

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

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
EXPOSTOS À ALTA PRESSÃO GASOSA NO ESTÁDIO DE MÓRULA (D5) E
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO NO ESTÁDIO DE BLASTOCISTO
(D7).**

Autora: Camila Rodrigues de Freitas

PORTO ALEGRE

2019

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

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
EXPOSTOS À ALTA PRESSÃO GASOSA NO ESTÁDIO DE MÓRULA (D5) E
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO NO ESTÁDIO DE BLASTOCISTO
(D7).**

Autor: Camila Rodrigues de Freitas

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

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE

2019

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

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues de Freitas, Camila
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO
EXPOSTOS À ALTA PRESSÃO GASOSA NO ESTÁDIO DE MÓRULA
(D5) E SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO NO ESTÁDIO DE
BLASTOCISTO (D7). / Camila Rodrigues de Freitas. --
2019.

47 f.

Orientador: José Luiz Rigo Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. alta pressão gasosa. 2. criopreservação. 3.
cinética. 4. mórulas. 5. PIVE. I. Rigo Rodrigues, José
Luiz, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Camila Rodrigues de Freitas

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
EXPOSTOS À ALTA PRESSÃO GASOSA NO ESTÁDIO DE MÓRULA (D5) E
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO NO ESTÁDIO DE BLASTOCISTO
(D7)**

Aprovado em 26 de março de 2019.

APROVADO POR:

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues, Orientador
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Adriana Bos Mikich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus e aos Espíritos de Luz, que me enviam forças e energias positivas para que eu possa gradativamente alcançar todos os meus objetivos.

Agradeço ao professor Dr. José Luiz Rodrigues pela grande oportunidade de cursar o mestrado no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução. Sou grata pela paciência e empenho, agradeço também pelo engrandecimento profissional e pessoal que estes dois anos de convívio me proporcionaram. Agradeço ao professor Dr. Marcelo Bertolini, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais repassados, por ser um exemplo de superação e por sempre me incentivar a acreditar em mim e em meus princípios.

À Universidade Federal Do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Veterinária por me oportunizar formação e aperfeiçoamento de excelência. À equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, sempre dispostos em ajudar: Bruno Becker, Eduardo Sanguinet, Andressa Varella, Higor Ferreira, Louise Fontoura, Favorino Collares, Paula Vieiro, Karine Campagnolo, German Holguin, João Roberto Moraes e os demais estagiários que por aqui cruzaram durante esse período.

Agradeço aos meus grandes amigos Marco Antônio e Erica Lehmen que sempre estiveram ao meu lado, obrigada pela amizade verdadeira.

Agradeço de forma especial aos meus tios do coração Dr. Gilberto e Keila Rodrigues de Freitas que me auxiliaram nesta trajetória, fornecendo subsídios para que eu pudesse concluir este sonho.

Agradeço infinitamente ao meu namorado, Thiago Luiz Noetzold, por seu amor e paciência, por ser meu ponto de equilíbrio. Sou grata a meus queridos sogros Elisabete e Edson que são meus exemplos de vida!

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais. Obrigada minha doce Mãezinha, que com sua garra e perseverança me inspira a cada dia. Você é a minha Guerreira! Obrigada pai, por ter sido sempre tão atencioso e presente durante minha vida acadêmica e por ter me fornecido subsídios para chegar até aqui.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A indução de estresse subletal em embriões mamíferos tem sido relacionada com uma maior resistência embrionária ao processo de criopreservação. A alta pressão gasosa (HGP) é uma alternativa que vem sendo estudada como um agente estressante capaz de desencadear esta resposta. Os objetivos do primeiro experimento foram determinar a sobrevivência de mórulas bovinas PIV expostas à HGP de 27,6 MPa por 120 min. no D5 do CIV e avaliar o efeito da HGP sobre a cinética do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto eclodido. O objetivo segundo experimento foi determinar a viabilidade pós criopreservação de blastocistos PIV (D7) expostos à HGP de 27,6 MPa por 120 min. no estágio de mórula (D5). No primeiro experimento, a taxa média de clivagem foi de 67,70% e a taxa média de desenvolvimento embrionário ao estágio de mórula (grau I) de 28,80%. Não foi observada diferença significativa ($P>0.05$) na sobrevivência embrionária expressa pela taxa de blastocisto (D7) (blastocisto/mórula), com 55,37% no grupo submetido à pressão e 56,25% no grupo controle. A cinética de desenvolvimento embrionário determinada no D7 (blastocisto expandido) do CIV foi reduzida no grupo exposto à pressão, quando comparada aos embriões do grupo controle (31,07 % vs. 55,56%). Por outro lado, não houve diferença na cinética do desenvolvimento embrionário quando se determinou as taxas de eclosão dos blastocistos dos grupos experimentais, controle e HGP, respectivamente, no D8 (19,44% vs. 10,68%), D9 (52,78% vs. 53,40%) e D10 (63,89% vs. 60,19%). No experimento 2, a taxa média de clivagem foi de 73,08% e a taxa média de desenvolvimento embrionário ao estágio de mórula (grau I) de 28,10%. As taxas de desenvolvimento das mórulas ao estágio de blastocisto foram semelhantes entre os grupos submetido à HGP e o controle (65,03% vs. 73,38%, respectivamente). Após a criopreservação não foram observadas diferenças entre as taxas de re-expansão dos embriões expostos à HGP e os do grupo controle (60,70% vs. 52,80 %), revelando também as taxas de eclosão dos blastocistos dos grupos pressão e controle números semelhantes, respectivamente: D8 (21,0 % vs 21,28%), D9 (28,0% vs. 30,85%) e D10 (29,0% vs. 32,98%). Os resultados dos experimentos realizados permitiram determinar que a exposição de mórulas D5 à 27,6 de HGP por 120 min., não alterou a viabilidade embrionária em alcançar o estágio de blastocisto (D7) e também não alterou a capacidade de eclosão dos blastocistos pós criopreservação.

Palavras-Chave: alta pressão gasosa, criopreservação, cinética, mórulas, PIVE

ABSTRACT

Previous embryo sublethal stress exposure is related to a greater embryonic resistance during cryopreservation process. High Gaseous Pressure (HGP) is an alternative that we are looking as a stress agent capable to induce this embryonic response. The objectives of the first experiment were to determine the survival of bovine PIV morula (D5) exposed to HGP (27.6 MPa / 120 min.) and evaluate the kinetics of the embryonic development to the hatching blastocyst stage. In a second experiment the blastocyst viability after cryopreservation was determined. The embryos produced during the first experiment showed 67.70% cleavage rate and 28.8% from then developed to the morula (grade 1) stage. The development to the blastocyst stage was similar among the stressed and not stressed morulae, respectively, 55.37 vs. 56.25. The cell cycle velocity after stress to achieve on D7 the blastocyst expanded stage was higher in the embryos of the control group (55.56 % vs. 31.07%). On the other hand the embryo development kinetics were similar among not stressed and stressed morulae when we look at the blastocyst hatching rates at D8 (19.44% vs. 10.68%), D9 (52.78% vs. 53.40%) and D10 (63.89% vs. 60.19%). The cleavage rate observed in experiment 2 was 73.08% and embryo development rate to the morula stage was 28.10%. The morula development to blastocyst stage were similar among the embryos from the experimental groups, stressed vs. not stressed, respectively, 65.03% vs. 73.38%. After cryopreservation no differences were observed between the re-expansion rates of the embryos exposed to HGP and those of the control group (60.7% vs. 52.8%). Also similar hatching blastocyst rates were observed among the stressed and not stressed embryos on D8 (21.0% vs. 21.28%), D9 (28.0% vs. 30.85%) and D10 (29.0% vs. 32.98%). The results of the experiments showed that the exposure of D5 morula to 27.6 of HGP for 2 h did not alter the embryo viability to reach the blastocyst stage (D7) and also did not alter the blastocyst viability after cryopreservation.

Keywords: high gaseous pressure, cryopreservation, kinetics, sublethal stress, morula, in vitro embryo production

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Produção de embriões bovinos no Brasil no período 1995-2015.....14
- Figura 2** - Percentual de produção total de embriões das subespécies *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus* no Brasil, de 2005 a 2015.....15
- Figura 3** - *Pool* de mórulas D526
- Figura 4**- Taxas de desenvolvimento embrionário a exposição das mórulas à HGP no D5.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção <i>in vitro</i> de mórulas (D5).....	28
Tabela 2 - Taxa de eclosão no D8, D9 e D10 do CIV de embriões expostos à HGP no estágio de mórula (D5).....	30
Tabela 3 – Taxa de desenvolvimento de mórulas (D5) expostas à HGP ao estágio de blastocisto (D7).....	30
Tabela 4 -Taxas de recuperação e re-expansão (24h pós descongelamento) de blastocistos bovinos PIV submetidos à HGP no D5 e criopreservados no D7.....	30
Tabela 5 - Taxas de eclosão nos D8, D9, D10 de blastocistos bovinos PIV submetidos à HGP no D5 e criopreservados no D7.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

μL	Microlitros
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
Bx	Blastocisto expandido
°C	Celsius
CIV	Cultivo in vitro
COC's	Complexos <i>Cumullus Oócitos</i>
CO2	Dióxido de carbono gasoso
D0	Dia 0
D5	Dia 5
D7	Dia 7
D8	Dia 8
D9	Dia 9
D10	Dia 10
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
h	Hora
HGP	Alta pressão Gasosa (High Gaseous Pressure)
HHP	Alta pressão hidrostática (High Hydrostatic Pressure)
hpf	Horas após a fecundação
hpi	Horas pós inseminação
IA	Inseminação artificial
IVD	<i>in vivo</i> derived
IVP	Produção <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> production)
M	Molar
MCC	Mórula controle congelamento
MCF	Mórula controle fresco
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
min.	Minutos
MPa	Megapascal
mPBS	Tampão fosfato-salino modificado (Modified phosphate saline buffer)
MPC	Mórula pressão congelamento
MPF	Mórula pressão fresco

N ₂	Nitrogênio Líquido
O ₂	Oxigênio gasoso
OPS	<i>Open Pulled Straw</i>
OPU	<i>Ovum pick up</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
s.	Segundo
SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido de Oviduto Sintético (Synthetic oviductal fluid)
vs.	Versus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Produção <i>in vitro</i> de Embriões	13
2.2 Exposição de microorganismos à pressão hidrostática	16
2.3 Exposição de gametas e embriões mamíferos a altas pressões	17
2.4 Pressão Gasosa	19
2.5 Criopreservação de Embriões	20
2.6 Princípios da Criopreservação	21
2.7. Congelamento Convencional	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Local de Realização dos Experimentos	23
3.2 Meios de Cultura e Reagentes	23
3.3 Produção <i>in vitro</i> de Embriões	23
3.3.1 PROCEDÊNCIA E DESTINO DOS OVÁRIOS	24
3.3.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E SELEÇÃO DOS OÓCITOS ..	24
3.3.3 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	24
3.3.4 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	25
3.3.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	25
3.4 Grupos Experimentais	26
3. 4.1 EXPERIMENTO 1	26
3.4.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i> PÓS EXPOSIÇÃO À HGP.....	27
3.4.3 EXPERIMENTO 2	27
3.4.4 CONGELAMENTO DE EMBRIÕES	27
3.4.5 DESCONGELAMENTO DE EMBRIÕES	28
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	36
8. PERSPECTIVAS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXO I: Tabela de conversão de unidades de Pressão.....	46
ANEXO II: Artigo científico.....	47

1. INTRODUÇÃO

Durante a década de 90 o Brasil deu um grande salto na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos. Inicialmente a técnica era complexa e com alto custo de implementação, limitando-se ao emprego experimental. Porém, o gradual domínio do procedimento e conseqüente aprimoramento, a PIVE evoluiu em números. De acordo com Gonçalves e Viana *et al.* (2019), o Brasil é hoje considerado referência mundial no emprego dessa técnica de reprodução assistida.

Um dos principais entraves para uma maior eficiência da PIVE é a sensibilidade ao processo de criopreservação que os embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam. Quando comparados com os embriões produzidos *in vivo* (IVD – *in vitro derived*), eles revelam maior fragilidade da zona pelúcida, possuem menor densidade, citoplasma mais escuro e apresentam maior acúmulo de lipídios citoplasmático (POLLARD e LEIBO, 1993; SUDANO *et al.*, 2012), trazendo como consequência, uma redução da viabilidade após o descongelamento.

Em virtude desta reduzida viabilidade, no âmbito da atividade comercial, a criopreservação de embriões tem sido subutilizada. No ano de 2015, mais de 75% (303.262/402.131) das transferências de embriões PIV realizadas no mundo, foram de embriões não criopreservados, sendo apenas 24,6% (98.869) realizadas com embriões criopreservados (PERRY, 2017). De acordo com PERRY (2017) faz-se necessário identificar estratégias que permitam alcançar uma maior eficiência na criopreservação de embriões PIV.

Levando em consideração a assertiva acima, na última década, um grupo de pesquisadores húngaros propôs um procedimento alternativo de indução de estresse celular subletal, objetivando proporcionar aos embriões PIV maior resistência à criopreservação (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a e 2005b; BOCK *et al.*, 2010; TRIGAL *et al.*, 2013; JIANG *et al.* 2016). A ideia tem origem na exposição de microorganismos à alta pressão hidrostática (HHP "*High Hydrostatic Pressure*"), que inicialmente foi descrito na conservação de alimentos (HITE, 1899). A exposição de bactérias à HHP revelou um efeito de proteção cruzada, conferindo resistência a estresses subsequentes (KARATZAS e BENNIK, 2002). Células embrionárias submetidas à um estresse tolerável (neste caso, elevação da pressão) também desenvolveram um mecanismo de defesa, uma “adaptação transitória ou permanente” com mudanças fisiológicas, que podem lhes conferir uma maior tolerância a estresses subsequentes (PRIBENSZKY *et al.*,

2010).

Seguindo o princípio da indução de um estresse subletal por meio da exposição a elevadas pressões, Rodrigues *et al.* (2012) adaptaram uma câmara de pressão, com objetivo de gerar um estresse subletal nas células embrionárias por meio de alta pressão gasosa (*High Gaseous Pressure* - HGP). Inicialmente, os pesquisadores submetem oócitos caninos à HGP de 7,7 MPa (anexo 1: tabela de conversão de unidades de pressão) exercida pelo N₂ gasoso durante 1 h. Os resultados não revelaram diferenças na capacidade de maturar *in vitro* dos oócitos caninos expostos à HGP. Em sequência outros experimentos foram realizados avaliando o efeito da exposição de embriões murinos e bovinos à HGP (COLLARES, 2014; BECKER 2016; MENTZ, 2018 e GONSIOROSKI, 2018).

