

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Lia Mara Gomes Paim

**EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-
OÓCITO IMATUROS DE *Rattus norvegicus* UTILIZANDO
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E
TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR
E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

**PORTO ALEGRE
2015**

Lia Mara Gomes Paim

**EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-
OÓCITO IMATUROS DE *Rattus norvegicus* UTILIZANDO
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E
TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR
E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

PORTO ALEGRE
2015

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIAS

Apesar de a titulação de mestre ser atribuída a um único indivíduo, é inegável que o resultado destes dois anos de estudo e dedicação são frutos de colaborações entre diversas pessoas que viabilizam o andamento dos trabalhos. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Alexandre Tavares, pela paciência durante todo esse período, tendo a calma e a serenidade de me ajudar nas dificuldades e responder as dúvidas do cotidiano. Além disso, gostaria de lhe agradecer pela confiança depositada em mim para a execução deste trabalho, tanto na parte prática como na teórica e por sempre me motivar a seguir em frente, me afirmando que eu sou capaz de desenvolver grandes contribuições científicas.

Também gostaria de agradecer aos colegas do Laboratório de Biologia Celular pelas amizades construídas, pelas risadas compartilhadas e pelo companheirismo durante os momentos de dificuldades. Mesmo nos momentos de desentendimentos e desavenças, vocês foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional. Em especial, gostaria de agradecer a Juliana, minha querida IC, que esteve comigo durante esses dois anos inteiros e aprendeu tanta coisa em tão pouco tempo e que, junto comigo, superou dificuldades da rotina prática que muitas vezes pareciam insuperáveis.

À minha amada família - meus pais, minha irmã, meu cunhado e meu lindo sobrinho - por serem os pilares mais importantes para que eu siga neste caminho que estou. Por nunca duvidarem da minha capacidade e me incentivarem a ir atrás dos meus objetivos. Vocês, com certeza, foram essenciais para que eu chegasse ao final desta jornada.

Ao meu amado Darlan Conterno Minussi por estar comigo desde o início desta caminhada e por não permitir que eu desanimasse ao menor obstáculo. Graças a tua ajuda e carinho, consegui superar barreiras que achei que não superaria sozinha.

E, por fim, aos amigos de longa e de curta data que me acompanharam nesta trajetória, mesmo com a minha eventual ausência devido aos experimentos e aulas.

Muito obrigada por tudo!

RESUMO

Oócitos mamíferos submetidos a vitrificação ainda apresentam baixa viabilidade após a criopreservação. Consequentemente, os resultados de desenvolvimento embrionário subsequente são pouco expressivos se comparados com a vitrificação de embriões. Por esses motivos, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da associação de dois agentes crioprotetores usados na vitrificação de Complexos Cumulus-Oócito (CCOs) imaturos de *Rattus norvegicus* em diferentes concentrações e períodos de exposição sobre as taxas de retomada de meiose, maturação nuclear e desenvolvimento embrionário. Fêmeas pré-púberes Wistar foram superovuladas com 20 UI de eCG IP e eutanasiadas após 48 horas. Os ovários foram retirados da cavidade abdominal e mantidos em PBSm à 37°C até o momento da escarificação para liberação dos CCOs. A observação e a seleção morfológica dos CCOs foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio. No primeiro experimento, os CCOs selecionados foram expostos a soluções de equilíbrio contendo diferentes concentrações de EG e DMSO diluídos em PBSm por 4 minutos. Após esse período, os CCOs foram expostos por 60 segundos a soluções crioprotetoras de acordo com os grupos: G1 - 2,7 M EG + 1,92 M DMSO; G2 - 3,6 M EG + 1,28 M DMSO; G3 - 4,5 M EG + 0,64 M DMSO; e G4 - 5,4 M EG; adicionadas de 0,5 M de sacarose e 0,025 M de ácido hialurônico diluídos em PBSm. O grupo controle não foi exposto às soluções crioprotetoras. Após a exposição, os CCOs foram transferidos para placas com meio de maturação por 30 horas. Ao final da MIV, os CCOs foram desnudados e corados com Hoechst para avaliação das taxas de retomada de meiose e maturação nuclear. As soluções de equilíbrio e crioprotetora usadas no G4 foram utilizadas nos experimentos seguintes. No segundo experimento, os CCOs foram expostos à solução de equilíbrio por 4 minutos e à solução crioprotetora por 30, 60 ou 90 segundos, sendo imediatamente imersos em N₂. O grupo controle não foi vitrificado. Após 7 dias vitrificados, os CCOs foram reaquecidos e maturados *in vitro* por 30 horas. As taxas de retomada de meiose e maturação nuclear foram avaliadas após o período de maturação. No terceiro experimento, os CCOs foram vitrificados com o tempo de exposição à solução crioprotetora de 60

segundos. O grupo controle não foi vitrificado. Após 7 dias vitrificados, os CCOs foram reaquecidos, maturados *in vitro* e ativados partenogeneticamente. Taxas de clivagem, mórula e blastocistos foram observadas durante 5 dias. No primeiro experimento, o grupo controle apresentou taxas de retomada de meiose (76,3%) e maturação nuclear (50%) superiores às obtidas nos grupos expostos as soluções crioprotetoras. No mesmo experimento, o G1 apresentou taxas de retomada de meiose (48,6%) e maturação nuclear (21,6%) inferiores quando comparado aos outros grupos expostos. No segundo experimento, o grupo controle apresentou taxas de retomada de meiose (79,6%) e maturação nuclear (36,3%) superiores em relação aos grupos vitrificados. Entretanto, dentre os grupos vitrificados, não houve diferença estatística. No terceiro experimento, as taxas de clivagem (65,3%) e mórula (38,8%) do grupo controle foram superiores em relação ao grupo vitrificado (14,5 % e 1,8 %, respectivamente). Entretanto, as taxas de blastocistos foram similares no grupo vitrificado e no grupo controle. Os resultados obtidos a partir dos nossos experimentos mostraram que a exposição à etilenoglicol e dimetilsulfóxido, em associação e em determinadas concentrações, pode ser tóxica para CCOs de *Rattus norvegicus* e prejudicar a maturação nuclear e o desenvolvimento embrionário posteriores. Portanto, são necessários mais experimentos para determinar condições adequadas para vitrificação de CCOs de *Rattus norvegicus*.

Palavras-chave: Vitrificação; Crioprotetores; Oócitos; Ratos; Embriões

ABSTRACT

Generally, mammalian oocytes exposed to vitrification present low viability after warming. Consequently, subsequent embryo development rates are also low compared to embryo vitrification. Hence, the aim of this study was to assess the effects of the association of two cryoprotectants used for *Rattus norvegicus* immature Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) vitrification using different concentrations and exposure periods on meiosis resumption, nuclear maturation and embryo development rates. Female pre-puberal Wistar rats were superovulated by 20 IU eCG IP injection and euthanized after 48 hours. Ovaries were then immediately removed from the abdominal cavity and maintained at 37°C in mPBS upon ovarian slicing. Further COC morphological selection was performed under stereomicroscope. In the first experiment, COCs were exposed to equilibrium solutions containing different concentrations of EG and DMSO diluted in mPBS for 4 minutes. After exposure, COCs were exposed to cryoprotective solutions for 60 seconds as the following groups: G1 - 2.7M EG + 1.92M DMSO; G2 - 3.6M EG + 1.28M DMSO; G3 - 4.5M EG + 0.64M DMSO; and G4 - 5.4M EG; added to 0.5M sucrose and 0.025M hyaluronic acid diluted in mPBS. Control group was not exposed to either the solutions. After exposure, COCs were transferred to maturation medium for 30 hours. At the end of MIV, COCs were denuded and stained with Hoechst to assess meiosis resumption and nuclear maturation status. Equilibrium and cryoprotective solutions correspondent to G4 were used for further experiments. In the second experiment, COCs were exposed to equilibrium solution for 4 minutes and to cryoprotective solution for 30, 60 or 90 seconds and immediately plunged into N₂. Control group was not vitrified. After 7 days, COCs were warmed and *in vitro* matured for 30h. Meiosis resumption and nuclear maturation rates were assessed after 30h maturation. Finally, in the third experiment, COCs were vitrified using 60 seconds exposure period. Control group was not vitrified. After 7 days, COCs were warmed, *in vitro* matured for 30h and parthenogenetically activated. Cleavage, morula and blastocyst formation were observed throughout 5 days of embryo culture. In the first experiment,

control group presented higher meiosis resumption (76.3%) and nuclear maturation (50%) rates compared to the groups exposed to equilibrium and cryoprotective solutions. Moreover, G1 presented lower meiosis resumption (48.6%) and nuclear maturation (21.6%) rates compared to G2, G3 and G4. In the second experiment, control group presented higher meiosis resumption (79.6%) and nuclear maturation (36.3%) rates compared to the vitrified groups. However, there were no significant differences among the vitrified groups. In the third experiment, cleavage (65.3%) and morula (38.8%) rates were higher in the control group compared to the vitrified group (14.5% and 1.8%, respectively). However blastocyst rates were similar between the control and vitrified groups. Our data shows that the use of EG alone as a cryoprotective agent provides better MR and NM rates and considerable cleavage and morula rates. However, more research is necessary in order to elucidate more suitable conditions for *Rattus norvegicus* COC vitrification.

Key-words: Vitrification; Cryoprotectants; Oocytes; Rats; Embryo

Sumário

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
1.1	O complexo <i>cumulus</i> -oócito	11
1.1.1	Aspectos Morfológicos	11
1.1.2	Aspectos Bioquímicos	16
1.1.3	Maturação Citoplasmática	18
1.1.4	Maturação Nuclear	20
1.2	Métodos de Criopreservação	24
1.2.1	Congelamento	26
1.2.2	Vitrificação	29
1.3	Agentes Crioprotetores	35
1.3.1	Classificação e Mecanismos de Ação	35
1.3.2	Toxicidade dos Agentes Crioprotetores	39
1.4	Métodos de Avaliação da Viabilidade Oocitária	42
1.4.1	Maturação <i>in vitro</i>	42
1.4.2	Ativação Partenogenética	45
1.4.3	Desenvolvimento Embrionário <i>in vitro</i>	48
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
3	OBJETIVOS	65
3.1	Geral	65
3.2	Específicos	65
4	SITUAÇÃO DO MANUSCRITO	66
5	ARTIGO CIENTÍFICO	67
5.1	Abstract	68
5.2	Introduction	70
5.3	Materials and Methods	72
5.3.1	Animals	72
5.3.2	Media and Reagents	73
5.3.3	Experimental Design	73
5.3.4	Cumulus-Oocyte Complex Recovery	74
5.3.5	Analysis of Exposure to Different Equilibrium and Cryoprotective Solutions	75
5.3.6	<i>In vitro</i> Maturation and Developmental Competence Assessment	76
5.3.7	Analysis of Different Exposure Periods to Equilibrium and Cryoprotective Solutions before Vitrification	77
5.3.8	Vitrification and Warming	78
5.3.9	Parthenogenetic Activation and Embryonic Development Assessment of COCs after Vitrification	78
5.3.10	Statistical Analysis	80
5.4	Results	81
5.4.1	Analysis of Exposure to Different Equilibrium and Cryoprotective Solutions	81
5.4.1	Analysis of Different Exposure Periods to Equilibrium and Cryoprotective Solutions before Vitrification	82
5.4.1	Parthenogenetic Activation and Embryonic Development Assessment of COCs after Vitrification	83

5.5 Discussion	84
5.6 Conclusion	88
5.7 Declaration of Conflicting Interests.....	89
5.8 References	89
6 CONCLUSÃO.....	67
7 REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA <i>THERIOGENOLOGY</i>	95
8 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	107

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O complexo *cumulus*-oócito

1.1.1 Aspectos Morfológicos

Oócitos são células grandes que se desenvolvem no folículo ovariano e fornecem metade do seu material genético ao embrião, bem como, praticamente todos os determinantes citoplasmáticos necessários para seu desenvolvimento (1). Durante a formação do antro folicular, as células da granulosa se diferenciam em células da granulosa murais e células do *cumulus oophorus* (2). As células da granulosa murais formam a parede folicular, enquanto as células do *cumulus* envolvem o oócito (2) (Figura 1a). As células em contato direto com o oócito desenvolvem projeções citoplasmáticas que cruzam a zona pelúcida e formam junções do tipo *gap* com o oolema (2). Essa estrutura composta pelo oócito e pelas células do *cumulus* de forma organizada é chamada complexo cumulus-oócito (CCO) (Figura 1b e 1c). Através de interações parácrinas e juncionais com as células somáticas ao seu redor, o oócito passa por processos de desenvolvimento incluindo o remodelamento do citoesqueleto, progressão do ciclo celular, fecundação e a própria manutenção do metabolismo oocitário (1). Os oócitos mamíferos são envoltos por um material glicoprotéico, semelhante a uma gelatina, chamada zona pelúcida, que separa o oócito das células foliculares localizadas ao redor (3).

No aspecto nuclear, enquanto os cromossomos se agrupam no final da telófase da segunda meiose, uma grande quantidade de nucléolos aparece no oócito (3). Tais nucléolos podem apresentar uma estrutura em formato anelar, contendo uma parede espessa e densa em volta de uma região central menos densa (3, 4) (Figura 2a). Ainda, o material que compõe a parede do nucléolo consiste em uma estrutura difusa com pequenos grânulos densos (4).

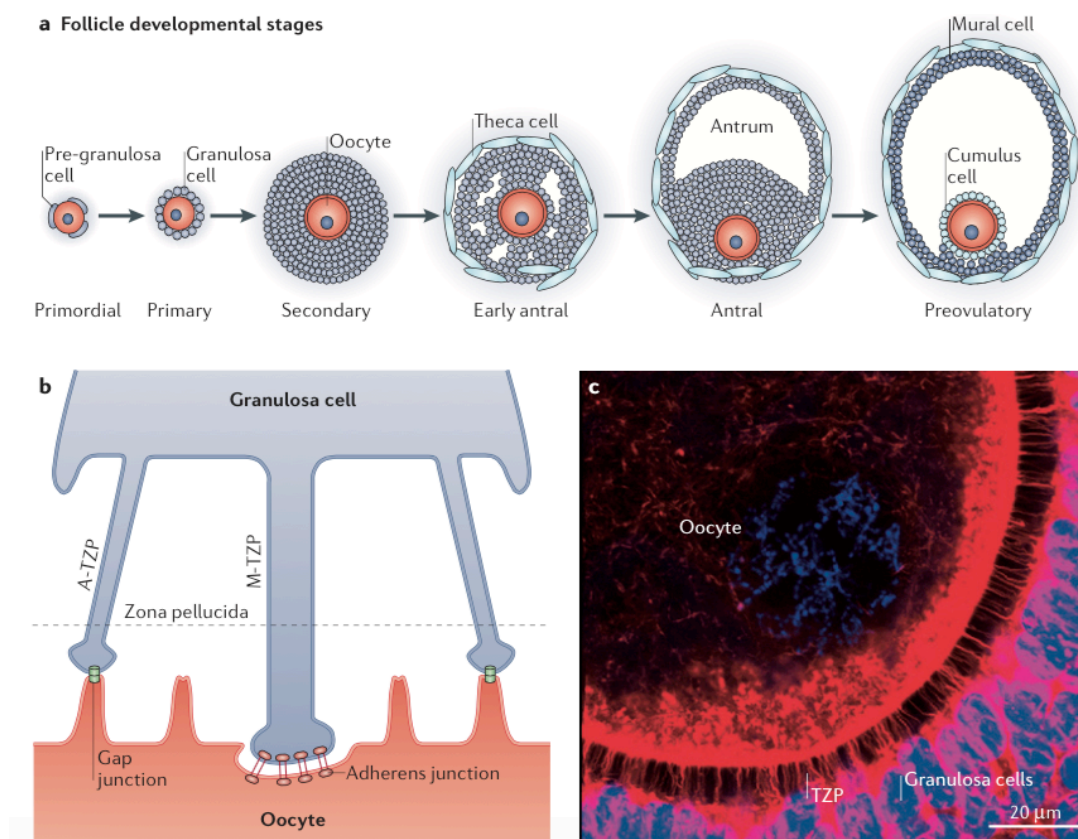


Figura 1. Desenvolvimento folicular e interação do oócito com células somáticas. **a.** Os oócitos de mamíferos se desenvolvem dentro de folículos ovarianos, que consistem de células estromais (conhecidas como células da teca) na parte externa de uma membrana basal (não mostrada) e células epiteliais (conhecidas como células da granulosa) dentro da membrana basal, que fazem contato direto com a superfície do oócito. A medida que o folículo cresce, as células da granulosa se proliferam por mitose até que uma cavidade contendo um fluido (o antrum) aparece nos estágios finais do desenvolvimento folicular. Estudos sobre a maturação meiótica requerem o isolamento do oócito imaturo, na fase de vesícula germinativa, a partir de folículos pré-ovulatórios associados com uma população de células da granulosa especializadas, conhecidas como células do *cumulus*. As camadas mais externas das células da granulosa são conhecidas como células murais que irão abrigar o corpo lúteo. **b.** As projeções transzonais (TZP) das células da granulosa atravessam a zona pelúcida e formam junções aderentes com invaginações profundas na superfície do oócito e/ou junções do tipo *gap* na membrana plasmática do oócito. As TZPs podem ser ricas em F-actina (A-TZP), ou podem ser compostas principalmente por microtúbulos (M-TZP). **c.** Imagem de A-TZP (corado com *phalloidin*, em vermelho) em um oócito bovino. A imagem em **c** é cortesia de D. F. Albertini, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas, USA.

Figura retirada de Li & Albertini, 2013 (2).

O nucleoplasma do oócito é, essencialmente, diferente do ooplasma, tanto em aparência quanto em densidade (4). Ele consiste em um material fino e homogêneo e possui locais de maior densidade dispersos pela sua estrutura (4). Já os cromossomos visualizados através de microscopia eletrônica não possuem grandes diferenças daqueles de outras células, como células foliculares (3). Eles se apresentam como uma malha densa de materiais fibrosos finos e granulares (3-5).

O núcleo dos oócitos em prófase é envolvido por duas membranas distintas, separadas por um espaço chamado de espaço perinuclear de Watson (6) (Figura 2b). A parte interna da membrana está em contato direto com o material granular que preenche o núcleo neste estágio e, além disso, a própria membrana nuclear pode possuir trechos contendo material granular condensado ao longo de sua parte interna (6).

Em relação ao complexo de Golgi, é sabido que há uma sequência na distribuição desta organela de acordo com os estágios de crescimento oocitário (3). Em estágios iniciais, o complexo de Golgi consiste em uma massa reticular localizada em uma área perinuclear (3, 4). Já em estágios mais avançados, essa massa reticular se dispersa pelo citoplasma, e em oócitos com o crescimento completo, o complexo de Golgi se aproxima da parte cortical, abaixo da membrana plasmática (3) (Figura 2c).

A basofilia citoplasmática observada nos oócitos ocorre devido a presença de pequenas partículas densas do citoplasma e dos nucléolos, ricas em RNA (7). No citoplasma do oócito, componentes basofílicos podem ser encontrados, podendo variar em sua distribuição de acordo com a fase de crescimento oocitário. Em oócitos jovens e até maduros, essas partículas são menos evidentes do que nos oócitos fecundados e em desenvolvimento (3). Entretanto, a presença do retículo endoplasmático não é proeminente em oócitos em desenvolvimento ou maduros e pode ser encontrado em associação com as mitocôndrias (4, 5).

Nos oócitos mamíferos, estruturas vesiculares chamadas de corpos multivesiculares podem ser encontradas (3). No oócito imaturo, essas estruturas aparecem dispersas aleatoriamente em pequenas quantidades, entretanto, em oócitos maduros, elas aumentam em número e ocupam uma posição predominantemente periférica (3). Os corpos multivesiculares de mamíferos podem ser caracterizados pela presença de vesículas menores, em sua região interna, e pela presença de uma massa nuclear densa localizada próximo ao centro da vesícula (3) (Figura 2d).

