, podem ser afetadas pela temperatura, pH, agentes químicos, entre outros (Sonna et al., 2002), além disso, as próprias condições do cultivo *in vitro* podem induzir essa expressão (Oliveira et al., 2006). A família das HSP 70 é expressa em células embrionárias (Kawarsky & King, 2001), apresentando maior expressão em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (Balasubramanian et al., 2007), HSP 70 tem sido utilizado como indicador de estresse embrionário.

A pressão hidrostática também atua como agente indutor da expressão de HSP's, como HSP 70. Foi relatado aumento da expressão desse gene após células humanas terem sido submetidas à pressão hidrostática de 30 MPa (Kaarniranta et al., 1998). Neste trabalho, não observou-se o aumento da expressão desse gene em embriões bovinos submetidos à pressão hidrostática, isto pode ser explicado pelo fato do próprio sistema de cultivo onde os embriões foram produzidos, já que foi um sistema *in vitro*, terem induzido uma maior expressão de HSP 70.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os tratamentos nos genes MnSOD, GPX4 e HSP-70, estes apresentaram o mesmo comportamento de expressão gênica, com aumento da expressão relativa do grupo PH 1 hora e posterior diminuição do nível de expressão no grupo PH 2 horas. Por esse comportamento, analisou-se de forma agrupada todos os genes, essa avaliação foi chamada de expressão global. Sendo observada diferença entre o nível de expressão relativa entre o grupo PH 1 hora comparado aos demais momentos pós pressão e ao grupo controle.

Estes resultados sugerem que a pressão hidrostática atua como agente causador de estresse ao embrião, alterando a expressão de genes, chegando num nível máximo

após um determinado período, sendo este o melhor momento para que a célula possa sofrer um novo estresse, pois está preparada com maior quantidade de proteínas de proteção. Essa ativação de genes pode promover o efeito de proteção cruzada, isto pode ser a explicação para a melhora nas taxas de re-expansão e eclosão e na velocidade de re-expansão de embriões vitrificados após o tratamento com pressão hidrostática.

Estas informações permitem concluir que 1 hora após a decompressão é o melhor momento para a criopreservação do embrião, com melhores resultados de re-expansão, eclosão, velocidade na taxa de re-expansão e com melhor qualidade embrionária pós desvitrificação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTSEN, A.; DE SPIEGELEER, P.; VANOIRBEEK, K.; LAVILLA, M.; MICHIELS, C.W. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n 5, p. 2226-2231, 2005.

ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN, S. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 498, p. 98-103, 2001.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, p. 939-949, 2003.

BALASUBRAMANIAN, S.; SON, W.J.; MOHANA KUMAR, B.; OCK, S.A.; YOO, J.G.; IM, G.S.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 265 -675, 2007.

BARD, M.; BRUNER, D.A.; PIERSON, C.A.; LEES, N.D.; BIERMANN, B.; FRYE, L.; KOEGEL, C.; BARBUCH, R. Cloning and characterization of ERG25, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding C-4 sterol methyl oxidase. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 93, p. 186-190, 1996.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

CAAMANO, J.N.; RYOO, Z.Y.; YOUNGS, C.R. Promotion of development of bovine embryos produced in vitro by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 369–374, 1998.

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 132-142, 2008.

DINNYES, A.; LONERGAN, P.; FAIR, T.; BOLAND, M.P.; YANG, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 318–324, 1999.

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

ELLIS, R. J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*, v. 9, p. 328-378, 1987.

FERNANDES, P.M.; DOMITROVIC, T.; KAO, C.M.; KURTENBACH, E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. *FEBS Letters*, v. 556, p. 153-160, 2004.

FERNANDES, P.M.; How does yeast respond to pressure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v39, p. 1239-1245, 2005.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LEONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of [beta]- mercaptoethanol or Trolox(R) at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, v. 61, p. 71–90, 2004.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUNOZ, M. CAAMANO, J.N.; CARROCERA, S. MARTÍN, D.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Development and quality of bovine morulae cultured in serum-free medium with specific retinoid receptor agonists. *Reproduction Fertility and Development*, v. 20, p. 884-891, 2008.

GRAUMANN, P.L.; MARAHIEL, M.A. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Archives of Microbiology*, v. 171, p. 135- 138, 1999.

HOLLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med*, v.119, p. 598–620, 1992.

HUANG, S.Y.; PRIBENSZKY, C.; KUO, Y.H.; TENG, S.H.; CHEN, Y.H.; CHUNG, M.T.; CHIU, Y.F. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, v. 112, p. 136-149, 2009.