Baseado no princípio da exposição de embriões ao estresse subletal, foram desenvolvidos dois experimentos, com os objetivos de inicialmente, determinar a sobrevivência de mórulas bovinas PIV expostas à HGP de 27,6 MPa por 120 min. no D5 do CIV e avaliar o efeito da HGP sobre a cinética do desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto eclodido (D8 – D10). Segundo, determinar se a exposição de mórulas no D5 à HGP afeta a viabilidade de B1 no D7.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de Embriões

De acordo com Rodrigues e Bertolini (2016) a partir do final do século XIX com o maior controle dos processos reprodutivos em animais, houve um avanço no desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida. Historicamente, as biotecnologias são classificadas em quatro gerações. A primeira compreende o advento da inseminação artificial (IA) e o congelamento de gametas. Na segunda geração ocorreu o desenvolvimento de técnicas de múltipla ovulação e transferência de embrião (TE) e posteriormente houve o desenvolvimento da PIVE. Atualmente desenvolve-se a quarta geração, que inclui a produção de clones por transferência nuclear, produção de transgênicos, edição genômica e a biologia das células-tronco.

Já em meados da década de sessenta do século XX, Edwards (1965) havia estabelecido as condições para MIV de COCs, após este avanço no domínio do procedimento, houve o relato da primeira fecundação *in vitro* (FIV) com espermatozoides

capacitados *in vivo* (IRITANI e NIWA,1977). Em 1987 foi relatado o nascimento de gêmeos bovinos originários de embriões produzidos totalmente *in vitro* (LU *et al.*, 1987).

No Brasil, até o final da década de 90, a PIVE limitava-se quase que exclusivamente à utilização experimental, pois envolvia uma técnica complexa e com alto custo de implementação. Entretanto, alguns anos mais tarde, o Brasil tornava-se o país número 1 no *ranking* mundial de PIVE em escala comercial, sendo considerado referência na produção e utilização dessa biotécnica (VIANA *et al.*, 2010, VIANA *et al.*, 2016) (Figura 1).

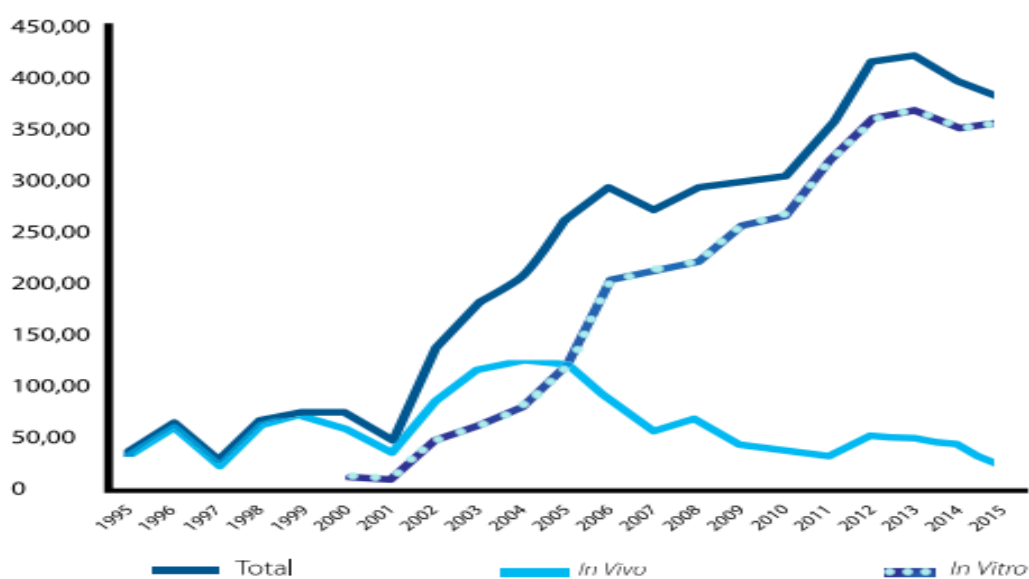


Figura 1: Produção de embriões bovinos no Brasil no período 1995-2015 por produção *in vitro* (PIV), *in vivo* (TE) e total (PIV+TE). Fonte: Viana e Figueiredo (2016), p. 7.

A expansão da PIVE é explicada principalmente pelo expressivo volume do rebanho bovino brasileiro (mais de 217 milhões de cabeças - MAPA, 2017), composto em grande parte por animais de raças zebuínas e mestiças. Estas raças apresentam particularidades da fisiologia ovariana que proporcionam um maior número de oócitos recuperados por sessão de aspiração folicular, associado a taxas aceitáveis de desenvolvimento embrionário *in vitro* (GONÇALVES e VIANA, 2019).

Além disso, a PIVE em animais zebuínos conseguiu superar algumas limitações da TE, como por exemplo, a ausência dos tratamentos superovulatórios, para realização da OPU (KRUIP,1994). O uso da PIVE pode reduzir o intervalo entre gerações, pois permite a realização de OPU – FIV em bezerras impúberes (TANEJA, 2000), além de possibilitar o aproveitamento de vacas com infertilidade adquirida (GARCIA *et al.*, 1999), vacas

prenhes até o sexto mês de gestação (SAUVÉ, 1998) e vacas com idade avançada (KRUIP,1994).

No Brasil, foi observada uma inversão no cenário da PIVE, inicialmente a produção de embriões era realizada especialmente em bovinos de origem zebuína, porém, atualmente há uma maior percentagem de embriões produzidos de origem *Bos taurus taurus* e de raças híbridas (Figura 2, VIANA *et al.*, 2017), tornando o perfil da atividade no Brasil semelhante a outras regiões do mundo (GONÇALVES e VIANA, 2019). Este fato é atribuído principalmente à utilização de sêmen sexado, proporcionando a produção de bezerras de alto mérito genético em rebanhos leiteiros (PONTES *et al.*, 2010) e a melhoria da eficiência da PIVE comercial (VIANA *et al.*, 2017).

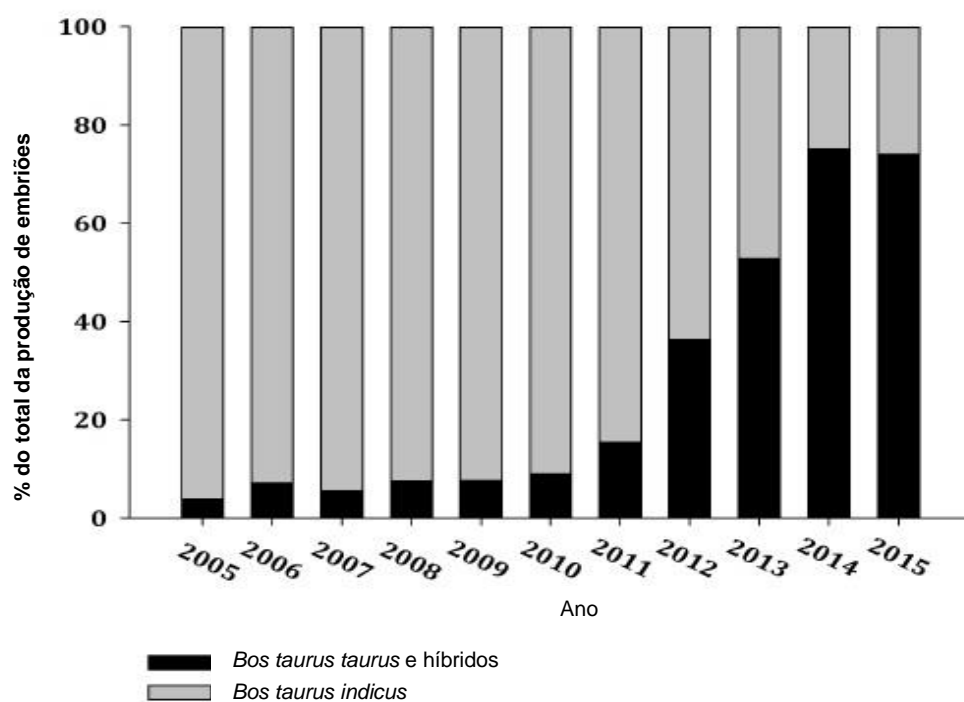


Figura 2: Percentual de produção total de embriões das subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, no Brasil, de 2005 a 2015. Fonte: Adaptado Viana *et al.*(2017).

De acordo com PERRY (2017) o ano de 2017 foi histórico para a PIVE, pois o número de embriões PIV no mundo superou pela primeira vez o volume de embriões IVD: 666.215 vs. 632.638. Ainda de acordo com o mesmo autor, em 2017 o Brasil perdeu o posto de líder mundial de produção de embriões PIV para os EUA, que registraram um número maior (421.123 vs. 345.528,). Entretanto, o Brasil continua sendo uma referência no emprego desta técnica, respondendo por 34,8% da produção mundial

(VIANA, 2018) e à 65% dos embriões PIV inovulados no mundo (275.918 embriões) (PERRY, 2017).

As perspectivas são de que a demanda no comércio de embriões continuará aumentando, estimulando maior participação de grandes empresas do setor pecuário, de maneira semelhante como é observado atualmente na indústria de sêmen bovino (VIANA *et al.*, 2017).

2.2 Exposição de microorganismos à HHP

O emprego da HHP na indústria alimentícia é uma realidade, a tecnologia tem sido amplamente utilizada na conservação de alimentos, como vegetais, carnes e laticínios. Nos Estados Unidos da América, a HHP foi oficialmente aprovada em 2012 como uma tecnologia de pasteurização não térmica, que pode substituir a pasteurização tradicional (HUANG *et al.*, 2017).

Hite (1899) e colaboradores foram pioneiros nesta área de pesquisa, realizando experimentos com a utilização da HHP na conservação de alimentos, especificamente leite, carnes e suco de frutas. O autor reportou que o leite exposto à 600 MPa durante 60min., em temperatura ambiente (24-27°C), mantinha suas características organolépticas, como o sabor doce característico, por um período maior de tempo, comparado ao leite que não recebeu tratamento. Da mesma forma, a exposição à HHP pode ser utilizada para aumentar o tempo de vida útil de sucos de frutas, por retardar a deterioração desses alimentos pela ação microbiana.

Por outro lado, uma observação interessante da época é de que a exposição de alimentos de origem vegetal à HHP não obteve êxito, devido à presença de bactérias formadoras de esporos, as quais apresentavam grande resistência ao procedimento empregado (HITE *et al.*, 1914).

Metrick *et al.* (1989) expuseram diretamente bactérias *Salmonella typhimurium* à HHP de 340 Mpa, e também observaram a existência de uma pequena fração bacteriana resistente, que sobreviveu ao estresse induzido pela HHP.

Em outro estudo, bactérias *Escherichia Coli* foram expostas sucessivas vezes à HHP, após 18 ciclos de repetição foram isoladas três estirpes mutantes resistentes à HHP, com diferentes temperaturas de crescimento (30, 37 e 40 °C). As três estirpes resistentes à HHP, assim como a estirpe de origem (não exposta à HHP), foram submetidas a um teste de termotolerância, verificaram que duas, das três estirpes mutantes, foram mais

resistentes a temperaturas de 58 e 60°C, quando comparadas com a estirpe de origem (HAUBEN *et al.*, 1997).

Posteriormente, a resistência à HHP também foi relatada em colônias de *Listeria monocytogenes*. Porém, desta vez, após uma única exposição à 400 MPa durante 20 minutos, foi isolada uma cepa piezotolerante denominada AK01, que apresentou maior resistência ao calor, ao ácido e ao peróxido de hidrogênio, comparada com sua cepa de origem. Karatzas e Bennik (2002) diferentemente dos achados de Metrick *et al.* (1989), ao testarem a permanência da piezotolerância ao longo das gerações, observaram que a estirpe AK01 mantinha-se resistente por pelo menos 40 gerações, sugerindo um fenótipo estável, não apenas uma adaptação de curto período. Apesar de não estarem claros os mecanismos envolvidos no aumento da resistência da cepa piezotolerante, os autores destacaram que este poderia ser atribuído a alterações da expressão de genes, que levam a produção de proteínas, pois em resposta ao estresse foram observadas proteínas expressas na cepa AK01, inexistentes na cepa de origem.

2.3 Exposição de gametas e embriões mamíferos a altas pressões

A exposição de microorganismos à HHP, especialmente bactérias, demonstrou *a priori*, um efeito de proteção cruzada, conferindo resistência a estresses subsequentes (KARATZAS e BENNIK, 2002). Fisiologicamente, as células estão expostas a pressões inferiores à 0,2 MPa (PRIBENSZKY e VAJTA, 2011), entretanto, ao serem submetidas ao estresse tolerável (neste caso, elevação da pressão) também desenvolvem um mecanismo de defesa, uma “adaptação transitória ou permanente” com mudanças fisiológicas, que podem lhes conferir uma maior tolerância a estresses subsequentes (PRIBENSZKY *et al.*, 2010). Estes fatos estimularam a realização de experimentos sobre a aplicabilidade da HHP no âmbito da reprodução animal.

Inicialmente Pribenszky *et al.* (2005a) em um estudo piloto, avaliaram a exposição prévia à vitrificação de embriões murinos no estágio de blastocisto expandido (Bx) à 60 MPa durante 30 min. Os autores observaram que a exposição à HHP acelerou o processo de re-expansão (4 a 6h vs 20h) e aumentou a taxa de sobrevivência embrionária (98% vs 46%).

Posteriormente, os mesmos autores avaliaram o comportamento dos embriões murinos ao serem expostos a variadas condições de pressão. Este experimento revelou dois fatores importantes e norteadores para continuidade dos estudos nesta área: a

sobrevivência embrionária depende do binômio tempo e magnitude de exposição à HHP (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a). Além dessas variáveis também tem importância a espécie, o estágio de desenvolvimento embrionário e a temperatura (BOCK *et al.*, 2010). A velocidade de despressurização da câmara também deve ser controlada, pois influencia a capacidade de sobrevivência das células embrionárias, devendo ser realizada de forma gradual (PRIBENSZKY *et al.*, 2004).