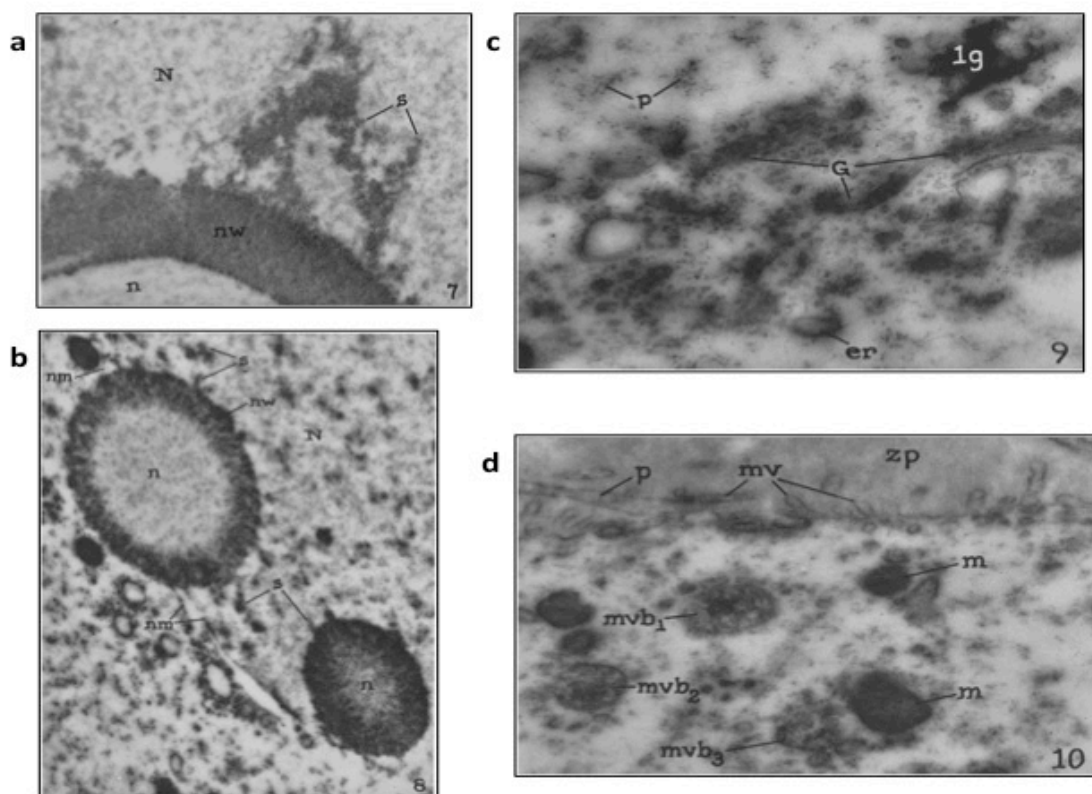


Figura 2. Micrografias de estruturas citoplasmáticas e nucleares encontradas em oócitos de rato. **a.** Imagem de uma pequena parte da parede de um nucléolo de um oócito em estágio final de crescimento. O nucleoplasma (*N*) está representado na porção superior da figura, enquanto o centro menos denso do nucléolo está representado na parte inferior à esquerda (*n*). A parede nucleolar (*nw*) é composta de um material granular compacto. x 21000. **b.** Micrografia de parte do núcleo de um oócito. As duas membranas do envelope nuclear, separadas pelo espaço perinuclear podem ser observadas em *nm*. x 21000. **c.** Micrografia mostrando estruturas finas características do Complexo de Golgi e estruturas associadas encontradas no oócito. Estruturas lamelares (membrana dupla) características do Complexo de Golgi são observadas em vários pontos do campo (*G*). Pequenas partículas densas são observadas em *p*. x 35000. **d.** Córtex de um oócito em estágio final de crescimento mostrando corpos multivesiculares isolados. Três ou mais corpos multivesiculares limitados por membrana contendo diversas pequenas vesículas podem ser observados em *mvb*. A zona pelúcida (*zp*) e microvilosidades (*mv*) podem ser observadas neste campo. x 36000.

Figura editada a partir de Sotelo & Porter, 1959 (3).

Além das organelas presentes no citoplasma, a interação com as células do cumulus é fundamental para o desenvolvimento oocitário. Estas células fornecem metabólitos essenciais, além de regularem os processos de progressão da meiose através de vias de sinalização específicas e modularem a atividade transcricional do oócito (8). As células do cumulus surgem a partir de células da granulosa relativamente indiferenciadas (9). As células da granulosa são o tipo celular primário no ovário e estão em diferenciação ativa durante a foliculogênese (9). Essa diferenciação gera - em

diversos mamíferos, incluindo humanos - duas linhagens, anatômica e funcionalmente, distintas: células da granulosa murais e células do cumulus (9). As células do cumulus e da granulosa expressam muitos genes em comum, mas o seu transcriptoma difere em alguns aspectos, por exemplo, em camundongos as células do cumulus expressam genes como *Slc38a3* (que codifica para um transportador de aminoácidos acoplados ao sódio) e *Amh* (que codifica para o hormônio antimulleriano) em maiores quantidades do que as células da granulosa (9).

Além disso, em diversas espécies como humanos, camundongos e ovelhas, as células do cumulus passam por extensa proliferação momentos antes e logo após o pico de LH (9). Desta forma, a capacidade de proliferação das células do cumulus tem sido associada com o desenvolvimento oocitário normal, a ovulação e a fecundação (9). Por esse motivo, a proliferação das células do cumulus associadas ao oócito também é um indicativo do potencial de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente e tem sido utilizada como um parâmetro de seleção dos CCOs em diferentes espécies mamíferas (10). Diversos marcadores morfológicos e moleculares de qualidade oocitária tem sido propostos, e devido a necessidade de comunicação entre células do cumulus e oócito, a avaliação morfológica é aplicada ao CCO como um todo (10).

De uma maneira geral, em mamíferos, considera-se que a visualização de células do cumulus compactas, com diversas camadas contínuas e ooplasma homogêneo são sinais de qualidade oocitária (10). Enquanto que células do cumulus escuras, com poucas camadas incompletas e granuladas e ooplasma heterogêneo são correlacionados com baixa qualidade oocitária (10).

Outros parâmetros podem ser utilizados para a avaliação da qualidade oocitária *in vitro*, como a própria produção de embriões, a avaliação do nível de expressão de genes específicos, a atividade mitocondrial e as medidas de cálcio, ATP ou glutathione, etc (10). Porém, como alguns desses métodos são muito invasivos e inviabilizam a utilização posterior dos CCOs, a avaliação morfológica continua sendo a metodologia de escolha para seleção de CCOs imaturos (10).

1.1.2 Aspectos Bioquímicos

O crescimento oocitário marca o começo de um período caracterizado por um aumento acentuado de volume e por mudanças seletivas na expressão de genes que visam atender as demandas de armazenamento de organelas e macromoléculas que serão utilizadas na fase de embrião (1). Cooperações metabólicas ocorrem entre oócitos e células somáticas no folículo para assegurar o fornecimento de substratos para o oócito em crescimento (1, 11). Essas relações são mediadas pelas junções do tipo *gap* e envolvem múltiplos mecanismos de comunicação celular, particularmente, entre oócitos e células da granulosa (1, 11). Em bovinos, demonstrou-se que tais comunicações via junções do tipo *gap* possuem um papel importante na regulação do remodelamento da cromatina e transcrição durante as primeiras horas de maturação *in vitro* (11).

Cascatas de sinalização parácrinas também integram a oogênese com a foliculogênese e envolvem membros específicos da família dos fatores de crescimento tumoral- β (TGF β) no oócito, como por exemplo, o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) (1). Diversos fatores parácrinos como o fator de crescimento epidermal (EGF) e fatores semelhantes ao EGF, endotelina-1 e outras moléculas como o óxido nítrico (NO) regulam a quebra de vesícula germinativa através da via da MAPK/ERK em células foliculares (12). Especula-se que a ativação das células da granulosa murais pelo LH estimula a sinalização por AMPc, que induz a expressão de fatores de crescimento semelhantes ao EGF (12). Esses fatores funcionam através da ativação de receptores de EGF tanto de maneira autócrina dentro da camada mural, como através de difusão, agindo nas células do cumulus (12).

A necessidade de contato físico entre oócito e células da granulosa para atender às demandas metabólicas de ambas as células tem sido mostrada através de experimentos que avaliaram os perfis de expressão gênica de oócitos e células da granulosa (1). Alguns trabalhos mostraram que fatores secretados pelos oócitos, como o GDF9 e a proteína morfogênica óssea 15 (BMP15) estão diretamente relacionados com a modulação do metabolismo energético e biossíntese de colesterol, que são cascatas

ausentes nos oócitos, porém altamente funcionais em células da granulosa (1, 13).

A importância da cooperação metabólica entre oócitos e células do cumulus é vista em certas rotas metabólicas como por exemplo a via de metabolização da glicose (13, 14). Quando a glicose é metabolizada a piruvato pelas células do cumulus, ela é transferida ao oócito e usada em processos de produção de energia (13, 14). Além disso, parte do colesterol que é sintetizado pelas células do cumulus também é transferido aos oócitos, dada a inabilidade das células germinativas produzirem e obterem esse lipídio a partir de microambientes externos (13, 14).

Durante o crescimento e a maturação nuclear, o oócito se mantém estacionado no estágio de diplóteno da prófase da meiose I até que haja o estímulo do hormônio luteinizante (LH), que é um hormônio glicoproteico dimérico secretado pela glândula pituitária (1, 13). Após o pico de LH, fatores solúveis presentes no oócito ativam a produção de sinais indutores de meiose nas células do cumulus (14). Estes sinais são transferidos de volta ao oócito via junções *gap* e, ao mesmo tempo, a neuroregulina I - um potencial ligante do receptor ERBB3 - é produzido pelas células do cumulus para aumentar a produção de progesterona nas células da granulosa (15). Com o estímulo do LH, a capacitação oocitária é completada e a meiose é retomada, ocorrendo a dissolução do envelope nuclear e a condensação dos cromossomos (1).

A cascata de MAPK, especificamente MAPK3/1, pode ser ativada por gonadotrofinas das células da granulosa murais e do cumulus (12). Evidências mostram que a ativação de MAPK em células somáticas foliculares, mas não no oócito, é indispensável para a retomada de meiose, enquanto, a ativação da cascata de MAPK dentro do oócito está relacionada com eventos que ocorrem após a quebra de vesícula germinativa, como a organização do fuso meiótico (16).

Para que o oócito permaneça em prófase I antes do pico de LH, sinais inibitórios do ciclo celular são transmitidos das células do cumulus ao oócito, sendo que o GMPc encontrado nas células somáticas é um importante sinal inibitório da maturação oocitária (11, 17). O GMPc atravessa as junções *gap*, entrando no oócito, onde ele inibe a hidrólise de AMPc pela fosfodiesterase

PDE3A (17). Essa inibição mantém altas concentrações de AMPc dentro do oócito e bloqueia a progressão da meiose (17). Para que estes sinais inibitórios sejam ultrapassados e o ciclo celular seja retomado, uma cascata complexa de sinalização é necessária (17). Esta cascata de sinalização depende de proteínas semelhantes ao EGF e da reversão do sinal inibitório através do estímulo de LH, conseqüentemente diminuindo os níveis de GMPc nas células somáticas e bloqueando as junções *gap* que existem entre estas células, o que causa uma diminuição de AMPc no oócito, levando a retomada da meiose (12).

1.1.3 Maturação Citoplasmática

Apesar de se ter conhecimento de que a maturação citoplasmática envolve modificações traducionais, pós-traducionais e de organelas, os mecanismos específicos que envolvem esses eventos, em termos moleculares, ainda não são bem definidos (1, 18, 19). Mesmo assim, sabe-se que a maturação citoplasmática é essencial para a progressão da meiose, prevenção de polispermia e para o desenvolvimento embrionário inicial (19-22).

Mudanças estruturais no citoplasma ocorrem durante a maturação e incluem o aumento no número e modificações morfológicas das mitocôndrias, complexos de Golgi e acúmulo de ribossomos (23). Devido a importância da mitocôndria como componente responsável pelo suprimento energético, o deslocamento desta estrutura para áreas de maior nível de consumo energético é crucial para o oócito durante os períodos do ciclo celular (19). Em bovinos, durante o período de maturação, as mitocôndrias se encontram em uma posição mais periférica, distribuindo-se de maneira mais dispersa por todo o citoplasma (24). Por outro lado, ao atingir a metáfase II, as mitocôndrias passam a ocupar uma posição mais central na célula (19).

Para que haja uma produção adequada de proteínas no oócito, os ribossomos devem estar presentes em quantidades ideais no citoplasma (19). Estas estruturas são sintetizadas a partir da transcrição de genes do RNAr, sendo que o sítio de formação das subunidades ribossomais é o nucléolo. Portanto, a presença dos ribossomos está diretamente relacionada com a atividade de síntese proteica durante períodos de desenvolvimento

(19). O oócito presente nos folículos primordiais possui a transcrição inativa, e o nucléolo é composto exclusivamente por porções granulares, indicando a ausência de síntese de ribossomos (25). Durante a metáfase da primeira meiose, a síntese proteica aumenta cerca de três vezes em relação a fase de quebra da vesícula germinativa (GVBD), porém quando o oócito atinge a segunda metáfase, a tradução de RNAm volta a níveis basais (19).

O retículo endoplasmático (RE) possui importantes funções, dentre elas a regulação da concentração de cálcio disponível no citoplasma. Portanto, mudanças bioquímicas e estruturais nesta organela durante a maturação são críticas para a regulação apropriada do cálcio intracelular (19). Análises *in vivo* de oócitos de camundongo na fase de vesícula germinativa (GV) mostraram que o RE fica uniformemente distribuído pelo citoplasma (19). Com a evolução da meiose, a sensibilidade do RE à liberação de cálcio aumenta e ele se desloca para regiões corticais, acumulando-se em pequenos aglomerados por todo o citoplasma (26). Além disso, o complexo centrossomo/microtúbulos é modificado a medida que os oócitos atingem a maturação. Oócitos em crescimento apresentam longos microtúbulos, enquanto os oócitos considerados competentes contêm de 1 a 5 centros organizadores de microtúbulos (MTOC) localizados na periferia do núcleo (23, 27).

Em oócitos mamíferos, a migração de grânulos corticais é um importante passo na maturação citoplasmática, e tem sido usado como um critério na avaliação da maturação (28). Em oócitos no estágio de GV, os grânulos corticais ficam distribuídos em aglomerados por todo o citoplasma; enquanto que, no fim da maturação nuclear, os grânulos se deslocam para a porção mais próxima da membrana plasmática (28).

A maturação citoplasmática do oócito envolve o acúmulo de RNAm, proteínas, substratos e nutrientes necessários para atingir a competência para o desenvolvimento embrionário (21, 22). Durante a oogênese, os oócitos mamíferos produzem e armazenam grandes quantidades de RNAm materno que são essenciais para o desenvolvimento embrionário (20, 21, 23, 29, 30). A transcrição e armazenamento de RNAm materno ocorre durante o crescimento folicular mas cessa quando a vesícula germinativa é rompida durante a meiose (20, 21, 29, 30).

Diferentes padrões de expressão gênica podem ser observados em oócitos com variados níveis de maturação (18). O gene OCT4 (ou POU5F1) tem sido considerado um potente regulador de eventos moleculares que culminam na capacidade de desenvolvimento em oócitos de camundongos [33](31). Mostrou-se que os níveis de produtos transcritos a partir do regulador transcricional *Oct4* estão diminuídos, e suas proteínas estão ausentes em oócitos de folículos antrais e em estágio de MII (18).

Em camundongos, a síntese e acúmulo de p34, que é a subunidade catalítica central do fator promotor de maturação (MPF), em oócitos em crescimento correlaciona-se fortemente a habilidade do oócito atingir a fase de GVBD *in vivo* ou *in vitro* (23). Outra proteína, a DAZL, é essencial tanto para a maturação meiótica, como para a aquisição da capacidade de desenvolvimento embrionário (18). A diminuição da expressão dessa proteína em oócitos em estágio de GV não apenas compromete a progressão da meiose, mas também a fecundação (18).

1.1.4 Maturação Nuclear

Para que o gameta feminino se torne competente para o desenvolvimento embrionário, ele precisa passar por um processo de maturação nuclear, que envolve a progressão e a resolução da meiose (32). Antes do início da meiose, o DNA da oogônia é replicado na fase S, sendo que as duas cópias estão intimamente ligadas por complexos formados pela proteína coesina ao longo de todo o seu comprimento (32). Após a fase de replicação e o término da intérfase, os, agora, oócitos entram na fase de prófase da primeira divisão meiótica e os cromossomos passam por processos de condensação e recombinação (33). A partir de então, há a dispersão dos cromossomos e os oócitos primários permanecem circundados por uma camada de células da granulosa, sendo o conjunto denominado de folículo primordial (34). A parada em prófase I continua até a puberdade quando os oócitos podem progredir na resolução da meiose chegando até a maturação meiótica em resposta ao pico de LH liberado em cada ciclo reprodutivo (1).

Quando estacionados em prófase I, os oócitos possuem um envelope nuclear intacto, a vesícula germinativa (GV) e a dissolução deste envelope

(GVBD) é o primeiro marcador visível da retomada da meiose (33) (Figura 3). Durante a foliculogênese, a GV passa por processos de remodelamento tanto em regiões promotoras específicas como em porções extensas envolvendo grandes partes do genoma (13). Com base na organização da cromatina, os oócitos em vesícula germinativa podem ser classificados em duas classes: *surrounded nucleolus* (SN) e o *non-surrounded nucleolus* (NSN) (13, 18, 27, 35-40). No primeiro, um anel de cromatina pode ser distinguido ao redor do nucléolo, enquanto que no segundo este anel não é visualizado (18, 35-38).

Oócitos com diâmetro entre 10 e 40mm possuem uma cromatina do tipo NSN e, mais tarde, durante o recrutamento folicular, alguns oócitos adquirem organização do tipo SN (13, 39, 40). Os oócitos NSN possuem a transcrição ativa, tendo um menor potencial de desenvolvimento, observado pelo bloqueio no estágio embrionário de duas células, enquanto que os oócitos com a configuração SN têm transcrição inativa, e melhor potencial de desenvolvimento embrionário posterior (18, 35-38).

A partir da fase de GVBD, o fuso meiótico da primeira metáfase se forma e quando todos os cromossomos bivalentes se estabilizam, a anáfase ocorre (33) (Figura 3). Em oócitos de camundongos maturados *in vitro*, uma vez que os cromossomos estão alinhados na placa metafásica, o fuso da meiose I migra para o córtex e imediatamente inicia a anáfase (1). A divisão meiótica que ocorre durante a maturação oocitária é caracterizada por uma assimetria extrema no tamanho e no destino da célula-filha (1). A partir da primeira divisão meiótica, origina-se um grande oócito e um resíduo celular menor chamado de corpúsculo polar (1) (Figura 3).

Em células somáticas, durante a mitose, o posicionamento do fuso é mediado por microtúbulos astrais, tanto em divisões simétricas como assimétricas. Já o fuso meiótico, geralmente, não possui microtúbulos astrais, sendo que a actina é quem coordena o posicionamento do fuso meiótico assimétrico [1].

Após a primeira meiose, os oócitos entram diretamente na meiose II sem passar pela fase S, onde eles se mantêm estacionados na metáfase II até que a fecundação desencadeia a retomada e o final da meiose II (33) (Figura 3).