KAARNIRANTA, K.; ELO, M.; SIRONEN, R.; LAMMI, M.J.; GOLDRING, M.B.; ERIKSSON, J.E.; SISTONEN, L.; HELMINEN, H.J. Hsp 70 accumulation in condrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides to high stabilization rather than transcriptional activation. **Proceedings National Academy of Sciences of the USA**, v. 95. P. 2319-2324, 1998.

KAWARSKY, S.J.; KING, W.A. Expression and localization of heat shock protein 70 in culture of bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v. 9, p. 39–50, 2001.

KUO, Y.H.; PRIBENSZKY, C.; HUANG, S.Y. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen-thawed boar semen. **Proceedings of the 6th International Conference of Boar Semen Preservation**, 2007.

LA TEANA, A.; BRANDI, A.; FALCONI, M.; SPURIO, R.; PON C.L.; GUALERZI, C.O. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the Escherichia Coli gene encoding nucleoid proteins H-NS. **Proceedings of the National Academy of USA**, v. 23, p. 10907-10911, 1991.

LEQUARRÉ, A.S.; FEUGANG, J.M.; MALHOMME, O.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; DESSY, F.; VAN LANGENDONCKT, A. Expression of Cu/Zn and Mn superoxide dismutases during bovine embryo development: influence of in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 45-53, 2001.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424–1431, 2003.

NOWAK-IMIALEK, M.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LAGUTINA, I.; LEMME, E.; LAZZARI, G.; GALLI, C.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns of histone-associated genes in bovine preimplantation embryos derived from different origins. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 731-743, 2008.

OLIVEIRA, A.T.D.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction Domestic Animal**, v. 41, p.129–36, 2006.

PALHANO, F.L.; GOMES, H.L.; ORLANDO, M.T.D. Pressure response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: from cellular to molecular approaches. **Cellular and Molecular Biology**, v. 50, p. 447-457, 2004.

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

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; ULRICH, P.; KEIKO, L. Improving the post thaw survival of cryopreserved IVP bovine blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Reproduction Domestic Animals** (abstract), v. 40, 2005b.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; KÚTVOLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J. LEDEKER, J. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, p. 181-182, 2007.

PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 9-22, 2000.

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

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADAN, A.; PÉREZ-GARNELO, J.; 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, p. 236-243, 2003.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Savoy, IL: IETS, 1998.

SAHARA, T.; GODA, T.; OHGIYA, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 50015-50021, 2002..

SONNA, L.A.; FUNJITA, J.; GAFFIN, S.; LILLY, C. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725-1742, 2002.

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

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que embriões bovinos produzidos *in vitro* suportam pressão hidrostática num patamar abaixo de 80 MPa.

Alguns níveis e tempos de pressão hidrostática promoveram melhoras nas taxas de re-expansão e eclosão em embriões vitrificados e desvitrificados, o nível de 60MPa por 1 hora apresentou os melhores resultados.

Blastocistos expandidos foram mais barotolerantes e apresentaram melhores resultados quando comparados com blastocistos após vitrificação e desvitrificação.

Foi observado que um período de equilíbrio entre o tratamento com pressão hidrostática e a vitrificação se torna necessário, já que o grupo de embriões vitrificados após 1 hora de serem submetidos a pressão hidrostática apresentavam uma maior velocidade da re-expansão que todos os demais grupos e melhores taxas de eclosão quando comparados aos grupos controle e vitrificado após 2 horas da pressão.

A pressão hidrostática promoveu alterações na ultraestrutura dos embriões, aumentando a quantidade de microvilosidades e de mitocôndrias *hooded*. Essas características na célula embrionária podem estar relacionadas com os melhores resultados após a vitrificação, pois embriões que passaram pela pressão e foram vitrificados apresentavam maior quantidade de núcleos por área de MCI.

Além disso, a expressão gênica também sofreu mudanças quando as células embrionárias foram submetidas a pressão. Dos genes avaliados, apenas o ERG 25 apresentou maior quantidade de transcritos no grupo PH 1 hora quando comparado ao grupo controle. Contudo, todos os genes apresentavam um mesmo comportamento, com aumento da expressão após 1 hora e retorno após 2 horas, e quando agrupamos todos os genes, avaliando a expressão global, foi observado uma maior expressão dos genes no grupo PH 1 hora comparado aos demais grupos.

Nossos resultados mostraram que a aplicação do tratamento com pressão hidrostática antes da vitrificação pode melhorar a velocidade de desenvolvimento e as taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV, podendo ser utilizado como ferramenta no procedimento de criopreservação.