Quando embriões murinos foram expostos por longos períodos ou grandes magnitudes de HHP (30 MPa por 5 h ou 90 MPa por 2 h.) ocorreu o colapso dos embriões dentro da zona pelúcida, com o desaparecimento da blastocela e diminuição do tamanho dos blastômeros (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a). Os embriões desintegraram logo após a descompressão ou em um período de até duas horas. Porém, quando expostos a condições de forma mediana (90 MPa por 30 min. ou 30 MPa por 3 h), os embriões apresentaram alterações morfológicas, semelhantes ao primeiro grupo, mas retornaram a morfologia fisiológica em um intervalo de 4 a 5 h no CIV, re-expandindo e eclodindo com comportamento semelhante ao observado nos embriões do grupo controle não tratado (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a)

PRIBENSZKY *et al.* (2005b) avaliaram a aplicabilidade da HHP em embriões bovinos no estágio de blastocisto expandido, prévio ao processo de criopreservação por congelamento convencional. Após o descongelamento, os resultados revelaram que a exposição dos embriões à 80 MPa por 45 min. aumentou significativamente a taxa de sobrevivência embrionária comparada aos embriões não expostos à HHP (81% vs. 41%)

PRIBENSZKY *et al.* (2008) expuseram blastocistos bovinos à 60 MPa durante 60 min. e após determinaram o efeito de dois períodos de CIV, 60 min. ou 120 min., prévios à vitrificação sobre a capacidade dos embriões em re-expandir e eclodir. Os resultados mostraram que o grupo exposto à HHP seguido do intervalo de 60 min. proporcionou taxas de re-expansão e eclosão pós aquecimento superiores às observadas nos blastocistos do grupo controle e nos embriões do grupo CIV durante 120 min.

Bock *et al.*, (2010) além dos efeitos sobre a morfologia embrionária, examinaram as alterações moleculares causadas pela indução do estresse subletal através da exposição à HHP. Os resultados revelaram alterações na expressão gênica de blastocistos murinos, com maior expressão de genes relacionados ao estresse, sendo estes, considerados pelos autores elementos-chaves para um mecanismo de defesa posterior.

De acordo com Bock *et al.* (2016) embriões murinos de quatro células derivados de COCs expostos à 20 MPa durante 20 min., tiveram alteração na transcrição de genes

de resistência, logo após a fecundação, com diferentes genes apresentando infra-regulação. Isso levou os autores a acreditarem que o estresse da HHP inibe a biossíntese nos ribossomos durante o desenvolvimento embrionário inicial, reduzindo o metabolismo e com isto gerando uma economia de energia intracelular.

Por outro lado, JIANG *et al.* (2016) vitrificaram BI bovinos após a exposição a três magnitudes de HHP (40, 60 e 80 MPa), relacionadas a três períodos de cultivo *in vitro* pós exposição (0, 1h e 2h). Após o reaquecimento, os autores observaram que os grupos expostos a 40 ou 60 MPa apresentaram taxas de re-expansão maiores que o controle não exposto. Porém, o grupo de embriões expostos à 80 MPa apresentou taxas de re-expansão inferior à observada nos embriões do grupo controle. A análise da expressão gênica revelou que os embriões dos grupos expostos à 40 ou 60 MPa apresentaram uma infra regulação de genes associados com morte celular e apoptose, e uma supra regulação de genes relacionados com processamento de RNA, crescimento e proliferação celular.

Além de embriões e oócitos, a indução de estresse subletal pela exposição à HHP tem proporcionado melhor viabilidade ao sêmen fresco e congelado de touros (PRIBENSZKY *et al.*, 2006, PRIBENSZKY *et al.*, 2007) suínos (HORVÁTH *et al.*, 2016) e javalis (HORVÁTH *et al.*, 2018, HUANG *et al.*, 2009, PRIBENSZKY *et al.*, 2011), aumentando a motilidade e a manutenção da integridade morfológica dos espermatozoides pós-descongelamento.

2.4 Pressão Gasosa

Seguindo o princípio da indução de um estresse subletal por meio da exposição à elevadas pressões, Rodrigues *et al.* (2012) adaptaram uma câmara de pressão gasosa. Inicialmente, os pesquisadores submeteram oócitos caninos à HGP de 7,7 MPa exercida pelo N₂ gasoso durante 120min., com objetivo de aumentar o número de oócitos que atingiam a metáfase II da MIV. Os resultados não apontaram diferenças significativas entre o grupo de oócitos expostos e não expostos à HGP, revelando não haver efeito deletério da HGP sobre a capacidade de maturação dos oócitos.

No mesmo laboratório Collares (2014) expôs embriões murinos no estágio de 8-células à HGP (15,7Mpa) por dois períodos de tempo (2 ou 4 horas) prévio ao congelamento convencional no estágio de blastocisto. Os resultados revelaram taxas semelhantes de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto em todos os grupos, expostos e não expostos à HGP e nos diferentes tempos de exposição. Após o

descongelamento, foi observada uma maior taxa de re-expansão dos blastocistos do grupo exposto à HGP durante 2 horas (86,3% - 63/73), em relação ao controle (72,8% - 67/92). Não foi observada alteração nos padrões da expressão gênica dos embriões, provavelmente de acordo com o autor, isso se deveu à variação biológica dos embriões entre os grupos e dentro de um mesmo grupo.

Em outro experimento, Becker (2016) avaliou o binômio tempo *vs.* magnitude de exposição à pressão. Ao expôr blastocistos murinos a quatro diferentes tratamentos com HGP (20,7MPa / 2 e 4 h; 27,6MPa / 2 h e 34,5MPa / 2 h) e após cultivá-los *in vitro* por 72 h, o autor não encontrou diferenças na morfologia embrionária e entre as taxas de eclosão dos embriões dos grupos experimentais e dos grupos controle. Em um segundo experimento os autores empregando os mesmos tratamentos de exposição à HGP do anterior e após o congelamento os blastocistos, observou que após o descongelamento a taxa de eclosão dos embriões do grupo exposto à HGP de 34,5 MPa/2 h foi superior ($P < 0.05$) ao controle (106/151-70,2% *vs.* 78/133-58,6%). Os resultados revelaram que houve uma alteração positiva no comportamento dos blastocistos previamente estressados em resposta ao estresse celular subsequente provocado pela criopreservação.

Mentz (2018) em outro experimento no nosso grupo de pesquisa, observou em embriões bovinos no estágio de blastocisto, que a exposição à 27,6 MPa durante 120 min. prévia ao congelamento, causou uma alteração na expressão dos genes CASP7 e NET1. O gene CASP7 apresentou uma infra-regulação 120 min. após a exposição à HGP e 120 min. após o descongelamento. Por ser um gene pró-apoptótico, a menor expressão deste gene poderia implicar em maior resistência frente a uma situação de estresse e consequentemente maior sobrevivência embrionária. Já o gene NET1, que está relacionado com fenômenos de migração, proliferação e diferenciação celular, apresentou uma supra regulação nos dois momentos da determinação da expressão gênica, podendo indicar uma maior multiplicação celular após exposição à HGP.

2.5 Criopreservação de Embriões

A criopreservação de embriões tem por objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, possibilitando o armazenamento de genomas envolvidos em programas de melhoramento e seleção animal, propiciando a formação de bancos de germoplasma (VAJTA, 2000). Outros benefícios da criopreservação, incluem a preservação de espécies ou raças que estejam ameaçadas de extinção, facilidade de

transporte de gametas e embriões entre áreas geograficamente distintas, incentivando a importação e exportação de material genético (MAZUR *et al.*, 2008).

2.6 Princípios da Criopreservação

Um dos princípios para a realização da criopreservação clássica é a necessidade da remoção de água intracelular durante o resfriamento. A água que está presente no interior da célula é substituída pelo crioprotetor e o embrião vai desidratando à medida em ocorre o decréscimo gradual da temperatura, até ser mergulhado em nitrogênio líquido. A desidratação celular é imprescindível para que se reduzam os danos celulares devidos a formação de cristais de gelo, do choque osmótico e do aumento da toxicidade decorrente do aumento da concentração intracelular do crioprotetor (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Em pressão atmosférica normal, a água congela parcialmente ao atingir a temperatura de 0 °C e esta fase é denominada ponto de equilíbrio de congelamento. No citoplasma das células mamíferas o ponto de equilíbrio de congelamento é alcançado em torno de -0,6°C (MAZUR, 1990). Quando os embriões são expostos a soluções crioprotetoras, o meio passa a congelar entre -15°C e -20 °C, levando à morte celular. Um procedimento desenvolvido para evitar a ocorrência da cristalização espontânea do meio, foi a indução da cristalização em temperaturas entre -5°C e -8°C, denominada em inglês “*seeding*”, que cria um potencial osmótico intracelular diferente do extracelular. Este fenômeno físico faz com que a água intracelular seja drenada para o espaço intercelular, reduzindo a presença de cristais de gelo nas células embrionárias (MAZUR, 1984, MAZUR, 1990). O procedimento para a realização do *seeding* consiste do contato de um objeto super-resfriado (previamente mergulhado em nitrogênio líquido) com a palheta que contém o embrião, na coluna superior à que contém o embrião (VAJTA e NAGY, 2006). O binômio redução da temperatura vs. tempo do decréscimo da temperatura influencia a eficiência da congelação. Quando as taxas de resfriamento são muito lentas, em um período de tempo demasiado longo pode ocorrer o “*efeito da solução*”, as células embrionárias desidratam-se além do limiar fisiológico, elevando a concentração de solutos, alterando o pH, modificando o metabolismo, causando o colapso das organelas celulares (MAZUR, 1977).

MAZUR (1990) em um artigo clássico, caracteriza os procedimentos de congelamento de embriões mamíferos em três distintos conceitos físico-químicos:

Equilibrium, Quasi-equilibrium e Non-equilibrium. O *Equilibrium* consiste em manter o potencial osmótico da água semelhante nos meios intra e extracelular. Isto ocorre em curvas lentas de congelamento, com decréscimo de temperatura de 0,1 a 0,3°C/min até atingir -70°C quando os embriões são mergulhados em nitrogênio líquido. O aquecimento também é realizado de forma lenta, com elevação da temperatura de 20°C/min. Este método de congelamento foi empregado nos primeiros congelamentos de embriões mamíferos (WHITTINGHAM *et al.*, 1972; WILMUT, 1972).

O *Quasi-equilibrium* é caracterizado por uma pequena diferença nos potenciais osmóticos da água nos meios intra e extracelular. Isso ocorre quando são realizadas curvas mais rápidas, com decréscimo de 0,3 a 0,5°C/min até a imersão da amostra em N₂ ao atingir -33 à -40°C (MAZUR, 1990). Outra diferença, em relação ao *Equilibrium* é a necessidade de aquecimento rápido (360°C/min.), que segundo Willadsen (1977) aumentava a sobrevivência embrionária.

O *Non-equilibrium* são aqueles procedimentos onde o resfriamento da amostra é obtido através da criopreservação ultra-rápida ou vitrificação, com velocidades que podem chegar aos 100.000 °C/ min. (MAZUR, 1990, VAJTA, 2000).

No reaquecimento o crioprotetor é retirado das células embrionárias por meio da exposição a soluções crioprotetoras com ação extracelular, em concentrações decrescentes (WOODS *et al.*, 2004). Essa remoção do crioprotetor deve ser realizada de forma lenta, para possibilitar uma re-hidratação adequada, sem que haja um influxo exagerado de água, causando lise celular (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

2.7. Congelamento Convencional

O congelamento convencional também conhecido como congelamento clássico, foi descrito concomitantemente por Whittingham *et al.* (1972) e Wilmut (1972). Inicialmente os embriões murinos eram expostos ao agente crioprotetor dimetil sulfoxido (DMSO), resfriados com taxas de 0,3 a 2,0 °C/min. até atingirem -70°C e imersos em nitrogênio líquido. Este tipo de resfriamento exige para a sobrevivência, que os embriões sejam aquecidos de forma lenta (4 à 25°C/min.). O aquecimento com velocidade reduzida, o que na prática não é fácil de ser conduzida, é que deu o nome ao procedimento: congelamento lento (WHITTINGHAM *et al.*, 1972).

Willadsen (1977) modificou a técnica de congelamento anteriormente descrita, realizando um resfriamento lento com taxa de 0,3°C/ min., porém, ao atingir -30 à -45°C

as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido. Diferentes velocidades de aquecimento foram testadas e o autor provou que o aquecimento rápido (360°C/min.) não era prejudicial à sobrevivência dos embriões. Esse método tornou-se conhecido como curva rápida e desde então é o mais utilizado nas rotinas de congelação de embriões.

Desde 1972 o sucesso na congelação de embriões tem sido relatado em diferentes espécies, como por exemplo, bovinos (WILMUT e ROWSON, 1973), ovinos (WILADSEN *et al.*, 1974), caprinos (BILTON e MOORE, 1976) equinos (YAMAMOTO *et al.*, 1982), humanos (TROUNSON e MOHR, 1983) e suínos (KASHIWAZAKI *et al.*, 1991).

Por outro lado, o emprego da crioconservação com embriões PIV bovinos ainda permanece um desafio. No ano de 2015, mais de 75% das inovulações de embriões PIV realizadas no mundo, foram com embriões a fresco (75,4% - 303.262 / 402.131), e apenas 24,6% (98.869 / 402.131) empregaram embriões crioconservados. Em 2016, a percentagem de transferências com embriões PIV crioconservados apresentou um reduzido crescimento de 2,5%, alcançando os 27,1% (121.490/448.113) do total das transferências. Estes números são de pouca expressão quando comparados aos observados na transferência de embriões IVD crioconservados, 62,1% (321.022 / 516.585)(PERRY, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local de Realização dos Experimentos

A PIVE e a exposição à HGP foram realizadas nas dependências do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.2 Meios de Cultura e Reagentes

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

3.3 Produção in vitro de Embriões

3.3.1 PROCEDÊNCIA E DESTINO DOS OVÁRIOS

Os ovários foram coletados em um abatedouro localizado no município de São Leopoldo – RS, o transporte até o laboratório foi realizado em um recipiente térmico contendo solução fisiológica, aquecida a 30°C. Após a aspiração os ovários foram armazenados em sacolas específicas para resíduos biológicos e encaminhados para o descarte de material biológico da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.3.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E SELEÇÃO DOS COCs

Após o recebimento dos ovários no laboratório, eles foram lavados com solução fisiológica aquecida a 37°C. Folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram aspirados com auxílio de agulha 16G acoplada a uma seringa de cinco mL descartável, o conteúdo foi armazenado em um tubo cônico de 15 mL. Posteriormente o conteúdo foi filtrado e transferido para placas de Petri de 90 mm, onde foi diluído com mPBS acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino (SFB; Invitrogen, Carlsbad, EUA). Os CCOs foram recuperados sob estereomicroscópio e transferidos para uma placa de Petri 35 mm contendo mPBS acrescido de 1% de SFB.