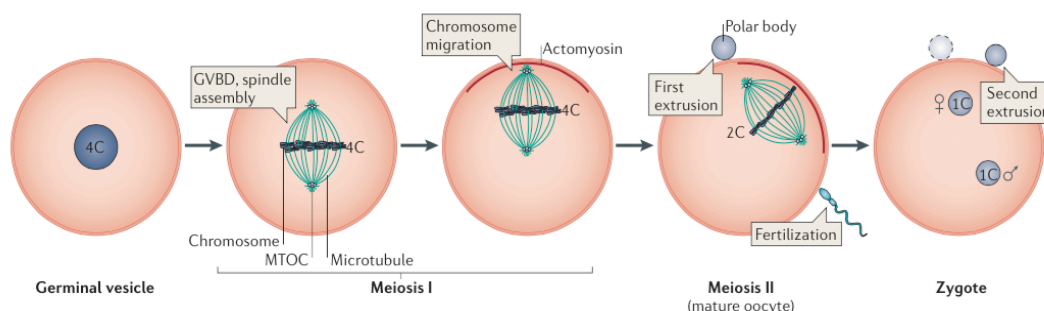


Figura 3. Maturação de um oócito mamífero. Um oócito em prófase I, com um conteúdo de DNA de 4C (correspondendo neste caso a um número cromossômico diplóide (2N), sendo cada cromossomo composto por duas cromátides), inicia o processo de maturação com a quebra da vesícula germinativa (GVBD), seguido pela formação do primeiro fuso meiótico e migração dos cromossomos. Estes eventos induzem a formação de um domínio de actomiosina cortical (em vermelho). Imediatamente após a anáfase da meiose I e extrusão do primeiro corpúsculo polar, o segundo fuso meiótico se forma subcorticalmente e induz a formação de um segundo domínio de actomiosina. Este oócito maduro com um conteúdo de DNA de 2C (correspondendo neste caso a um número cromossômico haplóide (1N), sendo cada cromossomo composto por duas cromátides) mantém-se em metáfase e possui um posicionamento assimétrico do fuso meiótico. Após a fecundação (ou ativação partenogênética), a meiose é reiniciada e resulta na separação das cromátides-irmãs e extrusão do segundo corpúsculo polar; dando origem a um pró-núcleo feminino que possui um conteúdo de DNA de 1C (correspondendo neste caso a um número cromossômico haplóide (1N), sendo cada cromossomo composto por uma cromátide), assim como no caso do pró-núcleo masculino.

Figura retirada de Li & Albertini, 2013 (2).

Devido a complexidade dos processos de diferenciação celular e suas interações, é possível questionar se disparidades observadas durante o desenvolvimento embrionário e fetal podem, de alguma forma, ter relação com estágios específicos, eventos ou processos que ocorreram durante a gametogênese e maturação. De fato, qualquer fator que interfira ou previna o crescimento e maturação normal dos gametas pode ser determinante pois o desenvolvimento embrionário nada mais é do que uma continuidade dos processos de crescimento e maturação dos gametas (41).

A progressão adequada da meiose e a maturação nuclear completa dependem de muitos fatores, dentre os quais, sinais regulatórios que muitas vezes são transmitidos através de comunicações existentes entre oócitos e células somáticas (1). Esses sinais regulatórios controlam o metabolismo oocitário, o remodelamento do citoesqueleto, a progressão do ciclo celular e a fecundação, os quais são eventos chaves para a embriogênese inicial (1).

Alterações hormonais em períodos cruciais de estimulação pré-ovulatória já foram correlacionados com a produção de gametas e embriões com anormalidades cromossômicas (41). O uso isolado de esteróides como

progesterona e estradiol em meios de maturação de oócitos de suínos foi associado com aumento de anormalidades cromossômicas, enquanto que o uso concomitante de ambos os esteróides não ocasionou tal aumento, indicando que esses componentes exercem uma função protetora quando em conjunto (42). Além disso, em ovinos, altas taxas de desenvolvimento embrionário normal foram observadas quando CCOs foram maturados em meios contendo FSH, LH e estradiol (43).

Ainda, a comunicação eficiente das células do cumulus adjacentes com o oócito é crucial para a manutenção do metabolismo oocitário, bem como a progressão adequada da meiose (44). Essas células se comunicam com o oócito através de junções do tipo *gap* compostas por proteínas pertencentes a família de conexinas. Caso haja deficiência dessas moléculas de conexina, a progressão da meiose é prejudicada, impedindo a maturação nuclear e, conseqüentemente, a ovulação. Dessa forma, as células do cumulus potencializam a capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário através da síntese e secreção de proteínas necessárias para a maturação citoplasmática dos oócitos (44). À medida que a meiose progride, a comunicação entre células do cumulus e oócito diminui devido à mucificação e expansão dessas células, sendo que essa dispersão é um dos fatores determinantes para a maturação nuclear (44).

Além da influência de fatores externos, fatores intrínsecos do metabolismo oocitário podem determinar as condições adequadas para progressão da meiose e o desenvolvimento embrionário subsequente. Em camundongos, já foi demonstrado que canais iônicos, como de Na^+/H^+ e HCO^-/Cl^- , se encontram ativos durante as fases finais do crescimento oocitário dentro do folículo, sendo inativados novamente durante a maturação meiótica e reaparecendo somente horas após a fecundação (45). É provável que a diminuição da atividade dos canais de Na^+/H^+ e HCO^-/Cl^- durante a maturação esteja relacionada, principalmente, com a manutenção do volume citoplasmático durante o período de extrusão do primeiro corpúsculo polar (45). Dessa forma, a regulação da atividade desses canais é crucial para a manutenção de um volume citoplasmático adequado para a maturação do oócito, permitindo o desenvolvimento embrionário subsequente (45).

Levando em consideração que fatores intrínsecos e extrínsecos inerentes aos processos de crescimento e maturação dos CCOs influenciam no desenvolvimento embrionário, é natural que se questione qual a proporção de oócitos maturados *in vitro* que adquirem, de fato, a capacidade de desenvolver-se até estágios posteriores. Em ratos, Daniel et al. (1989) (46) avaliaram sistemas de cultivo *in vitro* que permitissem o crescimento e maturação de oócitos, bem como, seu desenvolvimento embrionário após fecundação *in vitro*. Os autores constataram que cerca de 60-70% dos oócitos cultivados *in vitro* apresentaram quebra de vesícula germinativa (46). Após a fecundação, a porcentagem de clivagem foi de 62,5% (8/13) quando os CCOs foram provenientes de folículos cultivados *in vitro*; e de 64,3% (56/87) quando os CCOs foram coletados após crescimento folicular *in vivo* e maturados *in vitro* (64,3%) (46). Entretanto, esses valores foram calculados a partir da quantidade de CCOs que apresentaram penetração de espermatozoides; portanto, se fossem considerados os CCOs que obtiveram maturação, as porcentagens seriam menores.

1.2 Métodos de Criopreservação

Os avanços tecnológicos provenientes do progressivo aumento do conhecimento e das demandas tanto na área da saúde, quanto na atividade pecuária, tem permitido um maior controle e consequente manipulação sobre todo o processo de concepção (47). Através da otimização das condições de cultivo de embriões, maturação de gametas femininos e do avanço das técnicas de fecundação *in vitro*, é possível controlar o ambiente a que essas células estão expostas, bem como, selecionar embriões e gametas, potencialmente, mais saudáveis para o desenvolvimento embrionário posterior (47).

Entretanto, a manutenção de gametas e embriões *in vitro* não é simples, visto que para a sua sobrevivência é necessário mimetizar os eventos que ocorrem *in vivo* em um ambiente externo ao organismo. Especificamente em gametas femininos - que são mais escassos quando comparado a quantidade de gametas masculinos - é importante desenvolver

sistemas de cultivo que forneçam um ambiente adequado para que o oócito sobreviva (48).

Com o objetivo de alcançar o máximo de crescimento e desenvolvimento dos gametas femininos *in vitro*, os sistemas de cultivo devem permitir que os oócitos permaneçam viáveis e que os mecanismos intrínsecos de sinalização que direcionam o crescimento e desenvolvimento funcionem de maneira adequada (48). Além disso, é necessário que as células do cumulus ao redor do oócito consigam proliferar adequadamente e que elas consigam manter as funções necessárias para guiar o crescimento oocitário durante o período de crescimento (48).

Para isso, meios de cultivo são utilizados visando a manutenção de gametas e embriões fora do organismo; porém, cada espécie animal possui especificidades que devem ser levadas em consideração para a formulação desses meios (48). Além disso, fatores como a temperatura de incubação, o fornecimento de oxigênio e gás carbônico em concentrações adequadas e a adição de hormônios e fatores de crescimento ao meio de cultivo tem um impacto significativo no desenvolvimento destas células (48).

Por outro lado, para manter a viabilidade de gametas e embriões fora do organismo por períodos descontínuos e prolongados é necessário recorrer a criopreservação. A criopreservação tem sido bem sucedida na pesquisa básica e na prática clínica, no armazenamento prolongado de alíquotas de sêmen e até mesmo de oócitos e embriões supranumerários, para uso em ciclos posteriores (49). Além disso, não apenas na prática clínica, mas também com vistas ao armazenamento de gametas e embriões provenientes de espécies de laboratório e animais transgênicos, a criopreservação serve como uma técnica eficiente para redução de custos e de espaço necessário para o manutenção destas espécies (49).

Duas principais técnicas são utilizadas para a criopreservação de oócitos e embriões: o congelamento e a vitrificação (50). Ambas levam em consideração que quando uma solução aquosa é resfriada a temperaturas muito baixas, ocorre um aumento na concentração dos solutos dissolvidos devido a formação de cristais de gelo provenientes da água congelada (50). Entretanto, o congelamento exige uma diminuição gradual e controlada da temperatura em diversas etapas [50]. Para a realização desta técnica, os

gametas ou embriões devem ser expostos a concentrações relativamente baixas de crioprotetores para que haja um equilíbrio térmico e osmótico e para que, progressivamente, ocorra uma desidratação, encolhimento da célula e aumento da concentração intracelular de solutos durante o resfriamento que ocorre na velocidade de 0,3-2°C/min [50].

Já a vitrificação visa eliminar a formação de cristais intra e extracelulares de gelo e o choque osmótico através de um resfriamento ultrarrápido [59]. Através dessa técnica, o risco de dano às estruturas celulares é reduzido visto que a célula é vitrificada em um estado sólido, amorfo e semelhante ao vidro, livre de estruturas cristalizadas [59]. Entretanto, o sucesso das técnicas de criopreservação depende da exposição dos oócitos ou embriões a agentes crioprotetores que permitam a perda de água intracelular para que o equilíbrio osmótico se mantenha e para que cristais de gelo intracelulares não sejam formados com o congelamento da água (50).

Desta forma, uma das principais variáveis da criopreservação é o uso de compostos que agem protegendo os oócitos e embriões contra os danos causados pelo congelamento (50). Embora alguns mecanismos moleculares ainda não sejam totalmente compreendidos, os fenômenos que ocorrem quando as células são expostas a estas soluções tem sido bastante estudados (50). Os agentes crioprotetores mais comuns usados para criopreservar oócitos e embriões são o glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol e o DMSO; porém, ao longo dos anos, compostos impermeáveis como a sacarose e a trealose tem sido associados com efeitos crioprotetores (50).

1.2.1 Congelamento

Em 1972, Whittingham et al. (51) e Wilmut (52) foram os primeiros grupos que obtiveram resultados bem sucedidos de criopreservação de embriões mamíferos. Nestes experimentos, os autores conseguiram criopreservar embriões murinos, aplicando conhecimentos de criobiologia básica anteriormente formulados por Mazur (1963) (53). A metodologia empregada consistiu em suspender os embriões em agentes crioprotetores (DMSO ou glicerol) e congelá-los através do resfriamento gradual em taxas de resfriamento de 0,5 a 1,5°C/min até a temperatura de -80°C antes de

armazená-los em nitrogênio líquido (-196°C) (51). Dos embriões criopreservados, cerca de 75% sobreviveram e formaram blastocistos quando cultivados *in vitro* e desses, mais de 1000 foram transferidos para fêmeas receptoras. Das fêmeas que obtiveram gestações, 40% geraram animais a termo (51).

Para que a técnica utilizada por Whittingham et al. obtivesse bons resultados, os autores se basearam em conceitos relacionados ao comportamento dos oócitos e embriões frente a situações de resfriamento. Quando uma solução aquosa contendo agentes crioprotetores é congelada lentamente, a água gradualmente forma cristais de gelo causando um aumento da concentração dos solutos dissolvidos e esse aumento da concentração ocorre concomitantemente a diminuição da temperatura (50). Conseqüentemente, embriões e oócitos suspensos em soluções parcialmente congeladas respondem osmoticamente através da perda de água para permanecer em equilíbrio osmótico com a solução (50). Durante o congelamento a temperaturas abaixo de 0°C , os embriões e oócitos possuem tempo suficiente para se desidratar, enquanto, os crioprotetores dentro da célula vão se tornando cada vez mais concentrados (50). Esse aumento da concentração dos agentes crioprotetores faz com que o meio intracelular permaneça fluido a temperaturas abaixo de 0°C até -30°C ou até -40°C (50).

Diversos aspectos afetam a qualidade do processo de congelamento, sendo que um deles é a concentração utilizada de crioprotetor (54). A concentração necessária para atingir o congelamento adequado, geralmente fica entre 1,0 e 1,5 M quando são utilizados o DMSO ou o glicerol. Entretanto, existem interferentes como as propriedades do soluto, as taxas de resfriamento e de reaquecimento quando os oócitos ou embriões são mergulhados em nitrogênio líquido (54, 55). Estas últimas dependem de características dos recipientes utilizados para armazenar as células, como dimensões e material, e dos métodos aplicados para resfriamento e reaquecimento (54).

Ao longo dos anos, diversas modificações foram feitas para melhorar os procedimentos de congelamento de oócitos e embriões, principalmente em animais domésticos (50). Uma dessas mudanças foi a realização de um "congelamento interrompido", em que os gametas ou embriões são

congelados lentamente até -35°C e então mergulhados em nitrogênio líquido, com o objetivo de diminuir o tempo necessário para o processo (56). Outras mudanças foram o uso de palhetas plásticas para o congelamento, a adição de solutos impermeáveis, como sacarose no meio de congelamento e o uso de outros crioprotetores permeáveis como EG e PROH (57). Além disso, nos protocolos atuais de congelamento, é comum se realizar uma etapa de indução da formação de cristais de gelo extracelulares (do inglês, *seeding*) após o período de equilíbrio a temperaturas de -5°C a -8°C para que em seguida seja iniciado o congelamento gradual até temperaturas mais baixas (55). Em geral, o tempo médio para finalizar o processo de congelamento é de 90 minutos, sendo que o momento mais crítico, tanto no processo de resfriamento como no de aquecimento, são as zonas de temperaturas intermediárias (-15°C a -60°C).

Por muitos anos, o congelamento foi a metodologia padrão de criopreservação de embriões e oócitos. Entretanto, apesar de muitos autores terem reportado resultados bem sucedidos com o congelamento (58), a formação de cristais de gelo, frequentemente, ainda torna esta técnica menos consistente em seus resultados (58). Além disso, o tempo gasto para realizar todo o processo de congelamento, que varia de 1,5 a 5 horas dependendo do protocolo, estimula a busca por novas técnicas que facilitem e agilizem o processo (58).

Alguns autores têm obtido baixas taxas de sobrevivência e desenvolvimento embrionário *in vitro* após o congelamento de oócitos e embriões de diferentes espécies (59-61). Tais resultados têm sido atribuídos a possíveis danos causados pela formação de cristais de gelo, choque osmótico e efeitos da concentração da solução, bem como a ocorrência de alterações ultraestruturais nos oócitos que podem estar relacionadas a diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário posterior (59, 61). Além disso, danos como endurecimento da zona pelúcida, excitose prematura de grânulos corticais, alterações nos microtúbulos e na formação de pró-núcleos já foram descritos após o congelamento de oócitos (62)

Por outro lado, as limitações do método de congelamento têm sido contornadas, principalmente com o emprego de uma outra metodologia, denominada vitrificação, que já foi associada com altas taxas de

desenvolvimento embrionário e gestações, além de ser uma técnica mais rápida, prática e barata (63). Por esses motivos, a vitrificação tem sido mais promissora na tentativa de obter os resultados esperados após a criopreservação de gametas femininos (59).

1.2.2 Vitrificação

O interesse em aplicar as técnicas de vitrificação na área das biotécnicas de reprodução está relacionado a necessidade de evitar a formação de cristais de gelo durante o resfriamento a temperaturas muito baixas (64). Esta técnica é adequada para este propósito visto que o princípio da vitrificação é evitar a formação de cristais de gelo e a ocorrência de choque osmótico através de um resfriamento extremamente rápido (59).

O procedimento para vitrificação tanto de oócitos como de embriões consiste, inicialmente, em uma fase de equilíbrio com uma solução contendo concentrações menores dos agentes crioprotetores (50). Em seguida, a amostra é exposta, brevemente, a uma solução com as concentrações finais dos agentes crioprotetores e a alta pressão osmótica exercida por esses agentes faz com que ocorra uma desidratação do citoplasma (50). Após a contração do oócito ou embrião, a amostra deve ser colocada em um recipiente adequado para vitrificação e mergulhado em nitrogênio líquido (50). Para o reaquecimento, o recipiente é aquecido e a solução crioprotetora se liquefaz, sendo que esta fase é a mais crítica para a sobrevivência do oócito ou embrião vitrificado (50).

A vitrificação envolve a transição da fase aquosa para uma fase vítrea - ou semelhante ao vidro - através de taxas de resfriamento extremamente rápidas, evitando que o oócito ou embrião passe por uma fase cristalina, onde ocorre a formação de cristais de gelo (65, 66). Esta estrutura sólida mantém a distribuição molecular e iônica normal do estado líquido e, portanto pode ser considerada um líquido extremamente viscoso super-resfriado (67). Três fatores principais afetam a probabilidade de vitrificação: a viscosidade do meio, as taxas de resfriamento e o volume da amostra (68).

A viscosidade do meio é determinada pela concentração e propriedades dos agentes crioprotetores e outros suplementos utilizados na

vitrificação (55). O aumento da concentração do agente crioprotetor faz com que a temperatura de formação do estado vítreo não precise ser tão baixa, diminuindo a probabilidade de formação de cristais de gelo nucleares (55). As taxas de resfriamento adequadas são atingidas com a introdução da amostra em nitrogênio líquido ou nitrogênio super-resfriado (efeito produzido pela realização de vácuo em um recipiente que contém nitrogênio líquido; do inglês, *slush*) (55). Ao utilizar esses procedimentos, as taxas de resfriamento podem atingir velocidades de cerca de centenas de milhares de graus Celsius por minuto, dependendo do recipiente, volume da amostra, condutividade térmica e composição da solução (68). Por fim, o volume da amostra também é um determinante da probabilidade de vitrificação, sendo que quanto menor o volume, maior a probabilidade de vitrificação adequada, pois, quanto menor o volume melhor transferência de calor (68).

Com o objetivo de obter volumes menores para vitrificação, diversos dispositivos foram desenvolvidos (64). Esses dispositivos podem ser divididos em duas categorias principais: dispositivos de superfície e em tubos (55). Os dispositivos de superfície incluem as grades de microscopia eletrônica (do inglês, *electron microscopy grids - EMG*), *minimum drop size* (MDS), *Cryotop*, hemi-palhetas (*hemi-straw*), *Cryoloop*, *Cryoleaf*, entre outros (69, 70). Quanto aos dispositivos em tubos podem ser citadas as palhetas plásticas, palhetas afinadas abertas (*open pulled straw*), palhetas afinadas fechadas (*closed pulled straw*), *CryoTip*, *Cryopette*, entre outros (66, 71).

Tanto os dispositivos de superfície como os de tubo possuem vantagens. Nos métodos de superfície, por exemplo, o tamanho da gota pode ser melhor controlado e altas taxas de resfriamento e aquecimento podem ser atingidas já que são sistemas abertos, havendo uma exposição direta ao nitrogênio líquido ou a solução de aquecimento (55). Em compensação, os dispositivos em tubo têm a vantagem de serem fechados, sendo mais seguros e fáceis de manipular (55). Independente do tipo de recipiente utilizado, a diminuição do volume durante a vitrificação aumenta as taxas de resfriamento, permitindo uma diminuição moderada da concentração necessária de agentes crioprotetores, minimizando os efeitos tóxicos e osmóticos da exposição aos crioprotetores (72).

Outra abordagem para contornar os efeitos deletérios da vitrificação é a modificação dos períodos de exposição aos agentes crioprotetores (73). Geralmente, a desidratação do oócito ou embrião é atingida através da exposição a altas concentrações de crioprotetores permeáveis, juntamente com um agente impermeável como a sacarose, podendo ser feita em uma ou múltiplas etapas (73). Atualmente, os protocolos de vitrificação, na sua maior parte, consistem de duas fases: uma fase de exposição a concentrações mais baixas de crioprotetores, por um período maior e uma segunda fase de exposição curta a altas concentrações (74). Na primeira etapa, geralmente os oócitos ou embriões são expostos a concentrações relativamente baixas dos crioprotetores - cerca de 7,5% de DMSO e 7,5% de EG - por períodos de 2 a 5 minutos (73). Em seguida, há uma exposição curta de cerca de 30 a 90 segundos a um segundo meio contendo as concentrações finais dos crioprotetores, geralmente, o dobro das concentrações iniciais, juntamente com um agente impermeável (71, 75). Modificações nos períodos de exposição já foram testadas em diversas espécies com o objetivo de atingir um balanço entre altos níveis de desidratação, evitando a toxicidade (73). Fujiwara et al. (2010) (76) demonstraram que quando oócitos de rato foram expostos a soluções crioprotetoras contendo 7,5% de EG + 7,5% de DMSO + 20% de SFB em PB1 por 4 minutos, as taxas de sobrevivência ($97,8\% \pm 2,2\%$) e clivagem ($74,4\% \pm 12,4\%$) foram estatisticamente superiores em relação aos oócitos expostos por 1, 7 ou 10 minutos a esta mesma solução. Portanto, a adequação dos períodos de exposição tanto da etapa de equilíbrio quanto da segunda etapa da vitrificação pode ser uma alternativa para driblar os efeitos adversos causados aos oócitos e embriões (73).

Diversos efeitos adversos decorrentes da vitrificação podem ser observados em oócitos de diferentes espécies, principalmente porque as células germinativas são extremamente sensíveis a criopreservação (76). Características reconhecidamente relacionadas aos danos causados pela vitrificação são a formação de cristais de gelo intracelulares, lise celular, estresse osmótico, rompimento do citoesqueleto e microtúbulos do fuso meiótico, ativação partenogénica e poliploidia (77). Além disso, como resultado da vitrificação, pode ocorrer a exocitose prematura de grânulos corticais fazendo com que a penetração dos espermatozoides seja dificultada

na etapa de fecundação (62, 78).

Durante a vitrificação, os oócitos sofrem danos morfológicos e funcionais que são dependentes da espécie, estágio de desenvolvimento e da habilidade do oócito em reparar os danos (64, 79). Diferenças relacionadas ao volume, permeabilidade da membrana plasmática e conteúdo lipídico do oócito fazem com que os protocolos de vitrificação devam ser adaptados para cada espécie (79). Além disso, sabe-se que a membrana plasmática dos oócitos em meiose II (MII) tem baixo coeficiente de permeabilidade, fazendo com o que o movimento dos agentes crioprotetores e da água diminua (80). Por esse motivo, a vitrificação de oócitos em fases iniciais da meiose (oócitos imaturos), como vesícula germinativa, tem ganhado destaque nas pesquisas (79).

Dependendo do estágio de maturação, os oócitos possuem diferentes propriedades fisiológicas e biofísicas que fazem com que eles sejam mais ou menos sensíveis à metodologia de criopreservação e à toxicidade dos crioprotetores (65). Em oócitos maduros, os danos mais característicos são o rompimento de redes de filamentos de actina, despolimerização e formação anormal dos microtúbulos e dispersão irregular dos cromossomos (65). Em teoria, pelo fato dos microtúbulos dos oócitos imaturos não estarem organizados no fuso meiótico, a criopreservação neste estágio evitaria o risco de aberrações cromossômicas visto que a cromatina está protegida pelo envelope nuclear (65).

Alguns trabalhos compararam a eficácia dos métodos de congelamento e vitrificação para a criopreservação de oócitos. Na maioria destes experimentos foi observado que a vitrificação foi mais eficiente e confiável do que qualquer versão dos métodos de congelamento (60, 61, 81). Zhang et al. (2011) (81) criopreservaram oócitos humanos pelos métodos de vitrificação e congelamento e mostraram que a taxa de maturação dos oócitos em fase de GV criopreservados por congelamento foi estatisticamente inferior (16,6%) em comparação com os oócitos criopreservados por vitrificação (24,4%). Além disso, apenas os oócitos vitrificados obtiveram desenvolvimento embrionário até blastocisto (5 blastocistos), enquanto no congelamento não houve formação de blastocistos (81).

De forma similar, Cao et al. (2009) (61) obtiveram taxas de clivagem superiores (78,0%) em oócitos humanos vitrificados, em relação os oócitos congelados (54,4%). Além disso, a porcentagem de desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi de 12% no grupo de oócitos congelados e 33,1% no grupo de oócitos vitrificados, sendo também estatisticamente significativa (61). Com esses resultados, os autores mostraram que a vitrificação foi superior ao congelamento para a criopreservação de oócitos humanos, levando ao aumento da sobrevivência oocitária e taxa de fecundação, bem como, do desenvolvimento embrionário *in vitro* (61, 81).

Em camundongos, também já foi mostrado que a vitrificação de oócitos proporciona resultados de sobrevivência e desenvolvimento posterior superiores aos atingidos pelos oócitos congelados (82). Valojerdi & Salehnia (2005) (82) obtiveram taxas de fecundação similares entre oócitos vitrificados ou congelados, entretanto, após 24h de inseminação 85% dos oócitos vitrificados se desenvolveram até o estágio de duas células, enquanto apenas 1,2% dos oócitos congelados chegaram ao mesmo estágio. Além disso, nenhum dos oócitos congelados alcançou os estágios subsequentes de desenvolvimento embrionário, enquanto 46% dos oócitos vitrificados alcançaram o estágio de mórula, 32% o estágio de blastocisto expandido e 27% eclodiram. De forma semelhante, Huang et al. (2007) (83) obtiveram taxas de clivagem (63,9%) e formação de blastocisto (30,5%) superiores em oócitos de camundongo vitrificados em comparação com oócitos congelados (39,9% de embriões clivados; 20,2% de blastocistos). Além disso, uma maior proporção de oócitos vitrificados conseguiram manter o fuso meiótico e o alinhamento dos cromossomos normais (86,9%) em comparação com os oócitos congelados (70,1%). Apesar da incidência de aneuploidias ter sido similar em oócitos vitrificados versus congelados (9,3% vs 8,7%, respectivamente) (83).

Os relatos sobre vitrificação de CCOs de ratos são muito escassos na literatura, prevalecendo os artigos que utilizam outros modelos animais ou então que utilizam embriões como amostra para criopreservação. Entretanto, recentemente um grupo de pesquisa importante dos Estados Unidos publicou um artigo que aborda os efeitos da vitrificação sobre o ciclo celular e o citoesqueleto de oócitos imaturos utilizando como modelo o rato (84). Neste

artigo, os autores testaram condições para vitrificação utilizando duas ou quatro etapas de equilíbrio e soluções de equilíbrio e crioprotetoras compostas por etilenoglicol, DMSO e albumina sérica humana (ASH) com concentrações variadas (84).

Diversas avaliações foram feitas, dentre elas, a integridade das células do cumulus. Os resultados mostraram que a integridade das células do cumulus teve diminuições entre 23% e 32% dependendo da metodologia utilizada, indicando que qualquer um dos tratamentos influenciou negativamente a integridade das células do cumulus (84). Também foram feitas avaliações de integridade da cromatina e os autores constataram que a maioria dos oócitos vitrificados mostrou uma tendência a apresentar condensação anormal da cromatina, indicando que as condições de vitrificação prejudicaram a progressão da maturação nuclear (84).

Além disso, os autores avaliaram os níveis de fosforilação, como um indicativo de transição da fase G2 para M do ciclo celular e mostraram que os oócitos imaturos vitrificados, de maneira geral, apresentaram altos níveis de fosforilação citoplasmática, indicando que o ciclo celular foi ativado precocemente (84). Ainda, o impacto da vitrificação sobre a conformação dos filamentos de actina do citoesqueleto dos oócitos imaturos foi avaliada através de microscopia confocal e os autores observaram alterações nos padrões de filamentos de actina perinuclear, bem como um aumento de sua localização citoplasmática e diminuição da sua quantidade nas células do cumulus (84). Com esses resultados, os autores apontam os efeitos indesejáveis da vitrificação que comprometem o ciclo celular, as interações com as células somáticas e a integridade dos filamentos de actina de oócitos imaturos, os quais podem não estar evidentes até etapas subsequentes à fecundação (84). Por isso, estudos que verifiquem a progressão da maturação nuclear, bem como o desenvolvimento embrionário de oócitos imaturos submetidos a vitrificação são importantes para avaliar melhores condições de criopreservação.

1.3 Agentes Crioprotetores

1.3.1 Classificação e Mecanismos de Ação

Há mais de um século já se tem determinado que alguns solutos, como açúcares, tem um efeito protetor contra os danos causados pela criopreservação e, a partir deste conceito, Lovelock (85) estabeleceu a teoria de ação coligativa. Nesta teoria, foi proposto que por causa da diminuição da molaridade causada pela mistura de solutos durante a criopreservação, as células sofreriam menor estresse induzido por sais do que se fossem expostas às mesmas condições, porém sem o agente crioprotetor (85). Essa ação de tamponamento preveniria o estabelecimento de concentrações altas de soluto na fração congelada até que o sistema fosse resfriado a temperaturas tão baixas que qualquer atividade molecular fosse inibida (85).

As classificações dos agentes crioprotetores estão relacionadas a sua capacidade de atravessar ou não a membrana plasmática das células (86). Os agentes crioprotetores podem ser classificados em penetrantes, ou seja, aqueles capazes de atravessar a membrana, entrando em contato com o citoplasma; ou não penetrantes, ou seja, não atravessam a membrana (87).

Os agentes penetrantes protegem as células contra os danos causados pela criopreservação reduzindo a quantidade de cristais de gelo formados dentro das células, através da diminuição do ponto de solidificação da solução crioprotetora (87). Para isso, os agentes penetrantes devem entrar na célula para que haja uma desidratação e, ao mesmo tempo, não devem ser tóxicos em altas concentrações (87). Exemplos destes agentes são: glicerol, 1-2-propanodiol (PROH), dimetil sulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), etanol, metanol, acetato de amônia e acetato de trimetilamina (88).

Já os agentes não penetrantes tem como mecanismo de ação a estabilização da membrana plasmática e a remoção da água intracelular através do aumento da concentração de soluto extracelular, sendo que estes agentes devem ser utilizados em baixas concentrações necessitando de taxas de resfriamento e aquecimento mais rápidas (89). Exemplos de agentes não penetrantes são: hidroximetil de amido (HES), polivinilpirrolidona

(PVP), alguns polióis como o manitol e sorbitol e alguns açúcares como a sacarose, lactose, rafinose e glicose (88).

Os agentes crioprotetores mais comumente utilizados para criopreservar oócitos e embriões são o EG, o PG e o DMSO (50). Esses compostos possuem diversos aspectos que contribuem para a sua eficiência como crioprotetores (50). Eles possuem baixo peso molecular, são miscíveis em água, diminuem o ponto de congelamento da água a temperaturas abaixo de zero e são permeáveis nas membranas de oócitos e embriões (50). O glicerol também é amplamente utilizado como agente crioprotetor e pode ser caracterizado como um soluto pequeno e neutro, geralmente poli-hidroxilado, capaz de realizar ligações de hidrogênio na água e capaz de atravessar a membrana celular em baixas taxas e em temperaturas específicas (64).

A determinação da permeabilidade dos oócitos e embriões aos vários agentes crioprotetores tem sido amplamente estudada (50). Em camundongos, se sabe que o oócito não fecundado é muito menos permeável aos agentes crioprotetores do que o zigoto (50). Isso ocorre porque a energia de ativação necessária para que o agente crioprotetor atravesse a membrana plasmática do oócito é significativamente maior do que no zigoto (50). Isso significa que com a diminuição da temperatura, a permeação do agente crioprotetor para dentro do oócito vai ser menor do que no zigoto (50).

Agentes impermeáveis como os açúcares, trealose e sacarose, também são utilizados na criopreservação por causarem menor toxicidade à célula criopreservada (64). Apesar dos efeitos benéficos da associação de açúcares e crioprotetores penetrantes durante a criopreservação não estarem totalmente elucidados, acredita-se que a associação destas substâncias auxilia nos processos de desidratação, através da estabilização da membrana plasmática (90). Além disso, com a adição de açúcares as soluções crioprotetoras, a formação de cristais de gelo diminui durante os processos de resfriamento e aquecimento diminuindo, portanto, os possíveis danos celulares causados pelo choque osmótico e térmico (67, 70).

Em diversos protocolos de criopreservação - principalmente, na vitrificação que exige altas concentrações de crioprotetores - componentes como a albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB) são

adicionados em altas concentrações as soluções crioprotetoras, como uma fonte de proteínas para estabilizar a membrana plasmática e reduzir a quantidade de cristais de gelo na solução crioprotetora (67, 91). Além disso, polímeros de alto peso molecular também podem ser usados como agentes crioprotetores extracelulares, por alterarem a temperatura em que a solução é vitrificada (92). Essas macromoléculas não penetram na membrana celular, porém elas podem reduzir a quantidade de crioprotetores intracelulares necessários através da redução da toxicidade da solução (93).

Em camundongos, foi demonstrado que a presença de SFB no meio para criopreservação de oócitos não previne a liberação prematura de grânulos corticais, mas exerce um efeito protetor contra o endurecimento da zona pelúcida e bloqueia a polispermia (78). Porém, apesar de o SFB ser amplamente utilizado em soluções crioprotetoras, ele possui o potencial de transmitir agentes infecciosos, já que é um componente de origem biológica, e está sujeito a grandes variações de um lote para o outro, já que sua composição não é definida (92, 94, 95).

Além do SFB, o BSA também pode ser utilizado em soluções crioprotetoras tanto em oócitos como em embriões de diferentes espécies (96). Diferentes concentrações deste componente já foram testadas, desde 0,4% até 6%. Entretanto, resultados discrepantes foram obtidos entre diferentes autores (97-99). Checure et al., 2007 (96) utilizaram BSA livre de ácidos graxos (FAF-BSA) em intervalos de concentração de 0,3% à 3% para vitrificação de oócitos bovinos e não obtiveram taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* satisfatórias, principalmente, com as concentrações mais altas. Os autores atribuíram esses resultados ao tipo de BSA utilizado, já que outros autores obtiveram resultados satisfatórios quando utilizaram BSA fração V ou BSA cristalino (97-99). Entretanto, o uso do BSA em soluções crioprotetoras apresenta problemas semelhantes àqueles do SFB: potencial transmissão de doenças, por ser de origem biológica, e variação de composição de um lote para outro (94, 96).

Com o objetivo de evitar a transmissão de microorganismos e utilizar meios mais definidos para a criopreservação, polímeros sintéticos como a polivinilpirrolidona (PVP) (92, 93, 100), polivinilálcool (PVA) (91, 94, 95, 101), dextran (92, 93, 101) e Ficoll (92, 93) tem sido testados por diversos autores

na criopreservação de oócitos e embriões. Em oócitos bovinos, foi reportado que a adição de 0,1% de PVA às soluções de vitrificação proporcionou taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes aos das soluções suplementadas com SFB (95). Resultados semelhantes também foram obtidos com embriões em estágio de blastocisto de outras espécies domésticas (66, 91). Além disso, Wang et al., 2013 (100) mostraram que a adição de 2% de PVP à solução de vitrificação é benéfica para o alinhamento do fuso meiótico e dos cromossomos de oócitos bovinos, resultando em maiores taxas de desenvolvimento embrionário.

Uma substância potencialmente adequada para o uso como suplemento em soluções crioprotetoras é o ácido hialurônico (102). O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de alto peso molecular (10^5 a 10^7 Da), não ramificado, composto por dissacarídeos em repetição (b1-3-D-N-acetilglicosamina, b1-4-D-ácido glicurônico) (103). Este composto é amplamente distribuído na matriz extracelular de animais vertebrados e age como uma base para a ligação de outras moléculas (104). A sua síntese é realizada através da adição de monossacarídeos na porção reducional da cadeia e por ação enzimática de uma glicosiltransferase com duas atividades catalíticas: uma para a transferência de ácido glicurônico e outra para a transferência de N-acetilglicosamina (103). Este composto pode ser obtido de diversas fontes, tanto de origem animal como de microorganismos (105). Os tecidos animais - crista de galo, pele de tubarão, globo ocular de bovinos - tem sido bastante usados como uma fonte de isolamento e produção de ácido hialurônico de alto peso molecular. Além desses, microorganismos que secretam o ácido hialurônico, como *Streptococcus zooepidemicus* e *S. equi* também são amplamente usados (106). Em materiais biológicos, o ácido hialurônico, geralmente, se apresenta como complexos ligados a outros biopolímeros; por isso, vários procedimentos de separação precisam ser aplicados para obter o composto puro, como digestão por proteases, precipitação iônica, ultrafiltração ou liofilização (105).

O ácido hialurônico possui propriedades viscoelásticas pronunciadas que dependem das estruturas primárias e do comprimento da cadeia molecular, bem como da sua conformação e concentração (103). Devido a essas propriedades, o ácido hialurônico tem sido muito utilizado em diversas

áreas da medicina como na oftalmologia, cirurgia ortopédica e reumatológica, otorrinolaringologia, dermatologia, cirurgia plástica e farmacologia (105).

Nas pesquisas relacionadas a biotécnicas de reprodução, o ácido hialurônico já foi usado como suplemento em meios de maturação de oócitos e cultivo embrionário, proporcionando resultados variados (107, 108). Marei et al., (2012) (107) mostraram que apesar de a adição de ácido hialurônico ao meio de maturação oocitária não ter afetado a maturação nuclear, a inibição da síntese desta substância nos oócitos diminuiu as taxas de maturação e o desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos, indicando que o ácido hialurônico é necessário para a maturação nuclear oocitária. Já Opiela et al. (2012) (108) observaram que a suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos com ácido hialurônico e FAF-BSA aumentaram as taxas de maturação, comparado com a suplementação com albumina sérica. Segundo os autores, os resultados sugerem que o ácido hialurônico influencia a suplementação de nutrientes de modo que a maturação meiótica seja acelerada (108).

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, foram adicionados diferentes suplementos (20% de SFB; 0,4% de BSA; 0,4% de PVA; ou 1% de ácido hialurônico) a uma solução crioprotetora utilizada para vitrificação de oócitos de rato, e as taxas de retomada de meiose e maturação nuclear foram avaliadas após o reaquecimento (102). Neste experimento, foi possível observar que os oócitos vitrificados com a solução crioprotetora contendo 1% de ácido hialurônico obtiveram taxas de retomada de meiose e maturação nuclear estatisticamente superiores em relação aos outros grupos vitrificados, indicando que o ácido hialurônico apresenta efeitos vantajosos durante a vitrificação de oócitos de rato (102).

1.3.2 Toxicidade dos Agentes Crioprotetores

O uso de agentes crioprotetores para a criopreservação de gametas e embriões sem dúvida é essencial, entretanto, seus efeitos adversos também são facilmente reconhecíveis devido a sua facilidade em permear os espaços intracelulares e afetar as condições osmóticas da célula, principalmente, se as condições de exposição não são ideais (64, 109). A toxicidade dos crioprotetores pode ser tanto osmótica, em que alterações drásticas das

concentrações de água intracelular alteram o funcionamento da célula, quanto química, em que o próprio crioprotetor causa danos a estruturas essenciais da célula (64).

A toxicidade osmótica ocorre quando as células permeadas por altas concentrações de agentes crioprotetores sofrem um dano osmótico reverso, ou choque osmótico, quando retornam à condições isotônicas após o reaquecimento (64). Além disso, existem indícios de que alguns agentes crioprotetores possuem propriedades químicas que causem toxicidade às células, modificando o meio intracelular através de ligações a moléculas essenciais e alterações estruturais (64).