Os CCOs após identificados, foram avaliados e selecionados de acordo com os critérios morfológicos descritos por Hasler *et al.* (1995): tipo 1: oócitos rodeados por 4 ou mais camadas de células do *cumulus* compactas; tipo 2: oócitos com 1 a 3 camadas de células do *cumulus* compactas; tipo 3: oócitos sem nenhuma célula do *cumulus*; tipo 4: oócitos com *cumulus* com algum grau de expansão. Viáveis foram considerados os CCOs de forma esférica, com três ou mais camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo.

3.3.3 MATURAÇÃO IN VITRO (MIV)

Os CCOs selecionados foram lavados em três gotas de MIV e submetidos à incubação por um período de 24 h em estufa a 38,5°C em atmosfera de umidade saturada e 5% de CO₂, em gotas de 100µL (15 CCOs /gota) de MIV sob óleo mineral. O meio era constituído pelo TCM-199 (Sigma, EUA), suplementado com, 2,4 mM de NaHCO₃, 2,2mg/mL de piruvato de sódio, 50 µM de cisteamina, 1% de antibiótico, 5 µg/mL de FSH suíno (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 5 µg/mL de LH (Lutropin; Bioniche Animal Health), 1 µg/ml de Estradiol (SIGMA), 100ng/µL de fator epidermal de crescimento (eGF) e 10% de SFB (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

3.3.4 FECUNDAÇÃO IN VITRO (FIV)

Após a MIV os CCOs foram lavados em gotas de meio de fecundação (Fert – TALP) (PARRISH *et al.*, 1988) e transferidos para gotas de 50 μ L (15 CCOs/gota) do mesmo meio, sob óleo mineral. Para a fecundação, em todas as rotinas experimentais, foi utilizado sêmen congelado em palhetas da mesma partida de um touro previamente testado para a PIVE. As palhetas foram descongeladas em banho maria, à 37°C durante 50 s. Os espermatozoides foram selecionados por gradiente de Percoll (45 e 90%, v/v), sendo a primeira centrifugação realizada durante 10 min. a 1700G por 10 min., em seguida o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspense em 500 μ L de Fert-TALP, sendo novamente centrifugado a 40G durante 5min. Finalmente foi realizado o cálculo da concentração espermática e cada gota contendo 15 COC's foi inseminada com 1x10⁶ espermatozoides/mL. Após IA as estruturas foram mantidas em incubadora (FIV) entre 18 e 20 h nas mesmas condições atmosféricas e de temperatura da MIV.

3.3.5 CULTIVO IN VITRO (CIV)

Após o período da FIV as células do cumulus foram removidas com o auxílio de uma pipeta. Em seguida as estruturas embrionárias foram lavadas e transferidas para o meio de cultivo SOF suplementado com 0,72 mM de Piruvato de Na, 0,2mM de glutamina, aminoácidos e 1% de SFB. Foram adicionadas 15 estruturas por gota (100 μ L), e cultivados até o D5 em estufa a 38,5°C com atmosfera controlada (5% de oxigênio, 5% de CO₂, 90% de N₂ gasoso e umidade do ar saturada). O dia da IA foi considerado dia 0 (D0) para determinação dos estádios de desenvolvimento embrionário.

3.4 Grupos Experimentais

3.4.1 EXPERIMENTO 1

No D5 (96 hpf) as mórulas foram avaliadas, levando-se em consideração critérios morfológicos (Figura 3). As caracterizadas como Grau I (STRINGFELLOW e GIVENS, 2010) foram selecionadas, removidas da placa de CIV e transferidas para uma placa de Petri (\varnothing 35 mm) contendo solução mPBS suplementado com 0,4% de BSA. Após, as mórulas selecionadas foram divididas de forma aleatória entre os grupos experimentais:

1. Mórula Controle Fresco (MCF): As mórulas do grupo MCF foram transferidas para as gotas de CIV e mantidas em estufa a 38,8°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, com umidade do ar saturada, onde permanecem até o D10.

2. Mórula Pressão Fresco (MPF): As mórulas do grupo MPF foram colocadas em criotubos contendo 750 μ L de mPBS com 1% de PVP. Em seguida, os criotubos foram colocados na câmara de pressão e os embriões expostos à HGP de 27,6 MPa de gás argônio durante 120min. Após o período de exposição à HGP, a despressurização da câmara foi feita com redução de aproximadamente 2,5 MPa por min. com intervalos de 2min. a cada 5,5 MPa.



Figura 3: Pool de mórulas no D5 do CIV. (foto do autor, 2018).

3.4.2 CULTIVO IN VITRO PÓS EXPOSIÇÃO À HGP

Após a despressurização da câmara, os criotubos contendo as mórulas do grupo MCF foram retirados da câmara de pressão e com o auxílio de uma pipeta, o meio contendo os embriões foi transferido para uma placa de petri, onde procedeu-se a identificação das mórulas. Imediatamente após elas foram lavadas em três gotas de SOF e recolocadas nas gotas de CIV contendo meio condicionado. No D7 foi determinada a taxa de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto. Nos D8, D9 e D10 foram avaliadas as taxas eclosão dos blastocistos.

3.4.3 EXPERIMENTO 2

Os procedimentos de avaliação e seleção das mórulas foram idênticos aos utilizados no experimento 1.

- 1. Mórula Controle Congelação (MCC):** As mórulas do grupo MCF foram transferidas para as gotas de CIV e mantidas em estufa a 38,8°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, com umidade do ar saturada, onde permanecem até o D7.
- 2. Mórula Pressão Congelação (MPC):** As mórulas do grupo MCC foram expostas à HGP de maneira idêntica às mórulas do grupo MPF e após cultivadas in vitro até D7 nas mesmas condições das mórulas do grupo controle.

3.4.4 CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

Os embriões no estágio de blastocisto (D7) obtidos nos cultivos dos grupos experimentais MPC e MCC foram selecionados e expostos por 5 min. à solução crioprotetora composta de mPBS + 0,4% BSA + 1,5M de etileno glicol. Após os blastocistos foram envasados em palhetas de 0,25 mL. O congelamento dos embriões foi conduzida empregando a curva convencional, realizada com auxílio do equipamento TK 2000 (Tetakon – Brasil), que promoveu a redução gradual da temperatura à velocidade de -0,3°C por min. até atingir a temperatura de -35°C. Após atingir o final da curva, as palhetas foram imersas em N₂ líquido e permaneceram armazenadas em botijões criogênicos até o momento do descongelamento.

3.4.5 DESCONGELAMENTO DE EMBRIÕES

As palhetas foram aquecidas em água em banho-maria à 37 °C por 30 s., e o conteúdo diluído em solução de mPBS suplementado com 0,4% BSA e 0,25 M de sacarose. Após 4min. de exposição à solução, os embriões foram transferidos para gotas de lavagem compostas por meio de cultivo SOF condicionado (meio onde embriões se desenvolveram durante o CIV). Finalmente foram alocados em gotas de SOF condicionado, onde permaneceram durante 72 horas nas mesmas condições do CIV. As taxas de re-expansão embrionária foram avaliadas às 24 horas do CIV pós descongelamento e as taxas de eclosão observadas às 48,72 e 96 horas pós descongelamento (D8, D9, D10).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de sobrevivência e taxas de desenvolvimento (desenvolvimento ao estágio de blastocisto, re-expansão, eclosão à fresco ou após descongelamento) e cinética de desenvolvimento, foram submetidos à análise de variância (Levene Test) com auxílio do software SPSS 18.03 software (IBM Analytics, NY) e foram comparados pelo Test T, com $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

A tabela 1 revela que em cada experimento foram realizadas sete repetições (7 rotinas de PIV), utilizando um total 851 ovários, 2.780 COC's foram utilizados na MIV, destes 1.950 (70,1%) clivaram. No D5 do CIV foram obtidas 785 (40,3%) mórulas grau I.

Tabela 1: Produção *in vitro* de mórulas (D5).

Rotinas	Ovários N	COC MIV	Clivagem (D5)		Mórulas (D5)	
			N	%	N	%
Experimento 1						
1	54	302	184	60,93	73	24,17
2	64	277	171	61,73	83	29,96
3	50	171	107	62,57	65	38,01
4	63	164	137	83,54	57	34,76
5	34	178	129	72,47	32	17,98
6	74	202	134	66,34	52	25,74

7	65	169	113	66,86	53	31,36
Sub-total	404	1463	975	-	415	-
Média	57,71	209,00	139,29	67,78	59,29	28,85
Experimento 2						
1	66	149	95	63,76	24	16,11
2	57	92	72	78,26	29	31,52
3	65	154	120	77,92	56	36,36
4	73	213	155	72,77	49	23
5	51	173	127	73,41	47	27,17
6	57	289	228	78,89	72	24,91
7	78	247	178	72,06	93	37,65
Sub-total	447	1317	975	-	370	-
Média	63,86	188,14	139,29	73,87	52,86	28,10

O efeito da exposição à HGP sobre a capacidade das mórulas (D5) em desenvolverem-se ao estágio de blastocisto está registrado na tabela 2. A cinética da velocidade de multiplicação celular embrionária também foi levada em consideração, estando os percentuais da formação dos diferentes estágios de blastocisto também descritos na tabela 2. Os dados mostram a recuperação do metabolismo celular, com a consequente retomada das divisões celulares. Este processo de resposta celular foi mais lento nos embriões expostos à HGP em relação aos embriões do grupo controle.

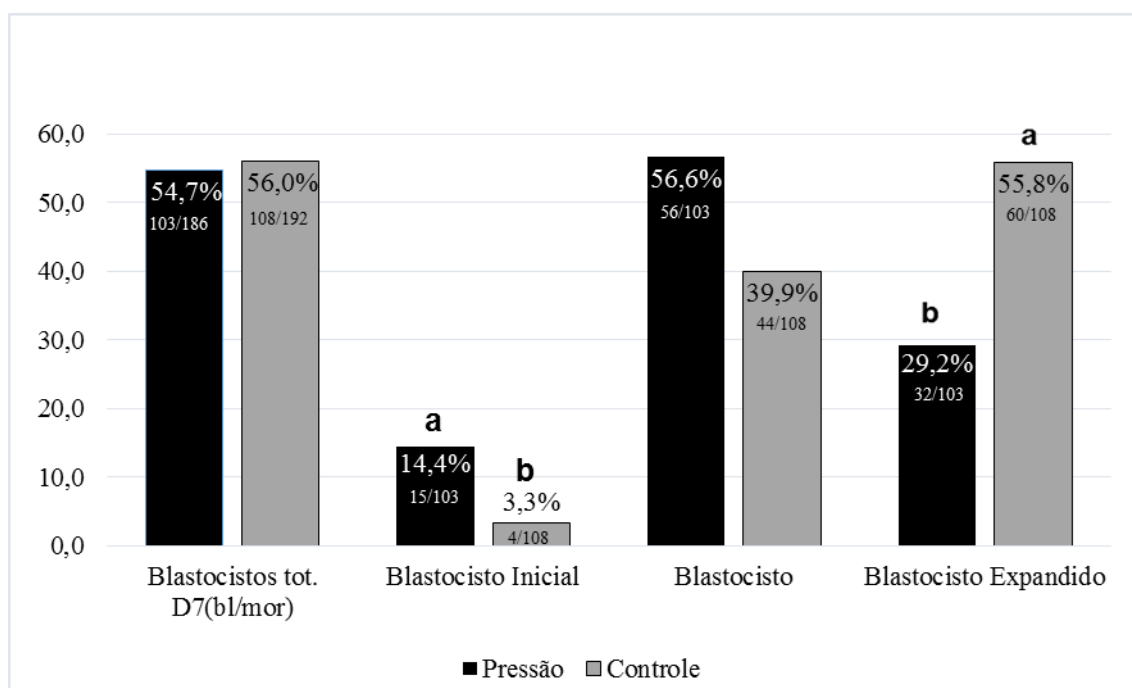


Figura 4: Taxas de desenvolvimento embrionário no D7 após a exposição das mórulas à HGP no D5. a:b: $p < 0,05$.

A determinação das taxas de eclosão dos blastocistos em D8, D9 e D10 descritas na tabela 2, ressaltam uma modificação na cinética da velocidade das divisões celulares, revelando uma recuperação dos embriões expostos à HGP, que eclodiram com a mesma eficiência e no mesmo período de tempo durante o CIV, que os blastocistos do grupo controle.

Tabela 2: Taxa de eclosão no D8, D9 e D10 do CIV de embriões expostos à HGP no estágio de mórula (D5).

	Mórulas (D5)	Blastocistos Eclodidos							
		Blastocistos D7		D8		D9		D10	
Grupo	N	N	%	N	%	N	%	N	%
Controle	192	108	56,25	21	19,44	57	52,78	69	63,89
Pressão	186	103	55,37	11	10,68	55	53,40	62	60,19

Os dados de desenvolvimento das mórulas expostas à HGP ao estágio de blastocisto no segundo experimento, corroboram as observações do primeiro (Figura 4), onde a capacidade de retomada das divisões celulares das mórulas expostas à HGP foi similar à observada nas mórulas do grupo controle (tabela 3).

Tabela 3: Desenvolvimento de mórulas (D5) expostas à HGP ao estágio de blastocisto (D7).

Grupo	COC's	Clivagem		Mórula D5	Blastocistos D7	
	N	N	%	N	N	%
Controle				154	113	73,38
Pressão	1.317	975	74,03	163	106	65,03

A taxa de perda dos embriões após os procedimentos da crioconservação foi similar nos dois grupos experimentais (tabela 4). A determinação da viabilidade dos blastocistos congelados, avaliada pela capacidade de re-expandir após o descongelamento, revelou que os embriões dos dois grupos experimentais alcançaram taxas semelhantes de sobrevivência (tabela 4).

Tabela 4: Taxas de recuperação e re-expansão (24h pós descongelamento) de blastocistos bovinos PIV submetidos à HGP no D5 e criopreservados no D7.

Grupo	Blastocistos D7	Recuperação pós-descongelamento		Re-expansão (24h)	
	N	N	%	N	%
Controle	113	100	88,50	54	54,00
Pressão	106	94	88,68	54	57,45

A análise dos dados da tabela 5 demonstra que os blastocistos dos dois grupos experimentais eclodiram respeitando um comportamento similar em relação à retomada da velocidade das divisões celulares às 24 (D8), 48 (D9) e 72 (D10) horas pós aquecimento. Vale ressaltar que esta semelhança na viabilidade embrionária entre os indivíduos dos grupos experimentais após o descongelamento foi corroborada pelo cálculo da taxa de eclosão em D10, quando se leva em consideração o número de blastocistos que expandiram 24 horas após o descongelamento (Tabela 5).

Tabela 5: Taxas de eclosão nos D8, D9, D10 de blastocistos bovinos PIV submetidos à HGP no D5 e criopreservados no D7.

Grupo	Blastocistos N	Blastocistos Eclodidos						Eclosão D10 cumulativo sobre os re-expandidos	
		D8		D9		D10		N	%
		N	%	N	%	N	%		
Pressão	100	21	21,00	28	28,00	29	29,00	29/54	57,41
Controle	94	20	21,28	29	30,85	31	32,98	31/54	53,70

6. DISCUSSÃO

Apesar de atualmente a PIVE estar difundida em todos os continentes, superando em números a produção *in vivo* de embriões bovinos (PERRY, 2017), o emprego de embriões bovinos PIV crioconservados ainda não conseguiu se inserir na rotina comercial da reprodução assistida. Desde o seu surgimento como ferramenta auxiliar na reprodução animal, a PIVE ainda possui entraves que impedem uma maior eficiência e consequentemente, melhor aproveitamento. Talvez a maior barreira a ser ultrapassada é a complexidade dos procedimentos laboratoriais exigidos para primeiro o desenvolvimento *in vitro* e, posterior à transferência, o desenvolvimento *in vivo* de indivíduos saudáveis.

No Brasil até o final da década de 90 a PIVE era utilizada apenas para fins de pesquisa (VIANA *et al.*, 2010), mas já em 2007, o país consolidava-se como maior produtor de embriões *in vitro*, com 211.443 produzidos, correspondendo à 48,0% do total mundial (VIANA *et al.*, 2012).

O nosso laboratório realiza rotinas de PIVE em bovinos desde 1995 e durante estes 23 anos produziu regularmente embriões bovinos (SCHNEIDER, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2007; VILLAMIL, 2009; GONSIOROSKY, 2018 e MENTZ, 2018).

A análise dos dados obtidos nas 14 rotinas de PIVE (tabela 1) realizadas para a produção dos embriões empregados nos experimentos revelaram números percentuais médios de clivagem de 70,1% (1.950/2.780) e de desenvolvimento ao estágio de mórulas (D5) de 40,3% (785/1.950), que nos permite destacá-los como eficientes, levando-se em consideração os dados relatados na literatura (SÁ *et al.*, 2019, CAVALCANTI *et al.*, 2018). *A priori* a infraestrutura laboratorial e os procedimentos executados resultaram na produção de mórulas (D5), com características morfológicas examinadas ao estereomicroscópio (40X) semelhantes às obtidas nos diferentes laboratórios de PIVE ao redor do mundo.

Já no início dos anos noventa do século passado Pollard e Leibo (1993) constataram que os embriões PIV eram indivíduos diferentes dos IVD e apresentavam uma maior sensibilidade aos danos decorrentes da criopreservação. Os embriões PIV possuem características morfológicas e metabólicas que os tornam mais sensíveis em relação aos IVD, como uma zona pelúcida mais frágil, menor densidade devido à uma maior proporção de lipídios e proteínas intracelulares. Além disso, fatores exógenos como as manipulações *in vitro* e a tensão de O₂, as quais os embriões PIV são expostos, desencadeiam a exacerbada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que geram um estresse oxidativo, com redução na função mitocondrial e diminuição da resistência embrionária à criopreservação (AMIN *et al.*, 2014).

Além dessas dessemelhanças estão presentes também diferenças moleculares, pois embriões IVP apresentam supra expressão de um número maior de genes quando comparado aos padrões moleculares dos embriões IVD (CÔTÉ *et al.*, 2011), possuindo um metabolismo mais acelerado “*unquite metabolism*”, que levam a uma redução da viabilidade embrionária, por consequência menor sobrevivência à criopreservação (LEESE *et al.*, 2007).

Levando-se em consideração os resultados de uma maior sobrevivência embrionária pós estresse subletal observada nos experimentos já realizados no laboratório com embriões murinos (COLLARES, 2014; BECKER 2016), que diferiram dos observados por nós trabalhando com embriões bovinos, onde a ocorrência deste fenômeno não pode ser identificada. No experimento por nós conduzido, as mórulas (D5) expostas à HGP, não conferiram uma maior resistência, caracterizada pela maior capacidade em eclodir, aos blastocistos (D7) criopreservados.

Em outro experimento realizado por Mentz (2018) a avaliação da expressão gênica de embriões bovinos, no estágio de blastocisto expandido, que foram expostos à HGP de 27,6 MPa durante duas horas, revelou alteração na expressão dos genes CASP7 e NET1, que são relacionados ao estresse e que fazem parte de um mecanismo de defesa celular. O nosso interesse inicial foi realizar a determinação da expressão destes e de outros genes envolvidos na resposta ao estresse, mas, lamentavelmente, dificuldades técnicas e financeiras nos impediram de realizar as análises de expressão gênica.

Vale a pena ressaltar que a taxa média de clivagem dos nossos experimentos (70,1 %) foi semelhante a taxa (77,13%) obtida em outro experimento realizado no laboratório (GONSIOROSKI, 2018), durante o mesmo período, sob as mesmas condições de PIVE, onde na FIV utilizou-se palhetas de sêmen do mesmo touro

Uma variável importante, que deve ser levada em consideração, é o número de experimentos sendo realizados concomitantemente no laboratório, utilizando as mesmas estufas de CIV para a realização dos experimentos. Duas estufas estão disponíveis para PIVE e isto demanda durante as rotinas inúmeras aberturas das portas. Este fato pode ter alterado por diferentes períodos de tempo as condições do CIV dos embriões. NGUYAN *et al.* (2018) em recente experimento com embriões murinos comprovou que a abertura da porta da estufa pode afetar a morfocinética do desenvolvimento de embrionário.

Os resultados de clivagem (67,78%, 73,87%) e de desenvolvimento embrionário ao estágio de mórula (28,85%, *vs.* 28,10%) foram similares nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Os números revelam que as condições da PIVE se mantiveram estáveis, durante a realização das rotinas experimentais.

A exposição das mórulas (D5) à HGP não exerceu efeitos deletérios sobre a fisiologia embrionária, permitindo que alcançassem o estágio de blastocisto (D7), esta observação é comprovada pelo número de embriões do grupo exposto à HGP *vs.* o do grupo controle (55,37% *vs.* 56,25%, Figura 4). Estes resultados corroboram os dados obtidos por Collares (2014), que ao expor embriões murinos no estágio de 8 células à 15,7

MPa (2 e 4h), não observou diferença na capacidade de desenvolvimento embrionário ao estágio blastocisto entre os embriões do grupo pressão e controle.

Além disso, o estresse subletal não causou alterações nas taxas médias de eclosão dos embriões nos D8, D9 e D10, apresentando resultados semelhantes ao controle (tabela 2). Anteriormente, Mentz (2018) já havia realizado esta observação, expondo blastocistos expandidos bovinos à HGP durante 120min. A autora não observou diferenças significativas nas taxas de eclosão (88,2% controle vs 90,9% HGP) no D10 do CIV.

Em relação a cinética de desenvolvimento, foi observado que os embriões expostos à HGP no D5 apresentaram uma multiplicação celular mais lenta quando comparada aos embriões do grupo controle, caracterizado pelos resultados observados no D7 do CIV, onde houve uma maior taxa de embriões no estágio blastocisto inicial no grupo pressão (14,56% vs. 3,70%) e uma maior taxa de embriões no estágio de blastocisto expandido no grupo controle (55,56% vs. 31,07%, figura 4).

A indução de estresse em organismos vivos tem sido relacionada com a alteração no padrão de expressão gênica. Os genes *Growth Arrest Specific 5* (Gas5) e *Growth Arrest and DNA-damage-inducible 45 Gamma* (Gadd45g) são reguladores negativos de crescimento celular (SMITH e STEITZ, 1998) e têm sido relacionados com a resposta a longo prazo ao estresse (BOCK *et al.*, 2010). Ambos foram relatados com alteração de expressão 120 min. após exposição de embriões bovinos à um estresse subletal por HHP. O *Gadd45g* apresentou uma supra expressão de 1,2 à 2 vezes, já o *Gas5* apresentou tendência de supra expressão (BOCK *et al.*, 2010). Por estarem relacionados com o crescimento, podem indicar que as células se protegem do estresse subletal induzido pela pressão, retardando o seu crescimento até que as condições fisiológicas sejam restauradas (GEORGE *et al.*, 2007).

Este mesmo comportamento, o retardo da cinética de desenvolvimento no grupo de embriões induzidos ao estresse, foi observado nos experimentos, como resposta celular à exposição à HGP, onde as células embrionárias reduziram o seu metabolismo até retornarem a homeostase. Mais investigações são necessárias para comprovar esta relação, uma vez que, são escassos na literatura os relatos sobre o efeito que o estresse subletal exerce sobre a cinética de desenvolvimento embrionário anterior expansão e eclosão dos blastocistos.

Quando as células são expostas a agentes estressores, a capacidade de se adaptar determina qual será o seu destino. A resposta celular ao estresse depende do tipo e do nível de insulto, inicialmente a célula ativa mecanismos para se defender e recuperar-se

do insulto, como a produção de proteínas (FULDA *et al.*, 2010). O estresse pode ainda induzir a geração de uma “memória biológica”, que se caracteriza por uma resposta celular duradoura à um estímulo transitório (BURRIL e SILVER, 2010).

Neste sentido, o segundo experimento procurou gerar dados que comprovassem que a exposição das mórulas a um estresse subletal no D5 do CIV, poderia induzir uma memória biológica celular, em que o embrião exposto à um segundo estresse, como a criopreservação, respondesse de forma mais rápida e eficiente. Após os descongelamentos dos embriões, foi observado que as taxas médias de re-expansão e eclosão no D8, D9 e D10 também não diferiram significativamente ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais (tabelas 4 e 5). Anteriormente, Becker (2016) avaliou a exposição de embriões murinos a variados tempos e magnitudes de HGP e também não observou diferença entre taxas de eclosão dos embriões do grupo exposto à pressão de 27,6 Mpa durante 2 horas e os do grupo controle. Entretanto, Pribenszky *et al.* (2005b) encontraram taxas de sobrevivência embrionária maiores no grupo de blastocistos bovino PIV exposto à HHP de 80 MPa por 45min., prévio ao congelamento, em comparação com o grupo não exposto.

Da mesma forma, quando embriões murinos no estágio de Bx, foram expostos à HHP de 60 MPa por 30 min., antes da vitrificação, foi observada uma aceleração no processo de re-expansão embrionária (4 - 6h grupo HHP vs 20h grupo controle) e aumento a taxa de sobrevivência embrionária (98% vs 46%, respectivamente, PRIBENSZKY *et al.*, 2005a).

Estressando embriões PIV bovino, de forma similar aos nossos experimentos, Gonsioroski (2018) também obteve resultados semelhantes ao comparar a taxa de eclosão pós descongelamento dos blastocistos dos grupos expostos à pressão (21,5% - 26/121) com a dos blastocistos do grupo controle (24,6% - 31/126).

Diferentemente dos nossos resultados, PRIBENSZKY *et al.* (2008a) que expuseram blastocistos bovinos à 60 MPa durante 60min., além de avaliarem o efeito da HHP, avaliaram o efeito do CIV após à exposição durante 60 min. ou 120 min, sobre a sobrevivência embrionária à vitrificação. Os autores relataram que o grupo exposto à HHP seguido de 60 min. de CIV até a vitrificação, mostrou-se superior na taxa de re-expansão e de eclosão (4, 24, 48 e 72h) em relação ao grupo controle e ao grupo exposto à pressão e após mantido em CIV de 120 min. antes da vitrificação.

Sabe-se que a sobrevivência embrionária ao estresse subletal depende do binômio magnitude e tempo de exposição (PRIBENSZKY *et al.*, 2005a), assim como da espécie

e do estágio de desenvolvimento embrionário (BOCK *et al.*, 2010). Experimentos onde foram expostos embriões bovinos à HHP, com pressões superiores a 27,6 MPa, apresentaram diferenças significativas nas taxas de viabilidade embrionária (PRIBENSZKI *et al.*, 2005, JIANG *et al.*, 2016). Isto denota a importância da avaliação de diferentes magnitudes e tempos de exposição à HGP, especificamente para embriões da espécie bovina, uma vez que, a não observação de alterações da viabilidade embrionária em nossos resultados, podem ter sido decorrentes da insuficiente magnitude ou do tempo de exposição dos embriões ao estresse subletal.

7. CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos realizados permitiram determinar que a exposição de mórulas D5 à 27,6 de HGP por 2h, não alterou a viabilidade embrionária em alcançar o estágio de blastocisto (D7) e eclodir nos dias subsequentes (D8, D9 e D10). Os dados obtidos possibilitaram observar, que a exposição à HGP desacelerou o desenvolvimento embrionário entre os dias 5 e 7 do CIV, mas sem comprometer a capacidade de eclosão dos embriões previamente estressados. Entretanto, são necessários outros experimentos para avaliar se esse retardo no desenvolvimento está relacionado à resposta ao estresse.

A exposição de mórulas (D5) do CIV à 27,6 de HGP por 2h, não alterou a viabilidade embrionária após o congelamento dos blastocistos (D7).

8. PERSPECTIVAS

O presente trabalho, deu seguimento a experimentos realizados no laboratório, que investigaram os efeitos da exposição à HGP em embriões bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário: bl (GONSIOROSKI, 2018) e Bx (MENTZ, 2018). Futuramente, podem ser desenvolvidos trabalhos avaliando diferentes estágios de desenvolvimento embrionário, assim como, o efeito da HGP sobre a exposição de oócitos e espermatozoides.