Já foi sugerido que agentes como o DMSO podem se ligar a cadeias de proteínas ou aumentar a formação de pontes dissulfeto (109). Outros crioprotetores podem ter um efeitos que resultem na desorganização e formação de protusões da membrana plasmática; por exemplo, a exposição de oócitos de camundongo ao butanodiol foi associado com a ocorrência de protusões da membrana (64). Em outro experimento, os pesquisadores determinaram que agentes crioprotetores podem ter efeitos diretos sobre o citoesqueleto oocitário, principalmente sobre os microtúbulos e os microfilamentos, causando a desmontagem destes filamentos protéicos (110).

Em um experimento realizado em 2010, os efeitos genotóxicos do DMSO, EG e PROH foram avaliados em células somáticas e os autores concluíram que a exposição ao PROH aumentou significativamente o dano ao DNA nestas células (111). Na sequência, os autores realizaram outro experimento em que foi testada a genotoxicidade do PROH em oócitos maduros de camundongo, concluindo que altas concentrações de PROH (7,5% e 15%) induziram danos significativos ao DNA independente da duração da exposição (112).

Em um artigo publicado por Hu et al. (113), os efeitos de dois protocolos de vitrificação de oócito bovinos, um contendo DMSO e EG e o outro contendo PROH e EG, foram avaliados quanto a configuração do fuso meiótico, ao perfil de metilação global do DNA, à apoptose, e à fragmentação do DNA. Todos os parâmetros observados no experimento mostraram-se estatisticamente superiores no grupo contendo PROH do que nos grupos

controle ou com EG. Por isso, os autores concluíram que a exposição ao PROH faz com que os oócitos fiquem mais vulneráveis a metilação de DNA, que pode estar diretamente associado com desordens de *imprinting* genômico (113).

Diversos autores encontraram resultados positivos quando são aplicadas estratégias como a diminuição da concentração de sódio ou cálcio nos crioprotetores, ou o uso de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores durante a criopreservação (52). Szurek & Eroglu (2011) (114) mostraram que a combinação de concentrações mais baixas de PROH e DMSO reduziram a toxicidade dos agentes crioprotetores aos oócitos de camundongo e melhoraram significativamente as taxas de sobrevivência (85,2%) em comparação com o uso isolado dos mesmos agentes (50,8%). Esses resultados indicam que uma possível alternativa para evitar a toxicidade dos agentes crioprotetores seria a combinação de substâncias diferentes com concentrações menores (114).

O EG é amplamente utilizado na vitrificação já que é um dos agentes crioprotetores de maior permeabilidade à membrana plasmática do oócito, com menor peso molecular e também menor toxicidade para oócitos ou embriões mamíferos, incluindo humanos (69). Este agente crioprotetor penetra as membranas mais rapidamente do que o glicerol e é menos tóxico do que outros agentes crioprotetores permeáveis (69, 92, 115). Soluções de equilíbrio com 4% de EG e de vitrificação com 35% têm sido usadas, frequentemente, para a vitrificação de oócitos de diferentes espécies (115).

Fujiwara et al. (2010) (76) avaliaram as taxas de sobrevivência e desenvolvimento embrionário de oócitos de rato submetidos a vitrificação com meios contendo apenas EG, apenas DMSO ou uma combinação de EG e DMSO com ou sem cálcio. Os autores mostraram que os oócitos vitrificados em meio sem cálcio e suplementados apenas com EG apresentaram maiores taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*, comparado com aqueles oócitos vitrificados apenas com DMSO ou com a combinação de EG e DMSO (76). De forma semelhante, Mahmoud et al. (2010) (116) observaram que a exposição de oócitos de búfalo aos meios contendo apenas EG ou EG + DMSO proporcionaram as melhores taxas de maturação nuclear após a vitrificação, enquanto que as taxas mais baixas

foram obtidas após a exposição a combinação de EG + glicerol e DMSO + glicerol. Apesar dos resultados destes experimentos apontarem para o uso isolado de crioprotetores, a combinação de agentes crioprotetores pode ter algumas vantagens e a combinação de EG com DMSO tem sido amplamente utilizada (117).

Mukaida et al. (2003) (75) relataram altas taxas de sobrevivência de embriões humanos que foram vitrificados no estágio de blastocisto com uma combinação de EG e DMSO. A combinação de agentes crioprotetores no processo de vitrificação pode ter induzido uma redução da concentração relativa, diminuindo a toxicidade dos crioprotetores (75). Portanto, o uso de dois ou mais agentes permeáveis ao invés de um permite o uso de concentrações mais baixas de cada agente reduzindo a toxicidade (118).

1.4 Métodos de Avaliação da Viabilidade Oocitária

1.4.1 Maturação *in vitro*

A maturação oocitária *in vitro* (MIV) é uma técnica que rotineiramente é empregada na produção de embriões em animais domésticos, embora ainda seja considerada experimental na prática clínica em humanos (119). A MIV é uma ferramenta importante para auxiliar no tratamento da infertilidade, clonagem animal, produção de animais transgênicos e também serve como um método de avaliação da viabilidade dos gametas femininos (119). Inicialmente, foi utilizada como uma ferramenta de pesquisa que se desenvolveu de forma que se tornou essencial nos processos de produção *in vitro* de embriões (22).

A eficiência desta técnica é limitada por fatores intrínsecos do oócito, como modificações bioquímicas e moleculares necessárias para permitir a maturação e subsequente fecundação adequada, sendo que esta técnica difere dos processos de maturação *in vivo* de duas maneiras principais (119). Primeiro, os CCOs são coletados de folículos antrais de tamanho médio, portanto, ainda não completaram a maturação nuclear e citoplasmática e, pelo fato de serem CCOs imaturos, não possuem a maquinaria molecular e celular necessária para promover a fecundação e embriogênese inicial (119). Além disso, a remoção mecânica dos CCOs do folículo resulta em uma

mudança do meio favorável para progressão adequada da meiose, e isso faz com que os CCOs sofram um processo de maturação meiótica espontânea *in vitro* (119).

Para que a maturação nuclear e citoplasmática ocorra de forma sincronizada e adequada, os CCOs devem ser supridos com os mesmos nutrientes a que seriam submetidos se estivessem no ambiente ovariano e, para isso, o uso de meios de cultivo com diferentes formulações e suplementações é foco de experimentação de muitos autores (119). Os diferentes meios de cultivo utilizados podem ter efeitos específicos dependendo da espécie, fase do ciclo estral ou menstrual e atividade de hormônios durante estas fases e, por isso, as condições de MIV devem ser estudadas de maneira individual em cada espécie (120).

Os meios de maturação são geralmente classificados como simples ou complexos (121) e definidos ou indefinidos (122). A primeira classificação é relacionada a composição dos meios, ou seja, os meios simples são os que contêm sais básicos, lactato, piruvato, glicose e bicarbonato de sódio, enquanto, os complexos contêm diversos componentes adicionais, bem como suplementações com fontes protéicas e hormônios (123). A segunda classificação refere-se a mensuração dos componentes presentes nos meios, sendo que os meios definidos possuem componentes identificáveis e mensuráveis, enquanto, os meios indefinidos possuem componentes variáveis e em concentrações variáveis, dependendo do lote (122). Em ratos, os meios mais comumente utilizados para maturação *in vitro* em atmosfera com 5% de CO₂ são o M16 (124), TCM 199 (125) e o *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM) (126) e para manipulação *in vitro* nas condições do ambiente, o M2 (127) é o mais aplicado.

A composição básica dos meios de maturação costuma não ser suficiente para permitir a progressão da meiose e maturação citoplasmática e, portanto, diferentes suplementos podem ser adicionados para melhorar as condições de cultivo, como o hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), gonadotrofina coriônica humana (hCG), progesterona, fatores de crescimento epidérmico (EGF), antibióticos e antimicóticos, proteínas e aminoácidos (120). Já foi constatado que a adição de FSH e EGF ao meio de maturação proporciona aumento das taxas de maturação em

ratos devido a estimulação das células do cumulus ao redor do oócito que, por sua vez auxiliam no desenvolvimento oocitário e na progressão da meiose (128).

Já foi relatado também que o hormônio do crescimento aumenta os eventos metabólicos intrafoliculares necessários para a maturação do oócito, além de possuir importantes papéis na função ovariana, crescimento folicular e esteroidogênese (129). Por esse motivo, a adição deste hormônio nos meios de maturação *in vitro* já foi testada e constatou-se que há uma aceleração da maturação nuclear, bem como promoção da clivagem e desenvolvimento embrionário subsequente (129). Além desses, a suplementação do meio de maturação de oócitos com ácido hialurônico e sulfato de condroitina A tem sido associada com altas taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* em diversas espécies, como caninos, suínos, bovinos e humanos (130).

Alguns fatores de crescimento solúveis, chamados de fatores secretados pelos oócitos (OSFs) também podem contribuir para a MIV, sendo que os principais fatores conhecidos são o GDP9 e o BMP15 (119). Esses fatores modulam diversas funções associadas com o crescimento e diferenciação nas células da granulosa e do cumulus como promoção de crescimento celular, prevenção de morte celular, modulação da esteroidogênese e regulação do crescimento e metabolismo das células do cumulus (119). Hussein et al. (2006) (131) expuseram CCOs bovinos a concentrações adicionais de OSFs durante a MIV de duas maneiras: expondo os oócitos a uma mistura não caracterizada de OSFs nativos através do co-cultivo de CCOs intactos com oócitos desnudos; ou tratando os CCOs com GDF9 e BMP15 recombinantes durante a MIV. Os resultados destes experimentos mostraram que a capacidade destes oócitos de prosseguir até o estágio de blastocisto foi aumentada de 40% (controle) para até 60% quando tratados tanto com OSFs nativos quanto com os recombinantes, indicando que a presença destes componentes no meio de maturação significativamente melhora o potencial de desenvolvimento do oócito (131).

A adição de componentes protéicos, como o SFB é uma estratégia importante na maturação *in vitro* de oócitos (129). O SFB contém uma

proteína chamada fetuina que inibe o endurecimento da zona pelúcida, iniciado pela liberação de grânulos corticais (129). A adição de SFB ao meio de maturação tem sido associada com a expansão das células do cumulus induzida por FSH, bem como, a maiores níveis de penetração espermática (129). Apesar dos oócitos poderem ser maturados sem a suplementação proteica, a produção de embriões aumenta quando uma fonte proteica é adicionada ao meio (132). Outras fontes proteicas, como o BSA, podem ser usadas para suplementar os meios de maturação, entretanto, Ali & Sirard (2002) (132) mostraram que a substituição do SFB por BSA não apenas atrasa a maturação nuclear, mas também diminui a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos (129).

1.4.2 Ativação Partenogenética

O método mais comumente utilizado para avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* é a fecundação *in vitro* (FIV) que consiste em metodologia composta por uma série de etapas que culminam com a fecundação do oócito por um espermatozóide fora do organismo, com o objetivo de obter embriões viáveis para o desenvolvimento (133). Entretanto, outras técnicas, como a ativação partenogenética, têm sido propostas como modelo de desenvolvimento embrionário devido a sua praticidade e por não necessitar de um gameta masculino para originar os embriões (133). Além disso, o desenvolvimento dos partenotos é virtualmente idêntico ao dos embriões, como observado em diversas espécies (134). No caso dos humanos, além das facilidades da técnica, os modelos experimentais baseados em ativação partenogenética podem sobrepor limitações éticas para a pesquisa com embriões, além de oferecer uma ferramenta importante para avaliar o potencial de desenvolvimento de oócitos expostos a condições experimentais [216].

Em algumas espécies, a partenogênese apresenta-se naturalmente no organismo como uma estratégia reprodutiva em que a fêmea utiliza apenas o oócito para gerar um embrião viável, sem a contribuição do material genético paterno e sem a divisão meiótica reducional (133). Em mamíferos, a partenogênese pode ser alcançada através de estímulos apropriados, tanto *in*

vivo como *in vitro*, porém não pode ser considerada uma forma de reprodução natural (133).

A ativação partenogenética *in vitro* pode ser atingida através de estímulos mecânicos, químicos ou elétricos, podendo-se utilizar oócitos em diferentes estágios da meiose, que resultarão em partenotos haplóides ou diplóides (133). Um dos métodos para ativação partenogenética consiste na utilização de oócitos na segunda meiose, resultando na extrusão do segundo corpúsculo polar e levando a formação de um partenoto haplóide (133). Entretanto, este método não costuma ser muito aplicado, visto que a capacidade de desenvolvimento embrionário é reduzida comparado aos embriões normais e aos partenotos diplóides (135).

Já os partenotos diplóides podem ser obtidos de duas maneiras, sendo que a maneira mais comum consiste em combinar a ativação dos oócitos em metáfase II com a exposição a um inibidor de extrusão do segundo corpúsculo polar (136). Essa abordagem é utilizada por não afetar a formação e movimentos do pró-núcleo (136). Outra alternativa é o tratamento dos oócitos com citocalasina D durante a maturação *in vitro* antes da ativação para que haja a ligação desta droga a extremidade positiva da actina-F, bloqueando a adição de monômeros de actina-G e prevenindo a extrusão do primeiro corpúsculo polar (137). Com esse protocolo, oócitos tetraplóides são formados porém, o estado diplóide é reestabelecido no final da maturação oocitária com a extrusão do segundo corpúsculo polar (133).

Em humanos, Rogers et al. (2004) (138) realizaram um experimento em que foi possível validar o uso de partenotos como modelo de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Os autores compararam o desenvolvimento embrionário de oócitos fecundados *in vitro* ou ativados partenogeneticamente e os resultados mostraram que as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* em 42-48 e 66-68 horas após a inseminação ou ativação não diferiram (138). Em outro experimento, os autores realizaram o congelamento de oócitos humanos e, após o reaquecimento, ativaram os oócitos partenogeneticamente para avaliar o desenvolvimento embrionário *in vitro* obtendo taxas de ativação de 86,1%, sendo que desses 96,8% clivaram e 16,7% formaram blastocistos (139). Os

resultados destes trabalhos indicam que a ativação partenogenética pode ser utilizada como modelo experimental de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Entretanto, alguns fatores podem influenciar negativamente o desenvolvimento dos partenotos, sendo eles, principalmente, relacionados a ausência do genoma paterno (133). Apesar de os genomas maternos e paternos serem quantitativamente iguais, eles não são funcionalmente equivalentes devido às modificações epigenéticas que levam a diferenciação da expressão gênica no embrião (140). Por esse motivo, a ausência de alguns genes presentes no genoma paterno, que são cruciais para o desenvolvimento de tecidos extra-embrionários, podem levar a um desenvolvimento anormal dos partenotos após a nidação ou a implantação conforme a espécie (141).

Devido a essas limitações, diversas substâncias e protocolos de ativação têm sido estudados por diferentes autores para aprimorar as técnicas de ativação em animais de laboratório, como o rato (142-144). Em um trabalho de Sano et al. (2009) (142), foi testado um protocolo de ativação partenogenética utilizando um tratamento com 7% de etanol e compararam com outros protocolos convencionais (ionomicina, estimulação elétrica e cloreto de estrôncio) em oócitos de ratos Wistar. Após os tratamentos, os autores observaram que as taxas de clivagem não apresentaram diferença estatística entre os grupos, com exceção do grupo tratado com estrôncio, que apresentou taxas de clivagem inferiores em relação aos grupos tratados com etanol e ativação elétrica (etanol - $98,0\% \pm 1,9\%$; estimulação elétrica - $95,4\% \pm 1,0\%$; ionomicina - $90,6\% \pm 4,7\%$; estrôncio - $78,2\% \pm 1,7\%$; controle não tratado - $97,8\% \pm 1,9\%$) (142). Além disso, os autores observaram que o grupo tratado com etanol apresentou porcentagens maiores de formação de blastocistos ($74,5\% \pm 5,1\%$) do que os outros tratamentos (estimulação elétrica - $52,3\% \pm 4,4\%$; ionomicina - $60,4\% \pm 4,9\%$; estrôncio - $60\% \pm 2,8\%$; controle não tratado - $59,2 \pm 2,4\%$) (142). Com esses resultados, os autores sugerem que o tratamento com etanol pode induzir efetivamente a ativação e subsequente desenvolvimento embrionário em oócitos de rato (142).

Algumas proteínas como a 6-(dimetilamino)purina (6-DMAP) podem ser utilizadas para promover a ativação partenogenética em diversas espécies como murinos, suínos e bovinos (145). Entretanto, pelo fato de os

oócitos de rato apresentarem diferenças na organização do citoesqueleto, nas taxas de ativação espontânea e nos meios de cultivo necessários para o desenvolvimento embrionário, a aplicação desta proteína para ativação partenogenética promove resultados diferentes dos demais (143, 146). Em ratos, já foi demonstrado que a utilização de 6-DMAP sem nenhum outro aditivo gera baixas taxas de clivagem e não permite o desenvolvimento embrionário subsequente (143). Porém, quando utiliza-se a 6-DMAP associada com estimulação elétrica, as taxas de clivagem e subsequente desenvolvimento até blastocisto aumentam significativamente (143).

Mizutani et al. (2004) (144) testaram dois protocolos de ativação partenogenética: estimulação elétrica associada com 6-DMAP ou ionomicina associada com 6-DMAP; e, além disso, verificaram se a osmolaridade do meio de ativação influenciava nas taxas de ativação e subsequente desenvolvimento embrionário. Os autores mostraram que não houve diferença estatística entre os dois tratamentos em relação as porcentagens de oócitos ativados, clivagem, formação de partenotos de quatro células, mórula e blastocisto. Os autores mostraram também que apesar de o aumento da osmolaridade do meio de fertilização de 246 mOsm (meio R1ECMm) para 310 mOsm não ter proporcionado diferenças no desenvolvimento embrionário, a ativação dos oócitos em solução de ionomicina e 6-DMAP, ambas com baixa osmolaridade (246 mOsm) aumentou significativamente as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário subsequente até blastocisto (144). A partir destes dados, os autores sugerem que as condições ideais para ativação partenogenética e subsequente desenvolvimento embrionário de oócitos de ratos Wistar são o tratamento com ionomicina 5 μ M por 5 minutos, em combinação com 6-DMAP 2 mM por 4 horas, ambos em R1ECMm de baixa osmolaridade, seguido de cultivo em meio R1ECMm (144).

1.4.3 Desenvolvimento Embrionário *in vitro*

Os métodos de ativação partenogenética e fecundação *in vitro* são capazes de gerar embriões com potencial para desenvolvimento *in vitro* até estágios específicos (41). Para que isso ocorra, os oócitos precisam estar

morfológica e bioquimicamente aptos e os processos de crescimento e maturação oocitária precisam ter suporte adequado para o desenvolvimento embrionário subsequente (41). Dessa forma, o avanço dos embriões provenientes dos processos de ativação partenogenética ou fecundação *in vitro* pode ser um indicativo de que a qualidade dos gametas e as condições prévias de cultivo foram adequadas de forma a permitir o desenvolvimento embrionário posterior. Portanto, o acompanhamento do desenvolvimento dos embriões desde estádios iniciais até os finais *in vitro* tem sido utilizado como um método de avaliação da viabilidade dos gametas, bem como para estudos sobre a embriogênese inicial e sobre ao ambiente a qual o embrião está exposto (147).

Em geral, os embriões das espécies mamíferas apresentam grande similaridade entre si, pois possuem tamanho correlato e se desenvolvem de maneira semelhante, iniciando o seu desenvolvimento como um zigoto de uma célula e progredindo até blastocisto antes de ocorrer a eclosão e nidadação ou implantação no endométrio (148). Entretanto, diferenças no que diz respeito aos processos metabólicos determinam grande variabilidade, refletindo a necessidade de adequações das condições de cultivo de acordo com as peculiaridades de cada espécie (148). Por exemplo, apesar dos embriões das espécies mamíferas passarem por fases de desenvolvimento semelhantes, o tempo necessário para as divisões celulares ocorrerem varia de espécie para espécie (148).

Em condições de cultivo adequadas, os embriões tendem a se desenvolver até estágios pré-implantacionais avançados, como blastocisto, podendo até mesmo iniciar o processo de eclosão *in vitro* (149). Por esse motivo, a necessidade de identificar os embriões mais viáveis é de extrema importância, sendo que, usualmente, os métodos utilizados para avaliar a qualidade dos embriões *in vitro* são relacionados a avaliação morfológica, de acordo com cada fase do desenvolvimento (149).

Alguns pesquisadores postulam que a qualidade embrionária pode ser predita a partir da observação morfológica dos embriões em estágio de pró-núcleo através da avaliação de algumas características como a orientação do pró-núcleo em relação aos corpúsculos polares, alinhamento do pró-núcleo e nucléolos, aparência do citoplasma, presença de precursores de corpúsculos

nucleares (NPB) e do tempo de quebra da membrana nuclear (150). Tesarik & Greco (1999) (150) relataram que, em humanos, os embriões cultivados que foram transferidos e apresentaram taxas de implantação de 100% possuíam algumas características em comum, como o número de NPB em ambos os pró-núcleos nunca era mais do que três; e os NPBs sempre tinham a mesma conformação de polarização nos dois pró-núcleos, ou seja, apresentavam-se sempre polarizados nos dois pró-núcleos ou não polarizados nos dois pró-núcleos. Garello et al. (1999) (151) examinaram a orientação dos pró-núcleos, localização dos corpúsculos polares e qualidade embrionária para determinar se existe uma correlação entre a polaridade dos embriões em estágio de pró-núcleo e desenvolvimento subsequente. Os autores relataram que o desalinhamento do corpúsculo polar pode estar correlacionado com perturbações citoplasmáticas, modificando a polaridade dos zigotos, levando a uma diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* (151).

Durante a clivagem, o critério mais utilizado para avaliação é o número de células e sua morfologia sendo que um dos pontos mais importantes para avaliar os embriões nesta fase é determinar um período de tempo estrito para comparação dos embriões (152). A maioria dos experimentos têm avaliado os embriões em relação à clivagem no período de 25 horas após a fecundação ou ativação, porém esse tempo é variável conforme a espécie avaliada (153). Algumas características como o aparecimento de quatro a cinco blastômeros no segundo dia de cultivo; pelo menos sete blastômeros no terceiro dia; ausência de blastômeros multinucleados e menos do que 20% de fragmentação no segundo e terceiro dia de cultivo são determinantes de um embrião de qualidade nos estágios de clivagem (149).

Apesar de a formação dos blastocistos ser importante para a subsequente transferência dos embriões e ocorrência de gestação, outros fatores como o número total de células, número de células da massa celular interna e taxa de glicólise têm mostrado uma correlação mais forte com a viabilidade dos blastocistos, principalmente em modelos animais como os camundongos (154). Em um estudo de Gardner et al. (2000) (155), os autores adotaram um método de avaliação baseado no nível de expansão da cavidade blastocélica e no número e na aderência das células da massa

celular interna e do trofocotoderma. Neste trabalho, os autores concluíram que a transferência de blastocistos com a cavidade blastocélica completa, massa celular interna e trofocotoderma abundantes e aderentes proporcionaram as melhores taxas de gravidez e, portanto, foram classificados com o escore de 3AA ou mais de acordo com a escala estabelecida (155).

Para que o potencial de desenvolvimento embrionário possa ser utilizado de forma adequada para avaliar a viabilidade oocitária, é necessário que as condições de cultivo e manipulação sejam adequadas, de forma a não causarem vieses na análise dos resultados obtidos (156). Diversos trabalhos mostram que os métodos de fecundação e as condições de cultivo influenciam determinadas características dos embriões, como a sua morfologia, potencial de desenvolvimento, velocidade de crescimento, número de células e expressão gênica (157, 158). Certas condições do cultivo como a composição dos meios, pH, tensão de oxigênio, temperatura e o recipiente em que é feito o cultivo podem influenciar a capacidade desenvolvimento embrionário *in vitro* (157).

Os meios de cultivo são geralmente suplementados com macromoléculas, como soro ou albumina, que possuem funções fisiológicas e práticas (156). As funções fisiológicas geralmente estão restritas à albumina e incluem a habilidade de ligação a fatores de crescimento e a quelação de metais pesados; e as funções práticas residem no fato de que essas substâncias agem como surfactantes, facilitando a manipulação por prevenir que os embriões fiquem aderidos às placas de cultivo (156). Apesar da importância das macromoléculas, o uso de soro deve ser evitado no cultivo de embriões pois ele pode ser responsável por perturbações do metabolismo, danos ultraestruturais às mitocôndrias, acúmulos anormais de lipídios e pode causar redução da criotolerância, devendo ser substituído pela albumina (159). Outras moléculas, como o PVA e PVP já foram testadas como suplementos aos meios de cultivo de embriões, entretanto foi constatado que o PVA não é capaz de manter a fisiologia e o metabolismo dos embriões (160).

Em ratos, um dos meios mais utilizados para o cultivo embrionário é o R1ECM (146). Em um estudo de Miyoshi et al. (1995) (146), os autores avaliaram a capacidade de desenvolvimento até blastocisto de embriões de

ratos cultivados com o meio R1ECM suplementado com glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais e com diferentes osmolaridades. Os resultados deste experimento mostraram que foram obtidos níveis satisfatórios de desenvolvimento embrionário, observando-se proporções que variaram de 80% a 98% nos estágios iniciais até mórula e de até 90% de blastocistos no meio suplementado com glutamina e aminoácidos essenciais e não essenciais e com osmolaridade de 246 mOsm. Com esses resultados, os autores sugerem que o meio R1ECM suplementado com as combinações apropriadas de aminoácidos e com a osmolaridade ajustada para 246 mOsm é apropriado para uso no cultivo *in vitro* de embriões de rato.

Além do R1ECMm, outros meios também já foram testados para o cultivo de embriões de rato, como o próprio M16, utilizado comumente para maturação *in vitro* de oócitos. Popova et al. (2011) (147) testaram os meios R1ECMm e M16 para o cultivo de embriões de rato e constataram que as taxas de clivagem (M16 - 83,6%; R1ECMm - 83,6%) não se alteraram de acordo com o meio utilizado. Entretanto, houve um bloqueio do desenvolvimento embrionário subsequente quando os embriões foram cultivados em M16, de forma que não houve formação de mórulas e blastocistos quando os embriões foram cultivados nesse meio (147). Em compensação, quando cultivados em R1ECMm, os embriões apresentaram taxas de mórula de 41% e de blastocistos de 19,4%, apresentando significativa superioridade quando comparado ao M16 (147).

Em outro estudo realizado por Goh et al. (2000) (161), o meio R2ECM foi utilizado para cultivo *in vitro* de embriões de duas células de rato e os autores testaram diferentes suplementações deste meio com soros de diferentes origens (BSA, SFB e *male rat serum*). Além disso, a influência da adição de L-glutamina e glicose a esse meio sobre as taxas de desenvolvimento embrionário também foi avaliada. Os autores constataram que na ausência de qualquer suplemento, proteínas, aminoácidos e glicose, o meio R2ECM não foi adequado para o desenvolvimento além do estágio de duas células(161). Ainda, dos diferentes soros testados, apenas o BSA na concentração de 0,3% aumentou o percentual de embriões que progrediram para além de duas células e mesmo assim, não foi observada compactação dos embriões e formação de blastocistos. Em compensação, a adição de 1

mM de L-glutamina e 7,5 mM de glicose ao meio R2ECM aumentou as taxas de blastocistos para 82,9%. Esses resultados mostram que a adição de suplementos, bem como de glicose e aminoácidos no meio de cultivo é importante para o desenvolvimento adequado dos embriões, entretanto a origem do soro e as concentrações desses aditivos devem ser cuidadosamente selecionadas para que não haja prejuízos no metabolismo embrionário.

Zhou et al. (2003) (162) testaram um sistema de duas fases para cultivo *in vitro* de embriões de rato em que utilizaram os meios definidos KSOM, BMOC ou HTF para cultivo por 18-22h, seguido pelo cultivo em R1ECMm por 4 dias. Os autores constataram que quando cultivados em HTF, KSOM ou BMOC por 18h-22h previamente ao cultivo em R1ECMm, as taxas de blastocistos chegaram a 83%, enquanto que o cultivo somente em R1ECMm proporcionou taxas muito baixas de blastocistos, de cerca de 6% (162). Além disso, o cultivo em meio KSOM proporcionou taxas de blastocisto estatisticamente maiores em relação aos meios HTF e BMOC (162). Este sistema também foi testado em embriões ativados partenogeneticamente e os resultados mostraram que o cultivo desses embriões em KSOM por 18h antes do cultivo em R1ECMm proporcionou taxas de blastocisto de até 58% (162).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li R, Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(3):141-52.
2. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. *Hum Reprod.* 2012;27 Suppl 1:2-21.
3. Sotelo JR, Porter KR. An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol.* 1959;5(2):327-42.
4. Weakley BS. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Anat.* 1966;100(Pt 3):503-34.
5. Zamboni L. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biol Reprod Suppl.* 1970;2:44-63.
6. Watson ML. The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J Biophys Biochem Cytol.* 1955;1(3):257-70.
7. Porter KR. Electron microscopy of basophilic components of cytoplasm. *J Histochem Cytochem.* 1954;2(5):346-75.
8. Hennet ML, Combelles CM. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol.* 2012;56(10-12):819-31.
9. Huang Z, Wells D. The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(10):715-25.
10. Mermillod P, Dalbies-Tran R, Uzbekova S, Thelie A, Traverso JM, Perreau C, et al. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim.* 2008;43 Suppl 2:393-400.
11. Santiquet NW, Develle Y, Laroche A, Robert C, Richard FJ. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biol Reprod.* 2012;87(2):46.
12. Sun QY, Miao YL, Schatten H. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle.* 2009;8(17):2741-7.
13. Zuccotti M, Merico V, Cecconi S, Redi CA, Garagna S. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update.* 2011;17(4):525-40.
14. Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med.* 2009;27(1):32-42.

15. Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, et al. LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol Endocrinol.* 2011;25(1):104-16.
16. Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol.* 2007;21(9):2037-55.
17. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* 2009;136(11):1869-78.
18. Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(12):1896-912.
19. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology.* 2009;71(5):836-48.
20. Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007;85(13 Suppl):E1-3.
21. Gandolfi TA, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001;55(6):1255-76.
22. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* 2006;65(1):126-36.
23. Fulka J, Jr., First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(1):41-9.
24. Hyttel P, Xu KP, Smith S, Greve T. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil.* 1986;78(2):615-25.
25. Fair T, Hyttel P, Lonergan P, Boland MP. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation, and fertilization. *Biol Reprod.* 2001;64(5):1516-25.
26. Kline D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. *Curr Top Dev Biol.* 2000;50:125-54.
27. Wickramasinghe D, Albertini DF. Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 1993;28:125-53.
28. Thibault C, Szollosi D, Gerard M. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev.* 1987;27(5):865-96.
29. Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F, Gandolfi F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 1999;52(4):427-33.
30. Piccioni F, Zappavigna V, Verrotti AC. Translational regulation during oogenesis and early development: the cap-poly(A) tail relationship. *C R Biol.* 2005;328(10-11):863-81.

31. Zuccotti M, Merico V, Sacchi L, Bellone M, Brink TC, Bellazzi R, et al. Maternal Oct-4 is a potential key regulator of the developmental competence of mouse oocytes. *BMC Dev Biol.* 2008;8:97.
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Development of Multicellular Organisms. In: Science G, editor. *Molecular Biology of the Cell.* 5th ed 2007.
33. Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(9):654-64.
34. Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):355-65.
35. Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev.* 1990;25(4):374-83.
36. Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, Redi CA. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod.* 1998;58(3):700-4.
37. Bouniol-Baly C, Hamraoui L, Guibert J, Beaujean N, Szollosi MS, Debey P. Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biol Reprod.* 1999;60(3):580-7.
38. Pesty A, Miyara F, Debey P, Lefevre B, Poirot C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth in vitro. *Mol Hum Reprod.* 2007;13(1):3-9.
39. Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA. Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev.* 1995;41(4):479-85.
40. Zuccotti M, Garagna S, Merico V, Monti M, Alberto Redi C. Chromatin organisation and nuclear architecture in growing mouse oocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;234(1-2):11-7.
41. Schuetz AW. Gametogenic processes and their relationship to normal and abnormal conceptus development. *J Anim Sci.* 1979;49 Suppl 2:1-25.
42. McGaughey RW. The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17beta on meiotic maturation. *Endocrinology.* 1977;100(1):39-45.
43. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil.* 1977;49(1):101-9.
44. Chaube SK. Role of meiotic maturation regulatory factors in developmental competence of mammalian oocytes. *Health and Population - Perspectives and Issues.* 2001;24(4):218-31.

45. Zhou C, Fitzharris G, Alper SL, Baltz JM. Na⁺/H⁺ exchange is inactivated during mouse oocyte meiosis, facilitating glycine accumulation that maintains embryo cell volume. *J Cell Physiol.* 2013;228(10):2042-53.
46. Daniel SA, Armstrong DT, Gore-Langton RE. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Res.* 1989;24(1):109-21.
47. Vela G, Luna M, Sandler B, Copperman AB. Advances and controversies in assisted reproductive technology. *Mt Sinai J Med.* 2009;76(6):506-20.
48. Hirao Y. Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Anim Sci J.* 2011;82(2):187-97.
49. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE, Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod.* 2008;78(1):2-12.
50. Leibo SP, Pool TB. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil Steril.* 2011;96(2):269-76.
51. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972;178(4059):411-4.
52. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci II.* 1972;11(22):1071-9.
53. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol.* 1963;47:347-69.
54. Liu J, Phy J, Yeomans E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology.* 2012;78(8):1641-52.
55. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011;141(1):1-19.
56. Willadsen SM. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: Elliott K, Whelan J, editors. *The freezing of mammalian embryos.* Amsterdam: Elsevier Excerpta Medica; 1977. p. 175-201.
57. Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology.* 1984;21(5):767-90.
58. Liebermann J. Vitrification of oocytes and embryos. In: Katkov II, editor. *Current frontiers in cryobiology.* Rijeka: InTech; 2012. p. 169-84.
59. Wong JY, Wong AY. Phasing-in of vitrification into routine practice: why, how, and what. *Hong Kong Med J.* 2011;17(2):119-26.
60. Martinez-Burgos M, Herrero L, Megias D, Salvanes R, Montoya MC, Cobo AC, et al. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertil Steril.* 2011;95(1):374-7.

61. Cao YX, Xing Q, Li L, Cong L, Zhang ZG, Wei ZL, et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertil Steril*. 2009;92(4):1306-11.
62. Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005;118(1):66-70.
63. Cha SK, Kim BY, Kim MK, Kim YS, Lee WS, Yoon TK, et al. Effects of various combinations of cryoprotectants and cooling speed on the survival and further development of mouse oocytes after vitrification. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38(1):24-30.
64. Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(6):680-91.
65. Brambillasca F, Guglielmo MC, Coticchio G, Mignini Renzini M, Dal Canto M, Fadini R. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(12):1531-9.
66. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51(1):53-8.
67. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 1987;24(5):387-402.
68. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67(1):81-9.
69. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*. 1996;54(5):1059-69.
70. Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. In: Press P, editor. *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. London 1992. p. 255-64.
71. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(5):608-14.
72. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod*. 2009;24(4):797-804.
73. Kader A, Choi A, Sharma RK, Falcone T, Agarwal A. Effect of varying equilibration time in a two-step vitrification method on the post-warming DNA integrity of mouse blastocysts. *Fertil Steril*. 2010;93(8):2640-5.
74. Cseh S, Horlacher W, Brem G, Corselli J, Seregi J, Solti L, et al. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology*. 1999;52(1):103-13.
75. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*. 2003;18(2):384-91.

76. Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. *J Reprod Dev.* 2010;56(1):169-75.
77. Karlsson JO, Szurek EA, Higgins AZ, Lee SR, Eroglu A. Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. *Cryobiology.* 2014;68(1):18-28.
78. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil.* 1990;90(2):547-53.
79. Diez C, Munoz M, Caamano JN, Gomez E. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reprod Domest Anim.* 2012;47 Suppl 3:76-83.
80. Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology.* 1993;30(6):562-80.
81. Zhang Z, Liu Y, Xing Q, Zhou P, Cao Y. Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by in vitro maturation: vitrification is superior to the slow freezing method. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:156.
82. Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet.* 2005;22(3):119-27.
83. Huang JY, Chen HY, Tan SL, Chian RC. Effect of choline-supplemented sodium-depleted slow freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities. *Fertil Steril.* 2007;88(4 Suppl):1093-100.
84. Kim SS, Olsen R, Kim DD, Albertini DF. The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(6):739-47.
85. Lovelock JE. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 1953;10(3):414-26.
86. McGann LE. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology.* 1978;15(4):382-90.
87. Oliveira AD. Sobrevivência in vitro de embriões bovinos produzidos in vitro submetidos à criopreservação. In: UFRGS, editor. *Dissertação de Mestrado.* Porto Alegre, RS, Brazil 1999.
88. Oliveira AD, Forell F, Medeiros CMO, Lopes RFF, Rodrigues JL. Vitricificação de embriões bovinos produzidos in vitro, usando etilenoglicol e sacarose. *Ars Veterinaria.* 2003;19(2):191-201.
89. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science.* 1970;168(3934):939-49.
90. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology.* 1999;38(2):119-30.

91. Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, et al. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci.* 1997;48(2-4):247-56.
92. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology.* 1997;35(3):219-29.
93. Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 2001;43(1):21-31.
94. Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Maside C, Alminana C, et al. Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology.* 2010;73(3):300-8.
95. Asada M, Ishibashi S, Ikumi S, Fukui Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology.* 2002;58(6):1199-208.
96. Checura CM, Seidel GE, Jr. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology.* 2007;67(5):919-30.
97. Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod.* 1993;48(3):606-12.
98. Dinnyes A, Lonergan P, Fair T, Boland MP, Yang X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 1999;53(3):318-24.
99. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 2000;62(3):564-70.
100. Wang C, Machaty Z. Calcium influx in mammalian eggs. *Reproduction.* 2013;145(4):R97-R105.
101. Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer F, Rosati I, Pintus PP, Ledda S, et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. *Cryobiology.* 2002;45(3):204-12.
102. Paim LMG. Maturação in vitro de Complexos Cumulus-Oócito de *Rattus norvegicus* após Vitriificação. In: UFCSPA, editor. Trabalho de Conclusão de Curso. Porto Alegre 2012.
103. Hardingham T. *Chemistry and Biology of Hyaluronan.* 1st ed. Oxford: Elsevier; 2004. 599 p.
104. Balazs EA, Gibbs DA. The rheological properties and the biological function of hyaluronic acid. In: Balzs EA, editor. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix.* London: Academic Press; 1970. p. 1241-54.
105. Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett.* 2007;29(1):17-25.

106. Mendichi R, Rizzo V, Gigli M, Schieron AG. Fractionation and characterization of a conjugate between a polymeric drug-carrier and the antitumor drug camptothecin. *Bioconjug Chem*. 2002;13(6):1253-8.
107. Marei WF, Ghafari F, Fouladi-Nashta AA. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2012;78(3):670-7.
108. Opiela J, Latasiewicz E, Smorag Z. Optimal concentration of hyaluronan and plant protein in different culture systems for in vitro maturation of bovine oocytes. *Indian J Exp Biol*. 2012;50(12):839-46.
109. Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*. 1990;27(3):247-68.
110. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*. 1987;100(2):313-24.
111. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(7):1905-12.
112. Berthelot-Ricou A, Perrin J, di Giorgio C, de Meo M, Botta A, Courbiere B. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay. *Fertil Steril*. 2011;96(4):1002-7.
113. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertil Steril*. 2012;98(3):752-60 e3.
114. Szurek EA, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One*. 2011;6(11):e27604.
115. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*. 2000;63(2):513-8.
116. Mahmoud KG, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE, Jr., Nawito MF. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(4):565-71.
117. Morato R, Mogas T, Maddox-Hyttel P. Ultrastructure of bovine oocytes exposed to Taxol prior to OPS vitrification. *Mol Reprod Dev*. 2008;75(8):1318-26.
118. Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*. 1999;52(5):939-48.
119. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 2007;67(1):6-15.