Um ponto a ser levado em consideração para a realização de futuros experimentos com HGP, é a avaliação de diferentes magnitudes e tempos de exposição dos embriões PIV bovinos em diferentes estágios de desenvolvimento. Se insulto ultrapassar o limiar da sobrevivência, as células podem ativar caminhos que levam a apoptose. Neste sentido,

a avaliação dos efeitos apoptóticos causados pela HGP nas células embrionárias é relevante e poderia ser explorado através do delineamento experimental que contemple a determinação do comportamento da expressão de diferentes genes responsáveis pelo crescimento e manutenção da homeostase celular. Além destes procedimentos, trabalhos futuros podem utilizar a coloração de TUNEL (do inglês, *Terminal dUTP Nick End Labelling*). Esta técnica permite com auxílio de microscopia confocal, identificar as células em apoptose, quantificando os danos ao DNA (ZULLO *et al.*, 2016; FOULADI-NASHTA *et al.*, 2005).

A cinética de desenvolvimento embrionário no D7 do CIV revelou menor velocidade da retomada de desenvolvimento *in vitro* do grupo de mórulas expostas a pressão comparada ao controle. A contagem diferencial do número de células da massa celular interna e do trofotoderma é uma ferramenta para avaliar a viabilidade embrionária (IWASAKI *et al.*, 1990), assim, para a determinação mais fidedigna da cinética, é importante que trabalhos futuros avaliem o número total de células embrionárias, assim como a relação massa celular interna/trofotoderma, através da contagem celular diferencial (THOUAS *et al.*, 2001).

A maioria dos desenhos experimentais envolvendo aspectos da PIVE contempla a determinação da viabilidade embrionária *in vitro*. Entretanto, seria de grande valia a avaliação da viabilidade *in vivo* dos embriões produzidos.

A tendência do mercado consumidor é de que a demanda por embriões PIV continuará aumentando. Este comportamento da população alvor ressalta a importância da busca de estratégias para eliminar as barreiras que impedem uma maior eficiência da PIVE, com o nascimento de um maior número de bezerros saudáveis por embrião produzido no laboratório. Neste sentido a HGP têm se mostrado uma técnica promissora e de fácil aplicação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN., A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E., HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C., SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine Embryo Survival Under Oxidative-Stress Conditions is Associated With Activity of the NRF2-Mediated Oxidative-Stress-Response Pathway. **Molecular Reproduction & Development**, v. 81, p.497–513, 2014.
- BAUMANN C.G.; MORRIS D.G.; SREENAN J.M.; LEESE H.J. The quiet embryo hypothesis: Molecular characteristics favoring viability. **Mol. Reprod Dev**, v. 74, p. 1345-1353, 2007.
- BECKER, B. S. Dissertação de Mestrado: Viabilidade de blastocistos de *mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2016.
- BILTON, R. J.; MOORE, N. W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 9, p. 125-129, 1976.
- BOCK, I.; LOSONCZI, E.; MAMO, S.; POLGAR, Z.; HARNOS, ANDREA; ANDRAS, D.; PRIBENSZKY, C. Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. **Cryoletters**, v. 31, n. 5, p. 401-412, 2010.
- BOCK, I.; RAVEH-AMIT, H.; LOSONCZI, E.; CARSTEANU, A. C.; FEHER, A.; MASHAYEKHI, K.; MATYAS, S.; DINNYES, A.; PRIBENSZKY, C. Controlled hydrostatic pressure stress downregulates the expression of ribosomal genes in preimplantation embryos: a possible protection mechanism? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 6, p. 776-784, 2016.
- BRASIL. Dados Do Rebanho Bovino e Bubalino. Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento – Mapa, 2017.
- BURRILL D. R., SILVER, P. A. Making Cellular Memories. **Cell**, v.140, p.13-18, 2010.
- CAVALCANTI C. M.; CAMPELO I. S.; SILVA M.M.A.S.; ALBUQUERQUE J.V.S.; MELO L. M.; FREITAS V.J.F. Efficiency of different incubation systems for the in vitro production of bovine embryos. **Zygote**, v. 26, p. 314–318, 2018.
- COLLARES, F. J. F. Dissertação de Mestrado: Expressão gênica e taxas de desenvolvimento de embriões *Mus musculus domesticus* expostos à pressão gasosa no estágio de 8-células e submetidos à criopreservação no estágio de blastocisto. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2014.
- CÔTÉ I.; VIGNEAULT C.; LAFLAMME I.; LAQUERRE J.; FOURNIER E.; GILBERT I.; SCANTLAND S.; GAGNÉ D.; BLONDIN P.; ROBERT C.

Comprehensive cross production system assessment of the impact of *in vitro* microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. **Reproduction**, v.142, p.99-112, 2011.

EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of Mouse, Sheep, Cow, Pig, Rhesus Monkey and Human Ovarian Oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349-351, 1965.

FOULADI-NASHTA A.A.; ALBERIO R.; KAFI M.; NICHOLAS B.; CAMPBELL K.H.S., WEBB R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 4, p.497–502, 2005.

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

GARCIA, J. M.; ESPER, C. R.; AVELINO, K. B.; PUELKER, R. Z.; VANTINI, R.; ALMEIDA, Jr.; RODRIGUES, C. F. M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 27, n. 1, p. 237, 1999.

GEORGE V. T.; BROOKS G.; e HUMPHREY T. C. Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. **Mol Biol Cell**, v. 18, p. 4168–4179, 2007.

GONÇALVES, R. L.R.; VIANA, J. H.M. Current status of cattle embryo production in Brazil and in the world, 2019. Rev. Bras. Reprod. Anim., aceito para publicação, no prelo.

GONSIOROSKI, A. V. Dissertação de Mestrado. Congelação ou Vitriificação de Blastocistos Bovinos produzidos *in vitro* previamente expostos a Estresse Subletal. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2018.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER S.A.; NEELY, B.; SHUEY L.S.; STOKES J.E.; TRIMMER S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141-152, 1995.

HAUBEN, K. J. A.; BARLETT, H. D.; SOONTJENS, C.C.F.; CORNELIS, K.; WUYTACK, E. Y.; MICHIELS, C. W. *Escherichia coli* Mutants Resistant to Inactivation by High Hydrostatic Pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n.3, p. 945–950, 1997.

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

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

Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. v.28, n.4, p.475-481, 2016.

HORVÁTH A.; HARNOS A.; SZENCI O.; PRIBENSZKY C. Investigation of hydrostatic pressure-induced stress preconditioning of boar semen using modified cryopreservation., v.53, n.6, p.1589-1593, 2018.

HUANG, H. W.; WU, S.; LU J.; SHYU, Y.; WANG, C. Current status and future trends of high-pressure processing in food Industry. **Food Control**, v. 72, p.1-8, 2017.

HUANG, S. Y.; PRIBENSZKY C.; KUO, Y., TENG, S., CHEN Y., CHUNG M., CHIU Y. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. **Animal reproduction science**, v. 112, n. 1, p. 136-149, 2009.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitacion of bull spermatozoa and fertilization in vitro cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 119-121, 1977.

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

JIANG, Z.; HARRINGTON, P.; ZHANG, M.; MARJANI, S. L.; PARK, J.; KUO, L.; PRIBENSZKY, C.; TIAN, X. Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of In Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.

KASHIWAZAKI, N.; OHTANI, S.; MIYAMOTO, K.; OGAWA, S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. **Veterinary Record**, v. 16, p. 256-257, 1991.

KATATZAS, K.A.G, BENNIK, M.H.J. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high Tolerance towards High Hydrostatic Pressure. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3183-3189, 2002.

KRUIP, A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M.W. M. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675- 684, 1994.

LANDIM-ALVARENGA F.C. Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos. Tese (Doutorado)- **Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, p. 102, 1995.

LEESE H.J., STURMEY R.G., BAUMANN C.G., MCEVOY T.G. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. **Hum Reprod**, v. 22, p.3047-3050, 2007.

LEESE, H. J., BAUMANN, C. G., BRISON, D. R., MCEVOY, T. G., STURMEY, R. G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. **Mol. Hum. Reprod.** v. 14, p. 667- 672, 2008.

LU K. H.; GORDON I.; GALLAGHER M.; GOVERN H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. **Veterinary Records**, v. 121, p. 259-260, 1987.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v.247, p. 251-272, 1977.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n.3, p. 125-142, 1984.

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

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL JR.; G. E. Cryopreservation of germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, v. 7, n. 1, p. 2-12, 2008.

MENTZ, D.A. Dissertação de Mestrado: Efeitos da Alta Pressão Gasosa sobre a Viabilidade e Expressão Gênica de Blastocistos Expandidos Bovinos produzidos *in vitro* submetidos à Criopreservação. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2018.

METRICK, C.; HOOVER, D. G.; FARKAS, D. F. Effects of High Hydrostatic on Heat-resistant and Heat-sensitive Strains of *Salmonella*. **Journal of Food Science**, v.54, p.1561-1564, 1989.

NGUYEN Q., SOMMER S., GREENE B., WRENZYCKI C., WAGNER U., ZILLER V. Effects of opening the incubator on morphokinetics in mouse embryos. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.229, p. 64-69, 2018.

OLIVEIRA, A. T. D. Sobrevivência de Embriões Bovinos Produzidos *in vitro* após a Criopreservação. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

PARRISH J. J., SUSKO-PARRISH J., WINER M. A., FIRST N. L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p.1171-1180, 1988.

PERRY G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsl**, v.35, 4 ed., p.08-23, 2017.

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

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C; RIGO, A. G; FRREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.;

FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENKA, J.L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo Production and Pregnancy Rates From *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* Dairy Cows Using Sexed Sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1349–1355, 2010.

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

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

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; ULRICH, P.; BARBOSA, C.; HATAMOTO, L.; SANTOS, C. Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, p. 338, 2005b.

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, HORVATH, A. HARNOS AND O. SZENCI. Hydrostatic pressure-induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 18, p.162–163, 2006.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; KÚTVÖLGYI, G.; HARNOS, A.; SZENCI, O.; DENG, J.; LEDERER, J. Improved post-thaw motility, viability, and fertility are achieved by hydrostatic pressure-treated bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 181-182, 2007.

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

PRIBENSZKY, C., VAJTA, G., MOLNAR, M., DU, Y., LIN, L., BOLUND, L., & YOVICH, J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biology of reproduction**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 690-697, 2010.

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

PRIBENSZKY C.; HORVÁTH A.; VÉGH L.; HUANG S. Y.; KUO Y. H.; SZENCI O. Stress preconditioning of boar spermatozoa: a new approach to enhance semen quality. **Reprod Domest Anim**, v. 46, p.26-30, 2011.

RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, C. A.; SALVIANO, M.B.; WILLHELM, B. R.; COLLARES, F. J. F.; RODRIGUES, J. L. High gaseous pressure pretreatment in *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 282-283, 2012.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI M. Conceitos Históricos e Desafios da Reprodução Animal. **Jornal o Embrião**, v. 57, p. 40, 2016.

SÁ, N.A. R.; VIEIRA L. A.; FERREIRA A. C. A.; CADENAS J.; BRUNO J. B.; MASIDE C.; F. SOUSA G. C.; CIBIN F. W. S.; ALVES B. G.; RODRIGUES, A. P.; LEAL-CARDOSO R. J. H.; GASTAL E.L.; FIGUEIREDO J. R.. Anethole Supplementation During Oocyte Maturation Improves In Vitro Production of Bovine Embryos. **Reproductive Science**, 2019.

SAUVÉ, R. Ultrasound Guided Follicular Aspiration and in vitro Fertilization. **Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS**, v. 1, p.141, 1998.

SCHNEIDER, M. R. Avaliação de Sistemas de Armazenamento de Oócitos e Embriões Bovinos Produzidos In Vitro. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

SMITH, C.M.; STEITZ J.A. Classification of *gas5* as a Multi-Small-Nucleolar-RNA (snoRNA) Host Gene and a Member of the 5'-Termin.al Oligopyrimidine Gene Family Reveals Common Features of snoRNA Host Genes. **Mol Cell Biol**, v.18, p. 6897–6909, 1998.

STRINGFELLOW D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. Champaign, IL: **IETS**, 2010.

STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS,D.; LEESE H. J.; LONERGAN,P. Amin.o Acid Metabolism of Bovine Blastocysts: A Biomarker of Sex and Viability. **Molecular Reproduction & Development**, v. 77, p.285-296, 2010.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V.G.; TATA, A; FERREIRA, C.R; PASCHOAL, D.M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 1–11, 2012.

TANEJA, M.; P. E.J.;VELDE V.A.; J. C.;D.; TRIPP, M. W.; LEVINE H.;ECHELARD Y.;RIESEN J.; YANG X. Developmental Competence of Juvenil Calf Oocyte In Vitro and In Vivo: Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.206-213, 2000.

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

TRIGAL, B.; MUÑOZ, M.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J. N.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; CASAIS, R. DIEZ, C. Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 200-206, 2013.

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

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

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

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

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

VIANA J.H.M., SIQUEIRA L.G.B., PALHAO M.P., CAMARGO L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim Reprod.**, v.9, p.12-18, 2012.

VIANA J.H.M.; SIQUEIRA L.G.B.; PALHÃO M.P.; CAMARGO L.S.A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Sci Vet**, v.38, p. 661-674, 2010.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S. Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: reflexos de um período de turbulências. **Jornal O Embrião**, v. 58, p.7-9, 2016.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO A.C.S.; SIQUEIRA L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017.

VIANA J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer Newsl**, v.36, 4 ed., p.8-25, 2018.

VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J. L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 377-383, 2007.

VILLAMIL. Vitriificação dde blastocistos Mus domesticus domesticus expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

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

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. **Science**, Washington, v. 178, n. 4059, p. 411-414, Oct. 1972.

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

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

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

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

WOODS E.J., BENSON J.D., AGCA Y.; CRITSER J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146 -156, 2004.

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

ZULLO G.; CANDITIIS C.; PERO M.E.; ALBERO G.; SALZANO A., NEGLIA G., CAMPANILE G., GASPARRINI B. Crocetin improves the quality of in vitro-produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. **Theriogenology**, v. 86, p. 1879–1885, 2016.

Anexo 1

Tabela de Conversão de Unidades de Pressão

Unidade	bar	mbar	Pa	kPa	MPa	kgf/cm ²	mca	mm Hg (0°)	psi
1 bar	1	1 000	100 000	100	0,1	1,0197	10,197	750,062	14,504
1 mbar	0,001	1	100	0,1	0,0001	0,001	0,010197	0,750062	0,014504
1 Pa	0,00001	0,01	1	0,001	0,000001	0,00001	0,0001	0,0075	0,00014504
1 kPa	0,01	10	1 000	1	0,001	0,010197	0,10197	7,50062	0,14504
1 MPa	10	10 000	1 000 000	1 000	1	10,197	101,97	7500,62	145,04
1 kgf/cm ²	0,980665	980,665	98 066,5	98,0665	0,0980665	1	10	735,56	14,2233
1 m H ₂ O	0,0980665	98,0665	9 806,65	9,80665	0,00980665	0,1	1	73,556	1,42233
1 mm Hg	0,00133322	1,33322	133,322	0,133322	0,0001333	0,001359	0,01359	1	0,01934
1 psi	0,068948	68,948	6 894,75	6,89475	0,0068948	0,070307	0,70307	51,715	1

Fonte: Internet. Link: https://www.google.com/search?q=tabela+unidade+de+press%C3%A3o&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi1nRudngAhX3I7kGHaGGAjsQ_AUIDigB&biw=1366&bih=625#imgrc=EkZHtTmPEwx-VM

Anexo 2**Artigo formatado nas normas da revista Cryobiology:****Effect of Sublethal Stress by High Gaseous Pressure on Bovine
Morulae *in vitro* Production**Camila R. de Freitas^a, José Luiz Rodrigues^{a*}^aSchool of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS),
Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author.

E-mail addresses: joséluizrodrigues@ufrgs.com (J.L. Rodrigues).*Abstract:*

Induction of sublethal stress in mammalian embryos has been linked to increased embryo resistance to cryopreservation. The aim of this work was to evaluate post-thaw survival of bovine morulae IVP exposed to High Gaseous Pressure (HGP) on D5 and cryopreserved on D7 of IVC. IVP Bovine grade I morulae were randomly distributed in 2 groups: Morula Pressure Fresh (MPF) exposed to HGP of 27.6MPa for 120min and Morula Control Fresco (MCF). There are not significantly differentiates in blastocyst rate (D7) (blastocyst / morula) between MPF 55.37% (103/186) and MCF 56.25% (108/192). The kinetics of embryonic development (D7) was reduced in MPF group with higher embryo rates in initial blastocyst stage in MPF 14.56% (13/103) vs. MCF 3.70% (4/108) and higher expanded blastocyst rate in MCF 56% (60/108) vs. MPF 31.07% (32/103). There are not differences between hatching rates fresh in MCF and MPF, respectively: D8 19.44% (21/108) vs. 10.68% (11/103), D9 52.78% (57/108) vs. 53.40% (55/103) and D10 63.89% (69/108) vs. 60.19% (62/103). In experiment 2, morulae were randomly distributed in 2 groups, Morula Pressure Cryopreservation (MPC) and Morula Control Cryopreservation (MCC), on D7 of IVC all blastocysts were frozen. Post-thaw, no differences were found between re-expansion rate in MPC 60.7% (54/94) and MCC 52.8% (54/100) and hatching rate, MPC and MCC respectively: D8 21.0% (21/100) vs.

21.28% (20/94), D9 28.0%(28/100) vs.. 30.85% (29/94) and D10 29.0% (29/100) vs. 32.98% (31/94). Experiments showed that exposition of morulae to HGP did not affect the embryonic development until D7, and did not affect the hatching rates (fresh or post-thaw).

Keywords: Sublethal stress, High Gaseous pressure, Cryopreservation, Morulae, Bovine Embryo, in vitro Production,

1. Introduction

An important milestone was reached in 2017, where the in vitro production (IVP) of bovine embryos overcame for the first time the amount of in-vivo derived (IVD) embryos: 666.215 vs. 632.638 [18]. Although, the high amount of embryo produced, some challenges still need to be overcome in cryopreservation of IVP embryos. Only 27.1% (121.490/448.113) of worldwide embryo transferred (ET) are performed with cryopreserved IVP embryos. However, 62.1% (321.022/516.585) of IVD embryos ET are performed with cryopreserved embryos [18].

This occurs because, IVP embryos have different biochemical and molecular properties, compared to IVD embryos [10]. IVP embryos have more fragile pellucida zone [19]; greater accumulation of cytoplasmatic lipids [27] and smaller number of cells [6]. Furthermore, exogenous factors, that embryos are exposed, such as *in vitro* handling and O₂ stress, cause an exacerbated production of reactive oxygen species (ROS), which induce an oxidative stress with reduction in mitochondrial function and decreased embryonic resistance to cryopreservation [2].

Alternative procedures are being studied with the objective to provide more resistance to the IVP embryos. Induction of sublethal cell stress, by embryonic exposure to high hydrostatic pressure (HHP) is one of these strategies researched [3, 12, 20, 21, 28,]. The idea originates from food preservation, which initially expose microorganisms to HHP [11]. These bacteria exposed to HHP revealed that an effect of cross protection can be achieved giving them resistance to subsequent stress [13]. Thus, cells that are subjected to a tolerable stress (in this case, elevated pressure) develop a defense mechanism, a "transient or permanent adaptation" with physiological changes, which may give them greater tolerance to posterior stress [23].

Induction of sublethal stress in mammalian embryos by HHP exposure, before cryopreservation, has been shown to increase re-expansion and hatching rates after heating (20, 21, 22). The effects of embryonic exposure to HHP results involve molecular changes, such as modification in gene expression, causing supra-regulation of stress-related genes, which are considered key elements for a posterior defense mechanism [3]

Considering the evidence that exposure to HHP stimulates a stress response increasing embryonic survival after cryopreservation, another alternative to induce cell stress in mammalian embryos has been tested [24]. Rodrigues *et al.* [24] adapted a pressure chamber to induce sublethal stress by means of high gas pressure (HGP). Primarily, canine oocytes were exerted at 7.7 MPa HGP with N₂ gaseous for 1 hour. Results showed that there was no deleterious effect of HGP on *in vitro* maturation (IVM) efficiency rates in canine oocytes. In IVP bovine embryos, at blastocyst and expanded blastocyst stages, the HGP induced, increased the rates of re-expansion [9] and modified the expression of genes stress related [14]. However, there is no information on the effect of HGP on bovine embryos at the morula stage. Therefore, the present study evaluated the survival capacity of bovine IVP morulae exposed to HGP of 27.6 MPa for 120 min in Day 5 (D5) of the IVC, as well, the effect of HGP on the kinetics of embryonic development in Day 7 (D7) and the viability of blastocysts after cryopreservation.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

All chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise noted.

2.2 *In vitro* maturation (IVM) procedures

Ovaries were collected from cows immediately after slaughter of heifers at a local slaughterhouse. Ovaries were stored in physiological saline (0.9% NaCl) and maintained at 27-33°C during transportation to the embryo laboratory. After washing, the ovaries with NaCl were aspirated to obtain the oocytes from the antral follicles (2-8 mm of diameter) using an 18-gauge needle attached to a 5 ml sterile, plastic syringe. Aspirated follicular fluid was filtrated and expelled into dishes, containing Dulbecco's phosphate

buffer saline (D-PBS) with 1% fetal bovine serum (FBS- Invitrogen, Carlsbad, EUA). Oocytes with intact compact cumulus cell layers were selected under a stereomicroscope and washed three times in IVM growth medium, subsequently transferred randomly in the form groups (15/ group) in 100 μ l droplets of IVM growth medium, consisting of (TCM-199 with Earle's salts, L-glutamine and HEPES, 0.2 mM sodium pyruvate, 26.1 mM sodium bicarbonate, 10% FBS)(Invitrogen, Carlsbad, EUA), supplemented with 5 IU/mL FSH-p (Folltropin, Bioniche, USA), 10 IU/mL hCG (Chorulon, Intervet, Inc., USA), and 1 mg/mL 17- β estradiol. A solution containing 105 IU/mL sodium penicillin, 10 mg/mL streptomycin sulfate, and 25 mg/mL amphotericin B (GIBCO-BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) was added to the growth medium (1:100). The droplets with oocytes were covered with pre-warmed mineral oil and incubated for 24 h at 38.5 °C in a CO₂ incubator with 5% CO₂ in air and 90%–95% relative humidity.

2.3 *In vitro fertilization (IVF)*

After the IVM, the *cumulus*–oocyte complexes (COC's) were washed three times in the fertilization medium (IVF-TALP medium – Parrish [17]) before being transferred for 50 μ l IVF medium droplets, under mineral oil. Approximately 1 h prior to insemination, one straw of frozen semen was thawed in a 37°C water bath for 50 sec, the bovine sperm cells were segregated by Percoll[®] gradient with Sperm-TALP medium, then added to the oocyte with a final concentration of 1.10^6 spermatozoon/mL. Oocytes and sperm cells were incubated together during 18 h at 38.5 °C in 5% CO₂ concentration in air and 90% to 95% of relative humidity.

2.4 *In vitro embryo culture (IVC)*

Eighteen hours after insemination, all presumptive zygotes were pipetting to remove cumulus cells and were washed three times using IVC medium composed of the Synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with 1.5 mM D-glucose and 5% FBS. Then, presumptive zygotes were transferred into 100 μ L droplets of SOF and incubated under oil at 38.5°C in 5% CO₂ concentration in air and 90% to 95% relative humidity, up to the morula stage, achieved on Day 5 of development. On day 5 was determined cleavage rates (IVF=Day 0) and embryo, in morula stage, morphological quality grade 1 (International Embryo Transfer Society, 2010) were selected.

2.5 *HGP treatment*

On Day 5, embryos at morula stage were loaded into 2.0 mL cryovial containing 750 μ L mPBS+PVP in groups of 10 to 15. Then, cryovials were disposed inside an adapted HGP chamber. Gaseous pressure was generated by transferring pressure from an ordinary pressure azote cylinder (White Martins[®] – Brazil). The morulae were exposed to 27.6 MPa for 120 min. At the end of exposure time, pressure was released to 0.5 MPa/min. After, the morulae subjected to the pressure treatment, were recovered by flushing cryovial 3 times with mPBS+BSA.

2.6 *Experiment 1*

In this experiment was evaluated if the effect of HGP treatment was detrimental on embryo survival rates without submit embryos to cryopreservation. Seven replicates were used, totaling 378 grade I morula, randomly divided in two groups: 186 Morula Pressure Fresh (MPF) group and 192 Morula Control Fresh (MCF) group. The group MCF were transferred into 100 μ L droplets of SOF and incubated under oil at 38.5°C in 5% CO₂ concentration in air and 90% to 95% relative humidity. The group MPF was exposed to 27,6 MPa for 120 min, (as described in topic 2.5), after recovery of HGP, morulae were washed three times with SOF, transferred into 100 μ L droplets of SOF and incubated under the same conditions as the MCF group, up to the blastocyst stage on Day 7 of development. On Day 7 blastocyst rates and embryonic development kinetics were evaluated. On Days 8, 9 and 10 were evaluated hatching rates.

2.7 *Experiment 2*

In this experiment was evaluated the effect of HGP treatment on cryopreserved embryo survival. Embryos at morula stage were allocated randomly in two groups: Morula Control Cryopreservation (MCC) and Morula Pressure Cryopreservation (MPC). Were done 7 replications and 317 grade I morulae, randomly divided: 163 morulae MPC group and 154 in MCC group. The group MCC were transferred into 100 μ L droplets of SOF and incubated under oil at 38.5°C in 5% CO₂ concentration in air and 90% to 95% relative humidity. The group MPC was exposed to 27.6 MPa for 120 min, (as described in topic

2.5), after recovery of HGP, morulae were washed three times with SOF, transferred into 100 μ L droplets of SOF and incubated under the same conditions as the MCF group, up to the blastocyst stage on Day 7 of development. On Day 7 blastocyst rates were evaluated and the embryos of both groups were cryopreserved.

Blastocysts from experimental groups were transferred to mPBS+BSA containing 10% ethylene glycol (EG), and after 5 min loaded into 0.25 mL plastic straw (2 embryos/straw). Straws were then transferred to TK- 2000 equipment (Tetakon, Brazil) at room temperature (RT). From RT to -6°C , straws were cooled at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ at -6°C , temperature was kept stable and seeding was induced. After 10 min, the straws were frozen at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until reach -35°C . After 5 min, straws were plunged and stored into liquid nitrogen at -196°C .

Straws were thawed in water bath at 37°C for 30s and medium containing thawed blastocysts put into mPBS+BSA supplemented with 0,25 M sucrose for 3 min, followed by washing 3 times in mPBS+BSA for cryoprotectant removal. Then, embryos were *in vitro* cultivated for 24h (38.5°C in 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 and humidified air), and blastocyst re-expansion rates were observed. On Days 8, 9 and 10 were evaluated hatching rates.

2.8 Statistical analysis

Data were analyzed with SPSS 18.03 software (IBM Analytics, NY). The normality of data was evaluated, like as the homogeneity of residuals by Levene's test. Survival and developmental rates (development to blastocyst stage, expansion and hatching rates post-thaw) were compared by Test T, for *P-value* < 0.05.

3. Results

3.1 Experiment 1

In this trial was evaluated the HGP effect on survival of fresh bovine embryos IVP at morula stage. Results showed that the exposure of IVP morula to HGP of 27.6 MPa for 120 min did not modify *in vitro* development rate in blastocyst stage at D7 of the IVC. Blastocyst rate (bl/mor) did not differ significantly ($P>0.05$) among MCF group 56.25% (108/192) and MPF group 55.37% (103/186). As shown in figure 1, the kinetics of

embryonic development was influenced by exposition to HGP, revealing a higher percentage of embryos with early stages in MPF group at D7 of the IVC when compared to MCF. On the other hand, differences were not observed in embryo hatching rates of MCF and MPF, respectively, at D8 19.44% (21/108) vs. 10.68% (11/103), D9 52.78% (57/108) vs. 53.40% (55/103) and D10 63.89% (69/108) vs. 60.19% (62/103).