120. Bukowska D, Kempisty B, Piotrowska H, Zawierucha P, Brussow KP, Jaskowski JM, et al. The in vitro culture supplements and selected aspects of canine oocytes maturation. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(1):199-205.
121. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. 2nd ed. Cambridge: CAB International; 2003.
122. Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology.* 1996;45(1):27-40.
123. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary? *Hum Reprod.* 1992;7(10):1339-41.
124. Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl.* 1971;14:7-21.
125. Cincik M, Baykal B, Zeteroglu S, Onalan G, Ceyhan ST, Ergur R. Pronuclear synchronization and nuclear morphology of mature and in vitro matured oocytes in the rat: an ultrastructural study. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2005;41(8-9):272-7.
126. Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod.* 1989;40(4):720-8.
127. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1982;66(1):161-8.
128. Dekel N, Sherizly I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology.* 1985;116(1):406-9.
129. Ali A, Benkhalifa M, Miron P. In-vitro maturation of oocytes: biological aspects. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(3):437-46.
130. Borg N, Holland M. The effect of glycosaminoglycans on rat gametes in vitro and the associated signal pathway. *Reproduction.* 2008;135(3):311-9.
131. Hussein TS, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol.* 2006;296(2):514-21.
132. Ali A, Sirard MA. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. *Zygote.* 2002;10(1):65-71.
133. Paffoni A, Brevini TA, Gandolfi F, Ragni G. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. *Placenta.* 2008;29 Suppl B:121-5.
134. Kaufman MH, Gardner RL. Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following in vitro activation and embryo transfer. *J Embryol Exp Morphol.* 1974;31(3):635-42.
135. Henery CC, Kaufman MH. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Mol Reprod Dev.* 1992;31(4):258-63.

136. Balakier H, Tarkowski AK. Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. *J Embryol Exp Morphol*. 1976;35(1):25-39.
137. Kubiak J, Paldi A, Weber M, Maro B. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development*. 1991;111(3):763-9.
138. Rogers NT, Hobson E, Pickering S, Lai FA, Braude P, Swann K. Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*. 2004;128(6):697-702.
139. de Fried EP, Ross P, Zang G, Divita A, Cunniff K, Denaday F, et al. Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril*. 2008;89(4):943-7.
140. Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 1984;308(5959):548-50.
141. Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*. 2001;414(6859):122-8.
142. Sano D, Yamamoto Y, Samejima T, Seita Y, Inomata T, Ito J, et al. A combined treatment with ethanol and 6-dimethylaminopurine is effective for the activation and further embryonic development of oocytes from Sprague-Dawley and Wistar rats. *Zygote*. 2009;17(1):29-36.
143. Jiang JY, Mizuno S, Mizutani E, Sasada H, Sato E. Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2002;61(1):120-5.
144. Mizutani E, Jiang JY, Mizuno S, Tomioka I, Shinozawa T, Kobayashi J, et al. Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *J Reprod Dev*. 2004;50(1):139-46.
145. Campbell KD, Reed WA, White KL. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biol Reprod*. 2000;62(6):1702-9.
146. Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *J Reprod Fertil*. 1995;103(1):27-32.
147. Popova E, Bader M, Krivokharchenko A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed in vitro. *Genes (Basel)*. 2011;2(2):332-44.
148. Taft RA. Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system. *Theriogenology*. 2008;69(1):10-6.
149. Gardner DK, Lane M. Assessment of Preimplantation Embryo Development and Viability. In: Gardner DK, Lane M, Watson AJ, editors. *A laboratory guide to the mammalian embryo*. 1st ed. USA: Oxford University Press; 2004.

150. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999;14(5):1318-23.
151. Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, et al. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod.* 1999;14(10):2588-95.
152. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update.* 1995;1(2):91-148.
153. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod.* 1998;13(1):182-7.
154. Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil.* 1997;109(1):153-64.
155. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1155-8.
156. Gardner DK, Lane M. Culture of the Mammalian Preimplantation Embryo. In: Gardner DK, Lane M, Watson AJ, editors. *A laboratory guide to the mammalian embryo.* 1st ed. USA: Oxford University Press; 2004.
157. Feuer SK, Camarano L, Rinaudo PF. ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(4):189-204.
158. Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril.* 2006;86(4 Suppl):1252-65, 65 e1-36.
159. Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int.* 1994;18(12):1163-79.
160. Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod.* 2000;63(1):281-93.
161. Goh VH, Adiga SK, Tain CF, Tong TY, Ng SC. Successful in vitro growth of rat two-cell embryos to blastocysts using a simple chemically defined medium. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;43(3):171-5.
162. Zhou Y, Galat V, Garton R, Taborn G, Niwa K, Iannaccone P. Two-phase chemically defined culture system for preimplantation rat embryos. *Genesis.* 2003;36(3):129-33.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

3.1.1 Determinar um protocolo de vitrificação que permita a sobrevivência dos CCOs e a manutenção da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* após a criopreservação.

3.2 Específicos

3.2.1 Determinar as taxas de retomada de meiose e maturação nuclear de CCOs de *Rattus norvegicus* expostos a soluções crioprotetoras com diferentes concentrações de agentes crioprotetores.

3.2.2 Determinar as taxas de retomada de meiose e maturação nuclear de CCOs de *Rattus norvegicus* expostos a soluções crioprotetoras durante tempos diferentes.

3.2.3 Avaliar as taxas de clivagem, formação de mórulas e de blastocistos oriundos de CCOs de *Rattus norvegicus* submetidos a vitrificação com diferentes soluções crioprotetoras e tempos de exposição.

4 SITUAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito intitulado "Effects of Vitrification of *Rattus norvegicus* Immature Cumulus-Oocyte Complexes Using Different Cryoprotectant Concentrations and Exposure Times on Nuclear Maturation and Embryo Development" encontra-se em preparação pelos autores e será submetido a revista científica *Theriogenology*, de fator de impacto 1,845 e de Qualis B1 na área de Medicina I pela CAPES.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Title: Effects of Vitrification of *Rattus norvegicus* Immature Cumulus-Oocyte Complexes Using Different Cryoprotectant Concentrations and Exposure Times on Nuclear Maturation and Embryo Development

Authors:

Paim, L.M.G.^a e-mail: liag.paim@gmail.com

Gomes, J.J.^a e-mail: julianafankg@gmail.com

Forell, F.^c e-mail: fforell@gmail.com

Lopes, R.F.F.^b e-mail: rui.lopes@ufrgs.br

Oliveira, A.T.D.^{a,b} e-mail: atdo@ufrgs.br

^a Laboratório de Biologia Celular - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Centro Agroveterinário, Lages, SC, Brazil

Corresponding Author:

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500, sala 001D - Porto Alegre/Brazil - 90050-170

e-mail: atdo@ufrgs.br

5.1 Abstract

Rat cumulus oocyte complex vitrification is still considered a challenge due to the lack of successful results provided by this technique. Hence, the aim of this study was to determine more suitable conditions for vitrification of immature COCs. In the first experiment, immature COCs were exposed to equilibrium solutions (ES) containing different concentrations of EG and DMSO diluted in mPBS for 4 minutes. After exposure, COCs were exposed to cryoprotective solutions (CS, G1-G4) containing two penetrating cryoprotectant agents (EG and DMSO) in different concentrations, added with 0.5 M sucrose and 0.025 M hyaluronic acid diluted in mPBS for 60 seconds. The control group was not exposed to any of the solutions. After exposure, COCs were *in vitro* matured for 30 h and after that, they were denuded and stained with Hoechst 33342 to assess meiosis resumption (MR) and nuclear maturation status (NM). In the second experiment, COCs were exposed to ES for 4 minutes and to CS for 30, 60 or 90 seconds with subsequent vitrification. The control group was not exposed to the vitrification process. After 7 days vitrified, the COCs were warmed and *in vitro* matured for 30 h. MR and NM rates were assessed after 30 h maturation. Finally, in the third experiment, COCs were vitrified using the cryoprotective solution G4 and exposure period of 60 seconds. The control group was not vitrified. After 7 days, COCs were warmed, *in vitro* matured for 30 h and parthenogenetically activated. Developmental rates were determined throughout 5 days of embryo culture. In the first experiment, control group presented higher MR (76.3%) and NM (50%) rates compared to the exposed groups. Moreover, G1 presented lower MR (48.6%) and NM (21.6%) rates compared to G2, G3 and G4. In the second experiment, control group presented higher MR (79.6%) and NM (36.3%) rates compared to the vitrified groups. However, there were no significant differences among the vitrified groups. In the third experiment, cleavage (65.3%) and morula (38.8%) rates were higher in the control group compared to the vitrified groups, however blastocyst rates did not differ between the control and vitrified groups. Our data shows that the use of EG

alone as a cryoprotective agent provides better MR and NM rates and considerable cleavage and morula rates.

Keywords: Vitrification, Oocyte, Rat, Cryoprotectants, Embryo

5.2 Introduction

Cryopreservation has been widely applied as a method for maintaining the viability of gametes and embryos for longer periods of time outside the organism in a variety of mammalian species, such as bovine [1], humans [2] and mice [3, 4]. These techniques have accelerated the progress of several important advances such as genetic improvement and generation of mutant strains [5, 6]. However, there are very few reports about the cryopreservation of rat (*Rattus norvegicus*) gametes and very little is known about the cryobiological aspects of rat gametes, even though this specie is widely used for research purposes in a range of important medical fields [7]. With this in mind, it becomes clear that the study of ideal cryopreservation conditions that could be applied to rat Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) is essential in order to contribute with the scientific development in this field.

Generally, vitrification has proved to provide better results than traditional freezing methods because this technique aims to avoid chilling injury and ice crystal formation [4]. Even so, after vitrification, oocytes may present compromised developmental competence [5]. For that reason, optimal cryopreservation protocols should be adapted to individual species requirements, such as gamete size, permeability and sensitivity to cryoprotective agents (CPA) [5]. Although the rat COC is morphologically similar to that of other mammalian species, it has some peculiarities that distinguish it from other species, such as the mouse. There are reports stating that the rat genome is more similar to the human genome than the mice genome [8]. Moreover, the rat zona pellucida is constituted by four main proteins (ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4/ZPB), which is similar to the human zona, whereas the mouse zona pellucida is constituted by three proteins [9]. Furthermore, significant ultrastructure and meiotic differences can be observed between rats and mice oocytes, mainly regarding polar body formation and energy requirements [10-12].

Several factors may affect the survivability and developmental competence of cryopreserved oocytes, such as the stage of maturation and

development, the cell cycle stage during meiosis, the presence of surrounding cumulus cells, concentration of CPAs and time of exposure to CPAs [4, 13, 14]. Until recently, researchers have been focusing on cryopreservation of mature oocytes (MII), however, at this stage, meiotic spindle microtubules and microfilaments may be damaged by low temperatures and exposure to cryoprotectants [4, 15]. Hence, chromosomal dispersion and high incidences of aneuploidy or polyploidy can be observed [4, 15]. In order to avoid meiotic spindle damage, it has been suggested that the use of immature oocytes (at germinal vesicle, or germinal vesicle breakdown stages) for cryopreservation may be less traumatic to meiotic spindle than the use of mature oocytes [4].

One of the most critical aspects of cryopreservation are the toxic effects caused by the cryoprotective agents that might impair successful vitrification. There is no consensus regarding which cryoprotectant is the most and less toxic and which one should be used for each species, and the data available in the literature is very controversial, with studies reporting both positive and negative effects for the same cryoprotectants [14, 16-18].

Ethylene glycol (EG) has been used for vitrification of oocytes and embryos because it is one of the most permeable cryoprotectants; it has a low molecular weight and it is considered less toxic than other commonly used cryoprotectants [19-22]. Fujiwara *et al.* (2010) evaluated the effects of using EG or DMSO alone and a combination of EG + DMSO on embryonic development of vitrified rat oocytes [14]. The authors reported that although the overall developmental ability was low, the use of DMSO alone and EG + DMSO provided lower blastocyst rates in comparison with the use of EG alone [14].

In agreement with these results, Arav *et al.* (1993) [17] reported that DMSO presented the most harmful effects in bovine oocytes, as they obtained very low rates of *in vitro* fertilization from the oocytes exposed to DMSO (12%) in comparison to glycerol (21%) and propyleneglycol (60%) [17]. However, Aye *et al.* (2010) [18] reported no genotoxic effects of DMSO in germ cell lines whereas EG provided significant genotoxic and calstogenic activities. The data above mentioned indicates that it remains unclear which cryoprotectant should be used in each case and, thus, more research is

required to elucidate specific effects of these substances to oocytes and embryos.

Moreover, the combination of multiple types of CPAs and macromolecular supplements has been used to vitrify embryos and oocytes of several species with the aim of decreasing the concentration required to achieve vitrification [13]. But even with the combination of different cryoprotectants, the concentrations required during this process are still relatively high [13]. For that reason, it is essential to determine ideal exposure periods to the CPAs in order to avoid potential toxic effects caused by these agents [13].

Fujiwara et al. (2010) [14] exposed rat oocytes to an equilibrium solution for different periods of time before vitrification and assessed subsequent cleavage rates after warming and artificial activation. After vitrification and warming, the oocytes were subjected to parthenogenetic activation and the authors observed that cleavage rates were higher in the group exposed to equilibrium solution for 4 minutes than those exposed for 1, 7 and 10 minutes. These data suggests that 4 minutes exposure to equilibration solution caused less toxic effects on rat oocytes than 1, 7 and 10 minutes; however, the authors did not evaluate different exposure periods to the cryoprotective solutions.

Hence, due to the lack of cryobiological data regarding rat (*Rattus norvegicus*) COCs, and the importance of this animal model for biological researches in a range of areas, the aim of this study was to determine more suitable conditions for vitrification of rat COCs by testing the effects of different concentrations of cryoprotectants and different exposure times to cryoprotective solutions on meiosis resumption, nuclear maturation and embryo development rates.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Animals

One hundred and eight female Wistar rats obtained from the Animal Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre were used for the experiments. All the experiments were previously approved by

the Ethics Commission on Animal Use of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, through the approval 206/13. Furthermore, all the experiments were conducted according to the Brazilian law 11794/2008 for animal experiments.

5.3.2 Media and Reagents

All the reagents used in this study were purchased on Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated on the text. Modified PBS (mPBS) [23] was used for transportation of the ovaries and selection of COCs. Further manipulation and washing of the COCs was performed in M2 medium [24] and *in vitro* maturation was performed in M16 medium [23]. For parthenogenetic activation, M2 was used for incubation at atmospheric temperature and mR1ECM [25] was used for incubation at 37°C. Further embryo culture was performed using mR1ECM.

5.3.3 Experimental Design

This study was conducted in three experiments. The first and second experiments were performed with the aim of determining the toxicity of the cryoprotective solutions and the effectiveness of vitrification of rat COCs, assessed by meiosis resumption and *in vitro* nuclear maturation rates. In the first experiment, we determined meiosis resumption and *in vitro* nuclear maturation rates of COCs exposed to four different equilibrium and cryoprotective solutions. In the second experiment, we assessed meiosis resumption and *in vitro* nuclear maturation rates of COCs vitrified after different exposure periods to the cryoprotective solutions. Based on the results of these experiments, the third experiment was performed with the aim of determining the parthenogenetic development of COCs exposed to the vitrification protocol determined in the previous experiments. All the experiments are represented as a timeline in Figure 1 for better

understanding.

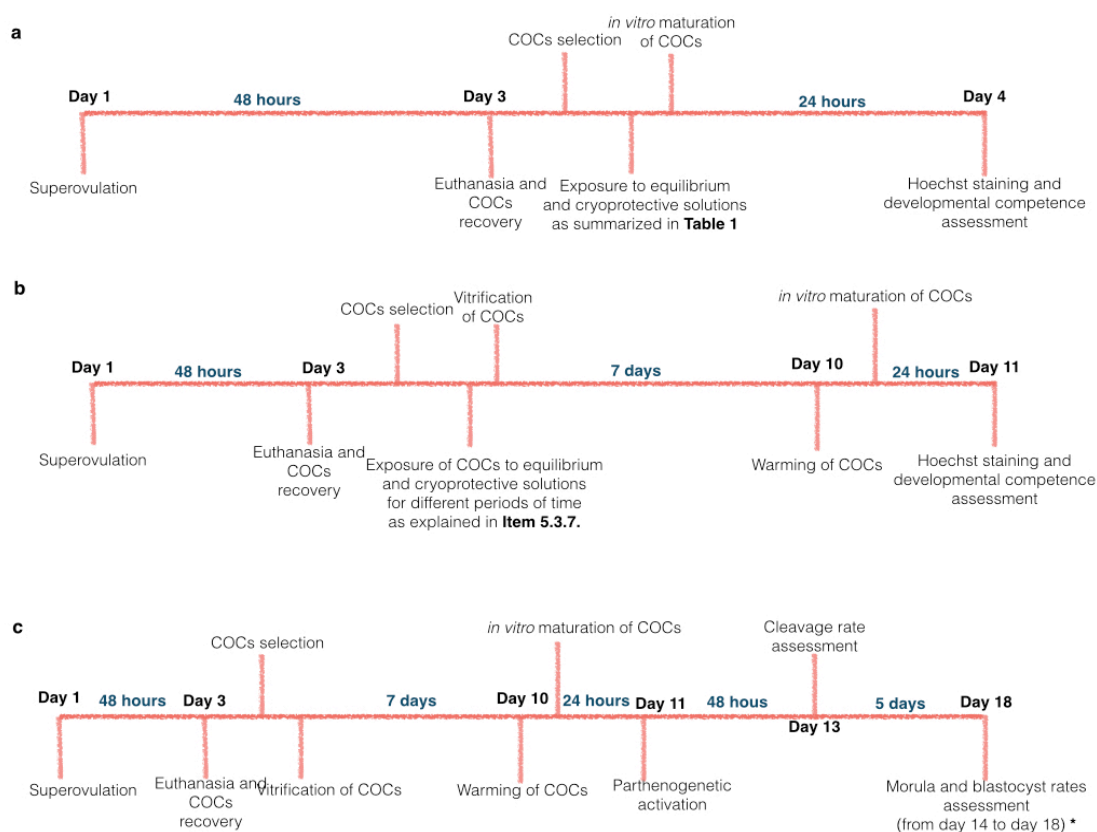


Figure 1. Timeline representing the experimental design applied in the study.

a. The first experiment was performed with the aim of determining the effects of COCs exposure to different cryoprotective solutions on their ability to resume meiosis and achieve nuclear maturation. **b.** After determining the less toxic cryoprotective solution in the first experiment, a second experiment was performed with the aim of determining an exposure period to the cryoprotective solution which would allow the higher meiosis resumption and nuclear maturation rates after vitrification, warming and *in vitro* maturation. **c.** After determining a suitable exposure period to cryoprotective solution, a final experiment was performed with the aim of evaluating the COCs ability to pursue parthenogenetic activation and embryo development after vitrification with the conditions determined in the two previous experiments.

* From day 14 to day 18, embryos were observed everyday to analyse the development of morulae and blastocysts.

The materials used in the experiments and a detailed description of the methodologies applied are described in Item 5.3.

5.3.4 Cumulus-Oocyte Complex Recovery

Thirty to forty days old female rats were treated with intraperitoneal injection of 20 IU eCG (Folligon, Intervet, Boxmeer, Netherlands) and after 48 hours, they were sacrificed by cervical displacement.

Immediately after the sacrifice, the ovaries were removed from the abdominal cavity and maintained at 37°C in modified PBS supplemented with 1% (v/v) FBS upon ovarian slicing. Ovaries were transferred to a plastic

Petri dish containing mPBS and their cortexes were sliced using a scalpel blade to release the COCs into the medium.

After this procedure, the dish containing the COCs was analyzed under stereomicroscope (Meiji EMZ 13TR, Meiji Techno Co, Saitama, Japan) for further morphological selection. COCs containing compact *cumulus* cells and homogeneous ooplasm were selected, as described by Alcoba et al. (2013)[26] and placed in a dish containing manipulation medium M2.

5.3.5 Analysis of Exposure to Different Equilibrium and Cryoprotective Solutions

After selection, COCs were randomly divided in five groups of 10 to 15 COCs. Groups 1 to 4 were exposed to different equilibrium solutions for 4 minutes and cryoprotective solutions for 1 minute, and the control group was not exposed to any of the solutions. The distribution of the equilibrium and cryoprotective solutions for each of the experimental groups is summarized in Table 1.