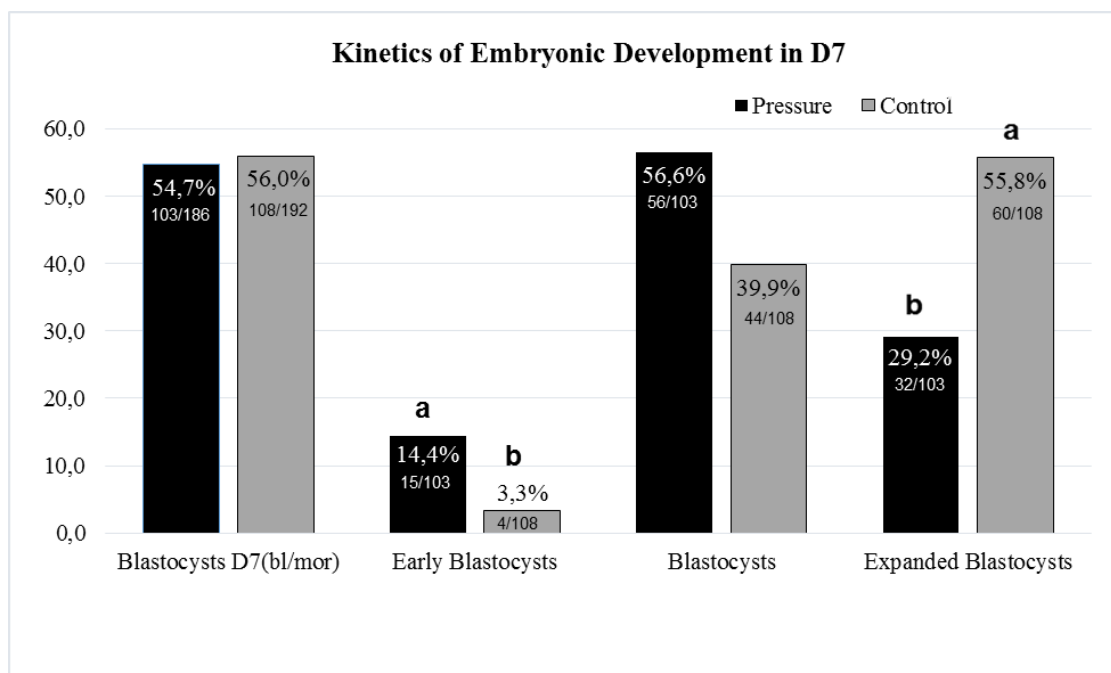


Figure 1: Embryonic development rates and cell division kinetics between days D5 and D7 of the IVC after exposure of the morula to the HGP. Different letters in the columns of each experimental group are statistically different ($P < 0.05$).

3.2 Experiment 2

In the second experiment, the embryonic development rates in blastocyst stage at D7 of the IVC were similar among the groups submitted to HGP 65.03% (106/163) and control 73.38% (113/154) respectively. Post-thaw, differences were not observed between re-expansion rate in MPC 57.4% (54/94) and MCC 54.0% (54/100) and hatching of blastocysts of MPC and MCC groups, respectively: D8 21.0% (21/100) vs. 21.28% (20/94), D9 28.0% (28/100) vs. 30.85% (29/94) and D10 29.0% (29/100) vs. 32.98% (31/94).

4. Discussion

In the early nineties, Pollard e Leibo [19] have already found that IVP embryos were different from IVD and were more sensitive to damage of cryopreservation. Efforts to increase survival rates of these embryos include modification of the growth mediums (1,15, 29), changes in cryopreservation methods (16, 26) and alternative strategies, such as, the induction of sublethal cellular stress [20,21,24].

The aim of this study was to evaluate the effect of exposure of bovine morula IVP to HGP. The results demonstrated that the exposure of morulae to HGP of 27.6 MPa for 2 h had no deleterious effects on embryonic physiology, allowing the morula to reach the blastocyst stage (D7) similarly to the non-exposed control group (55.37% vs. 56.25%, respectively). Collares [5] exposed murine embryos, at the 8 cells stage, to HGP at 15.7 MPa (2 and 4h), also did not observed differences in the embryonic development capacity to the blastocyst stage between the embryos from the pressure submitted and control group. In addition, sublethal stress did not cause changes in hatching rates in the experimental groups, MCF and MPF at D8, respectively, (19.44% vs. 10.68%), D9 (52.78% vs. 53.40%) and D10 (63.89% vs. 60.19%). Expanded bovine blastocysts exposed to similar magnitude and time of HGP also did not shown significant differences in hatching rates (88, 2% control vs. 90, 9% HGP) at D10 of the CIV [14].

The induction of sublethal stress in embryos has been shown to cause alteration in the pattern of gene expression [12,14]. Negative cell growth regulator genes, like growth arrest specific 5 (*Gas5*) and growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma (*Gadd45g*) [25] have been related to the long-term stress response [3]. Both genes were reported with altered expression 120min after exposure of bovine embryos to sublethal stress by HHP. The *Gadd45g* presented a supra expression of 1.2 to 2 times and the *Gas5* presented tendency of supra expression [3]. Due genes relationship with the growth, they may indicate that cells protect themselves from pressure-induced sublethal stress, slowing its growth, until physiological conditions are restored [8].

This may explain the behavior of embryos exposed to HGP at D5, which presented significantly slower development kinetics when compared to control group, showing higher rates of embryos development at the early stages on D7 and in the expanded blastocyst stage in the MCF group (Fig. 1). Possibly, as a cellular response to HGP exposure, the embryonic cells reduced their metabolism until they returned to homeostasis. More research are needed to prove this relationship, since there are few reports in the literature about the effect that sublethal stress acts on the kinetics of previous embryonic development, expansion and hatching of blastocysts.

When cells are exposed to stressors, the ability to adapt determines what their target will be. The cellular response to stress depends on the type and level of damage, as the production of proteins [7]. Stress can also induce the generation of a "biological memory", which is characterized by a lasting cellular response to a transient stimulus [4].

The second experiment sought to evaluate whether exposure of the morulae to a sublethal stress on D5 of the IVC, could induce a cellular biological memory, in which the embryo exposed to a second stress, such as cryopreservation, responded more quickly and efficiently. Post-thaw, there was observed that the ability to re-expand the MPC group did not differ significantly from the MCC group (57,4% vs. 54,0% respectively). Current results differ from JIANG [12], which vitrified bovine blastocysts after exposure to three different magnitudes of HHP (40, 60 and 80MPa). They were observed higher re-expansion rates in groups exposed to 40 and 60 MPa compared to control. An acceleration in the re-expansion process (4 to 6h vs. 20h) was related in murine embryos at the expanded blastocyst stage exposed to 60 MPa HHP for 30 minutes, prior to vitrification [20].

In our study, hatchability rate did not differ significantly among MPC and MCC groups, respectively, at D8 21.0% (21/100) vs. 21.28% (20/94), D9 28.0% (28/100) vs. 30.85% (29/94) and D10 29.0% (29/100) vs. 32.98% (31/94). Previous this study, Becker (2016) evaluated the exposure of murine embryos at the blastocyst stage to HGP and also found no difference between hatching rates in the exposed group at 27.6 MPa for 2 hours and the control. On the other hand, higher embryo survival after cryopreservation was reported in bovine blastocysts exposed to HHP at 80 MPa for 45 minutes prior to freezing [21].

The embryonic survival to sublethal stress depends on the magnitude and the duration of pressure applied [20], species and embryonic development stage [3]. Experiments in which IVP bovine embryos were exposed to HHP at pressures higher than 27.6 MPa showed significant differences in embryo viability rates (PRIBENSZKI et al., 2005; [12]). This demonstrates the importance of evaluating different magnitudes and times of exposure to HGP, specifically for bovine embryos. This may explain some of the results found in this study, since the effects of HGP may have been obscured by insufficient magnitude or exposure time of sublethal stress.

In conclusion, the present study demonstrates that the exposure of morulae (D5) to HGP of 27.6 MPa for 120 min reduced kinetics of embryonic development between D5 - D7. However, it did not change the fresh embryo developmental ability to reach

blastocyst stage (D7) and neither their hatching rate (fresh and post-thaw) at D8, D9 and D10. Further studies are required to better understand the effect of HGP on developmental embryonic.

Conflict of interest

There are no known conflicts of interest associated with this publication.

References

- [1] T. Abe, R. Kawahara-Miki, T. Hara, T. Noguchi, T. Hayashi, T. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata, Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol, *Journal of Reproduction and Development* 63 (2017) 455–461.
- [2] A. Amin, A. Gad, D. Salilew-Wondim, S. Prastowo, E. Held, M. Hoelker, F. Rings, E. Tholen, C. Neuhoff, C. Looft, K. Schellander, D. Tesfaye, Bovine Embryo Survival Under Oxidative-Stress Conditions is Associated With Activity of the NRF2-Mediated Oxidative-Stress-Response Pathway, *Molecular Reproduction & Development* 81 (2014) 497–513.
- [3] I. Bock, E. Losonczi, S. Mamo, Z. Polgar, A. Harnos, D. Andras, C. Pribenszky, Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance, *Cryoletters* 31 (2010) 401-412.
- [4] D. R. Burrill, P. A. Silver, Making Cellular Memories, *Cell* 140 (2010) 13-18.
- [5] F. J. F. Collares, Dissertação de Mestrado: Expressão gênica e taxas de desenvolvimento de embriões *Mus musculus domesticus* expostos à pressão gasosa no estágio de 8-células e submetidos à criopreservação no estágio de blastocisto. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2014.
- [6] A. E. Crosier, P. W. Farin, M. J. Dykstra, J. E. Alexander, C. E. Farin, Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*, 64 (2001) 1375-1385.
- [7] S. Fulda, A. M. Gorman, O. Hori, A. Samali, Cellular stress responses: cell survival and cell death, *International Journal of Cell Biology* 2010 (2010) 1-23.
- [8] V. T. George, G. Brooks, T. C. Humphrey, Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol Biol Cell* 18, (2007) 4168–4179.
- [9] A. V. Gonsiorosky, Dissertação de Mestrado. Congelamento ou Vitrificação de Blastocistos Bovinos produzidos *in vitro* previamente expostos a Estresse Subletal. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2018.

- [10] P. J. Hansen, To be or not to be - determinants of embryonic survival following heat shock. *Theriogenology*, 68 (2007) 40-48.
- [11] B. H. Hite, The effect of pressure in the preservation of milk: a preliminary report. *West Virginia Agricultural Experiment Station* 58 (1899) 1-36.
- [12] Z. Jiang, P. Harrington, M. Zhang, S. L. Marjani, J. Park, L. Kuo, C. Pribenszky, X. Tian, Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of In Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts, *Scientific Reports* 6 (2016)1-9.
- [13] K.A.G Karatzas, M.H.J Bennik, Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high Tolerance towards High Hydrostatic Pressure, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2002) 3183-3189.
- [14] D.A. Mentz, Dissertação de Mestrado: Efeitos da Alta Pressão Gasosa sobre a Viabilidade e Expressão Gênica de Blastocistos Expandidos Bovinos produzidos *in vitro* submetidos à Criopreservação. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, 2018.
- [15] A. Mesalama, K. Lee, I. Khana, M.M. R. Chowdhury, S. Zhang, S. Song, M. D. Joo, J. H. Lee, J. I. Jin, K. Kong, A combination of bovine serum albumin with insulin transferrin–sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix metalloproteinases, *Reproduction, Fertility and Development* 31 (2018) 333-346.
- [16] R. Morató, T. Mogas, New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryosq *Cryobiology* 68 (2014) 288–293.
- [17] J. J. Parrish, J. Susko-Parrish, M. A. Winer, First Capacitation of Bovine Sperm by Heparin, *Biology of Reproduction* 38 (1988) 1171-1180.
- [18] G. Perry, Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals, *Embryo Transfer Newsl* 35 (2017) 08-23.
- [19] J. W. Pollard, S. P. Leibo, Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos, *Theriogenology* 39 (1993) 287.
- [20] C. Pribenszky, M. Molnár, S. Cseh, L. Solti, Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge, *Animal Reproduction Science*, 87, (2005a) 143–150.
- [21] C. Pribenszky, M. Molnar, P. Ulrich, C. Barbosa, L. Hatamoto, C. Santos, Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocyst cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 40 (2005b) 338–344.
- [22] C. Pribenszky, F. E. Siqueira, M. Molnár, A. Harnos, Rumpf, R. Improved post-warmin.g developmental competence of open pulled straw-vitrified in vitro-produced

- bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pretreatment, *Reproduction, Fertility and Development* 20 (2008) 125-125.
- [23] C. Pribenszky, G. Vajta, M. Molnar, Y. Du, L. Lin, L. Bolund, J. Yovich, Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology, *Biology of reproduction* 83 (2010) 690-697.
- [24] B. A. Rodrigues, C. A. Rodrigues, M.B. Salviano, B. R. Wilhelm, F. J. F. Collares, J. L. Rodrigues, High gaseous pressure pretreatment in in vitro maturation of canine oocytes, *Reproduction, Fertility and Development* 25 (2012) 282-283.
- [25] C.M. Smith, J.A. Steitz, Classification of *gas5* as a Multi-Small-Nucleolar-RNA (snoRNA) Host Gene and a Member of the 5'-Terminal Oligopyrimidine Gene Family Reveals Common Features of snoRNA Host Genes, *Mol Cell Biol* 18 (1998) 6897–6909.
- [26] J. F. Souza, L. L. Lienoua, A. P. R. Rodrigues, T. V. Cavalcante, R. R. Santos, J.R. Figueiredo, F. Dias, Cryosurvival after exposure of IVF-derived Nellore embryos to different cryoprotectants and exposure times during vitrification. *Cryobiology* 84 (2018) 95–97.
- [27] M. J. Sudano, V.G. Santos, A. Tata, C.R. Ferreira, D.M. Paschoal, R. Machado, J. Buratini, M.N. Eberlin, F.D.C.Landim-Alvarenga, Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts, *Biology of Reproduction* 87 (2012) 1–11.
- [28] B. Trigo, M. Muñoz, E. Gómez, J. N. Caamaño, D. Martín, S. Carrocera, R. Casais, C. Diez, Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure, *Reproduction in Domestic Animals* 48 (2013) 200-206.
- [29] S. M. B. Ulloa, A. L. Hahn, D. Herrmann, K.G. Hädeler, A. Aldag, U. Baulain, H. Niemann, Oocyte pre-IVM with caffeine improves bovine embryo survival after vitrification, *Theriogenology* 86 (2016) 1222–1230.