Table 1. Composition of equilibrium and cryoprotective solutions used for the analysis of exposure of rat COCs as mentioned in Item 5.3.5.

Experimental group	Equilibrium solutions	Cryoprotective solutions
Group 1	1.35 M EG* + 0.96 M DMSO**	2.7 M EG + 1.92 M DMSO + 0.5 M sucrose + 0.025 M HA***
Group 2	1.35 M EG + 0.96 M DMSO	3.6 M EG + 1.28 M DMSO + 0.5 M sucrose + 0.025 M HA
Group 3	1.8 M EG + 0.64 M DMSO	4.5 M EG + 0.64 M DMSO + 0.5 M sucrose + 0.025 M HA
Group 4	2.7M EG	5.4 M EG + 0.5 M sucrose + 0.025 M HA
Control	Not exposed	Not exposed

* EG: ethylene glycol

** DMSO: dimethyl sulfoxide

*** HA: hyaluronic acid (extracted from *Streptococcus equi*)

After exposure, the COCs were washed 3 times in M2 medium and *in vitro* maturation was performed, as described in section 5.3.6.

5.3.6 *In vitro* Maturation and Developmental Competence Assessment

After washing, the COCs were transferred to *in vitro* maturation dishes containing 100 μ L maturation medium - M16 supplemented with 10% FBS, 0.1 IU LH and 5 μ g/mL FSH, covered by mineral oil. Ten to fifteen COCs were placed in each microdrop and the dishes were maintained in an incubator with 5% CO₂ atmosphere, 100% humidity and 37°C for 30 hours. At the end of maturation period, COCs were placed in a microdrop containing 100 μ L M2 supplemented with 0.1% hyaluronidase and incubated for 5 minutes to detach and remove cumulus cells. Cumulus cells were completely removed by gentle pipetting, using an elongated glass capillary.

Hoechst staining was performed by placing the oocytes for 3 minutes into a 100 μ L microdrop containing M2 supplemented with 5.0 μ g/mL Hoechst

33342. After incubation, the oocytes were observed in an inverted fluorescence microscope (Olympus IX-51-I, Olympus Co., Tokyo, Japan), in a dark room, to assess the disposal of genetic material. We considered as presenting nuclear maturation, the oocytes that showed, at least, extrusion of the first polar body and meiosis resumption was considered when the oocyte presented germinal vesicle breakdown, metaphase plate, polar body or both [26], as seen in Figure 2.

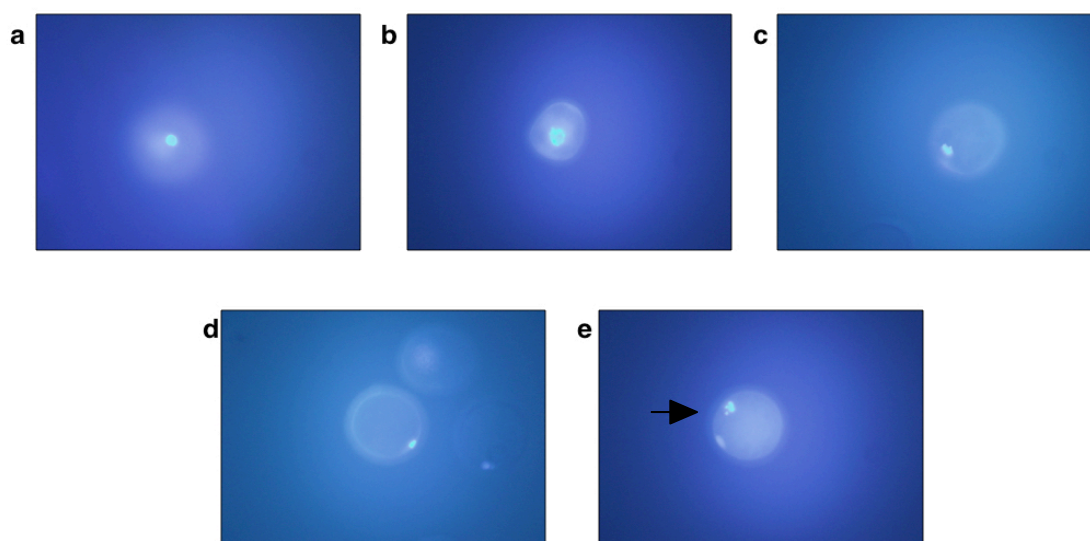


Figure 2. Images of *Rattus norvegicus* oocytes stained with Hoechst 33342 (as seen in blue) for meiosis resumption and nuclear maturation assessment under fluorescence microscope after *in vitro* maturation.

a. Oocyte presenting an intact germinal vesicle, as seen by the blue circle in the center of the oocyte, indicating that this oocyte failed to resume meiosis. x100 **b.** Oocyte with an initiated meiosis resumption, as seen by the germinal vesicle breakdown, located in the center of the oocyte in blue staining. x100 **c.** Oocyte presenting a metaphase I plate located at the peripheric portion of the oocyte. x100 **d.** Oocyte presenting an extruded first polar body, indicating that the oocyte has reached the final stages of nuclear maturation. x100 **e.** Oocyte presenting an extruded first polar body, as seen by the blue circle close to the zona pellucida, and a metaphase II plate as indicated by the black arrow. x100

5.3.7 Analysis of Different Exposure Periods to Equilibrium and Cryoprotective Solutions before Vitrification

Based on the results of the previous experiment, the equilibrium and cryoprotective solutions used to vitrify the COCs in this experiment were those correspondent to G4 in the previous experiment: equilibrium solution composed of 2.7 M EG and cryoprotective solution composed of 5.4 M EG + 0.5 M sucrose + 0.025 M HA diluted in mPBS. *Cumulus*-Oocyte Complexes were randomly divided in four groups of 10 to 15 and COCs from G1 to G3 were exposed to the equilibrium solution for 4 minutes and to the

cryoprotective solution for different periods of time, according to the groups: G1 - 30 seconds; G2 - 60 seconds; and G3 - 90 seconds. After exposure, the COCs were vitrified as described in the next section. The control group was not exposed to the solutions and to vitrification.

5.3.8 Vitrification and Warming

After exposure to cryoprotective solutions, the COCs were held by capillarity in the tip of a straw with reduced diameter like an Open Pulled Straw (OPS) and immediately plunged directly into liquid nitrogen. Five to ten COCs were stored per straw, which were kept in the liquid nitrogen container for 7 days before warming. To produce the OPS, 0.25 mL straws were elongated using a warmed platform. The straws were warmed and pulled manually until the internal diameter and the thickness of the central wall decreased to half the size, so the diameter decreased from 1.7 mm to approximately 0.8 mm and the thickness decreased from 0.15 mm to approximately 0.07 mm [27].

For warming, the OPS were removed from the liquid nitrogen container, kept in air for 5 seconds and the tip of the OPS capillary was placed in a 400 μ L microdrop containing mPBS supplemented with 0.5 M sucrose, releasing the COCs in the medium. COCs were kept into the medium for 5 minutes before IVM.

The control group was maintained in M2 during vitrification and warming of the COCs so all the groups were placed in maturation medium at the same time.

5.3.9 Parthenogenetic Activation and Embryonic Development Assessment of COCs after Vitrification

Based on the results obtained from the previous experiments, we performed a next experiment in which we vitrified the COCs with the equilibrium and vitrification solutions correspondent to G4 in the first experiment and the time of exposure to vitrification solution correspondent to G2 in the second experiment (60 seconds). *Cumulus*-Oocyte Complexes were randomly divided in two groups of 10 to 15 and COCs from G1 were vitrified as previously described in section 5.3.8. Control group (G2) was maintained

in M2 during vitrification and warming so all the groups were placed in maturation medium at the same time.

Cumulus-Oocyte Complexes were *in vitro* matured as previously described in section 5.3.6. However, in this experiment Hoechst staining was not performed after 30 hours of maturation. Instead, we evaluated developmental competence through parthenogenetic activation.

For parthenogenetic activation, COCs were initially exposed to ionomycin calcium salt 5 μM diluted in M2 medium for 5 minutes in atmospheric temperature. Subsequently, COCs were washed in M2 medium and incubated in 6-(Dimethylamino)purine (6-DMAP) 2 mM diluted in mR1ECM for 4 hours in an incubator with 5% CO_2 atmosphere, 100% humidity and 37°C. After incubation, COCs were washed in M2 medium and placed in 100 μL microdrops of mR1ECM for *in vitro* culture. Cleavage rates were analysed after 48 h of culture and subsequent morula and blastocyst rates were analysed during the next 5 days as shown in Figure 3.

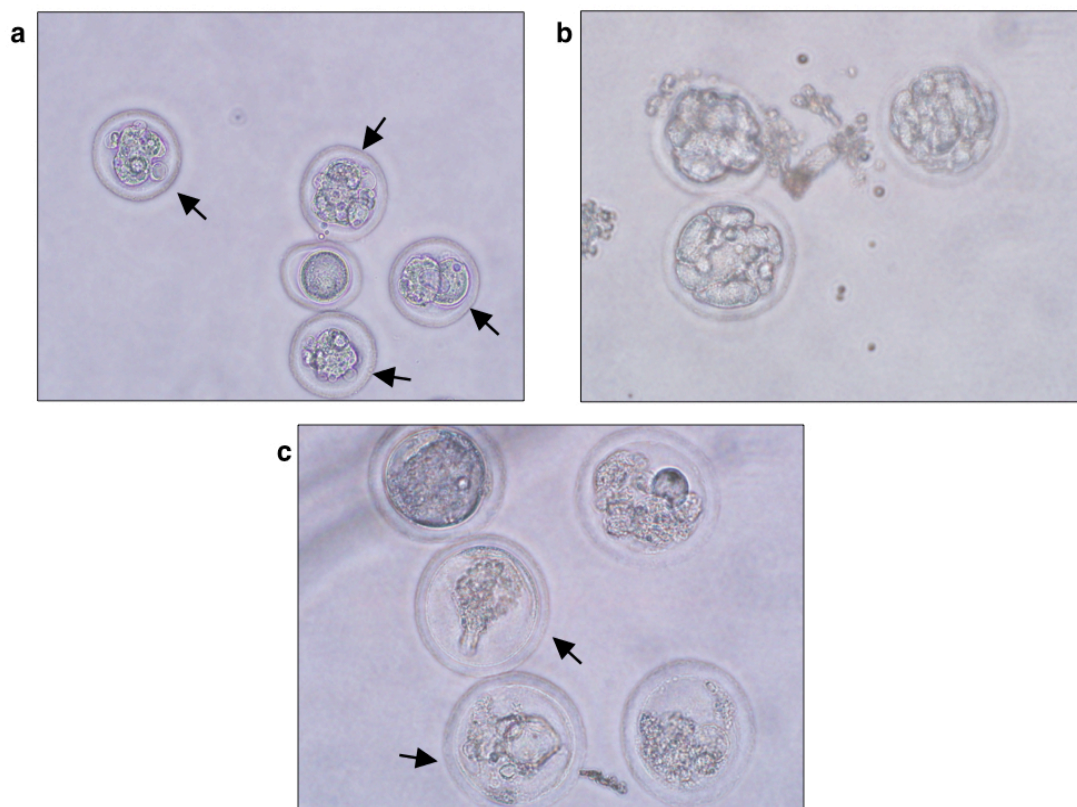


Figure 3. Images of cleavage stage embryos, morulae and blastocysts obtained after parthenogenetic activation of *Rattus norvegicus* COCs. All the observations were made under inverted microscope.

a. Three cleavage stage embryos observed at day 2 after parthenogenetic activation can be seen, as indicated by the black arrows. One oocyte that did not pursue embryo development can also be seen. x40 **b.** Image taken at day 4 after parthenogenetic activation, in which three embryos presenting characteristic cell compactation as seen in morulae stage embryos can be identified. x100 **c.** Image taken at day 5 after parthenogenetic activation, in which two collapsed blastocysts can be seen as indicated by the black arrows. x100

5.3.10 Statistical Analysis

Meiosis resumption and nuclear maturation rates, as well as cleavage, morula and blastocyst rates were analysed using Chi-square (χ^2) test, supplemented by adjusted residual calculation, when statistical differences were observed. The software SPSS Statistics 21.0.0.0 was used to perform the statistical analysis. Differences of $p < 0.05$ were considered significant.

5.4 Results

5.4.1 Analysis of Exposure to Different Equilibrium and Cryoprotective Solutions

A total of 45 animals were used in this step of the study and the experiments were repeated 10 times. The average age of the 45 female rats was 38.5 ± 7.1 days old (mean \pm SD) and a total of 351 COCs were used at the end of this experiment.

Regarding meiosis resumption, the control group presented statistically higher rates compared to the other groups (76.3% - 58/76). Among the groups exposed to equilibrium and cryoprotective solutions, group 1 had statistically lower results compared to the other exposed groups (48.6% - 36/74).

Similarly, the control group had statistically higher nuclear maturation rates compared to the other groups (50% - 38/76). Again, among the groups exposed to equilibrium and cryoprotective solutions, group 1 presented statistically lower nuclear maturation rates compared to the other groups (21.6% - 16/74). Meiosis resumption and nuclear maturation rates are summarized in Table 2.

Table 2. Evaluation of meiosis resumption* (including from GVBD** to metaphase II) and nuclear maturation*** (including from PB**** to metaphase II) after exposure of *Rattus norvegicus* cumulus-oocyte complexes to cryoprotective solutions.

Group	Oocytes	Meiosis Resumption		Nuclear Maturation	
		N	(%)	N	(%)
1	74	36 ^C	48.6	16 ^C	21.6
2	69	45 ^B	65.2	20 ^B	29.0
3	71	41 ^B	57.7	16 ^B	22.5
4	61	35 ^B	57.4	19 ^B	31.1
Control	76	58 ^A	76.3	38 ^A	50.0

* p=0,009

** Germinal Vesicle Breakdown

***p=0,001

****Polar Body

Groups 1, 2, 3 and 4 consist of the COCs exposed to different equilibrium and cryoprotective solutions, as shown in Table 1.

Control group was not exposed to any of the solutions.

N = number of oocytes

Letters A, B and C indicate statistically significant differences among the groups.

5.4.1 Analysis of Different Exposure Periods to Equilibrium and Cryoprotective Solutions before Vitrification

A total of 53 animals were used in this step of the study and the experiments were repeated 13 times. The average age of the 53 female rats was 41.2 ± 6.6 (mean \pm SD) days old and a total of 430 COCs were used at the end of this experiment.

Regarding meiosis resumption, the control group presented statistically higher rates compared to the other groups (79.6% - 90/113). There were no statistically different meiosis resumption rates among the groups exposed to vitrification.

Similarly, the control group had statistically higher nuclear maturation rates compared to the other groups (36.3% - 41/113). Again, there were no statistically different nuclear maturation rates among the groups exposed to vitrification. Meiosis resumption and nuclear maturation rates are summarized in Table 3.

Table 3. Evaluation of meiosis resumption* (including from GVBD** to metaphase II) and nuclear maturation*** (including from PB**** to metaphase II) after different exposure periods to cryoprotective solutions and subsequent vitrification of *Rattus norvegicus* cumulus-oocyte complexes.

Group	Oocytes	Meiosis Resumption		Nuclear Maturation	
		N	(%)	N	(%)
1	98	14 ^B	10.4	4 ^B	4.1
2	118	21 ^B	15.6	7 ^B	5.9
3	101	10 ^B	7.4	2 ^B	2.0
Control	113	90 ^A	79.6	41 ^A	36.3

* p < 0.0001

** Germinal Vesicle Breakdown

*** p < 0.0001

**** Polar Body

Group 1 = COCs exposed to equilibrium and cryoprotective solutions for 30 seconds before vitrification

Group 2 = COCs exposed to equilibrium and cryoprotective solutions for 60 seconds before vitrification

Group 3 = COCs exposed to equilibrium and cryoprotective solutions for 90 seconds before vitrification

Control group was not exposed to any of the solutions.

N = number of oocytes

Letters A and B indicate statistically significant differences among the groups.

5.4.1 Parthenogenetic Activation and Embryonic Development Assessment of COCs after Vitrification

A total of 13 animals were used in this step of the study and the experiments were repeated 3 times. The average age of the animals was 40,1 ± 12,2 days old, and a total of 104 COCs were used in this experiment.

Cleavage rates were statistically higher in the control group (65.3% - 32/49) in comparison with the vitrified group (14.5% - 8/55). Similarly, morula rates were statistically higher in the control group (38.8% - 19/49) than in the vitrified group (1.8% - 1/55). However, we did not find any differences regarding blastocysts rate between the control group (4.1% - 2/49) and the vitrified group (1.8% - 1/55). Data regarding embryo development of the control and vitrified groups are summarized in Table 4.

Table 4. Evaluation of parthenogenetic activation and embryo development (first cleavage*, morula** and blastocyst***) after vitrification of *Rattus norvegicus* cumulus-oocyte complexes.

Group	Oocytes	Cleavage		Morula		Blastocysts	
		N	(%)	N	(%)	N	(%)
Vitrified	55	8 ^B	14.5	1 ^B	1.8	1	1.8
Control	49	32 ^A	65.3	19 ^A	38.8	2	4.1

* p<0.0001

** p<0.0001

*** p = 0.491

The vitrified group is consisted of COCs exposed to an equilibrium solution composed of 2.7M ethylene glycol (EG) for 4 minutes and to a cryoprotective solution composed of 5.4M EG + 0.5 sucrose + 0.025M hyaluronic acid for 60 seconds before vitrification.

The control group was not exposed to the vitrification process.

N = number of embryos

Letters A and B indicate statistically significant differences between vitrified and control groups.

5.5 Discussion

The aim of this study was to determine adequate vitrification conditions to cryopreseve rat COCs. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate cryopreservation conditions such as exposure time and concentration of cryoprotective agents for the vitrification of *Rattus norvegicus* immature COCs. In fact, there are very few reports regarding rat oocyte cryopreservation and this reflects the importance of our study, which provides cryobiological data about this specie.

Our first experiment aimed to evaluate if the exposure of immature rat COCs to different equilibrium and cryoprotective solutions influenced their ability to resume meiosis, as well as to achieve nuclear maturation. We were not surprised to observe that the control group presented statistically higher meiosis resumption and nuclear maturation rates, compared to the groups exposed to equilibrium and cryoprotective solutions. This is an expected result since it has been shown that simple exposure of COCs to moderate concentrations of cryoprotective agents may impair their maturation ability [28].

Yamada *et al.*, (2007) [28] exposed bovine immature COCs to cryoprotective solutions prepared with different combinations of EG, DMSO and glycerol for 30 or 60 seconds and evaluated maturation rates compared to a control group, not exposed to the solutions. The control group achieved maturation rates up to 81.3% whereas some of the exposed groups presented maturation rates as low as 54.3%. The decrease in oocyte maturation after exposure to cryoprotective solutions found by the authors is consistent with our results, indicating that adverse effects occur when oocytes are exposed to cryoprotective agents.

It has been suggested that the toxicity of cryoprotective agents is the most limiting factor for the development of successful cryopreservation protocols, especially vitrification protocols, which require high concentrations of cryoprotective agents in order to achieve the vitreous state [29]. Recent studies on toxicity of cryoprotective agents have not yielded consistent results yet, but it is well known that several adverse effects such as depolymerization/disruption of the cytoskeleton and spindle microtubules [30, 31], premature exocytosis of cortical granules [32], zona hardening [32], parthenogenetic activation [33, 34] and aneuploidy/polyploidy [31, 35] are correlated to oocyte exposure to cryoprotectants as well as to the vitrification process. Thus far, there is no consensus regarding the level of toxicity of each cryoprotectant [36]. There are discrepancies in the results when evaluating the level of toxicity of each cryoprotectant and this might be due to variations in experimental protocols, cell types and species [36].

In this context, the results of our first experiment show that, within the groups exposed to equilibrium and cryoprotective solutions, G1 presented statistically lower meiosis resumption and nuclear maturation rates. The main difference between this group and the others is the concentration of DMSO in the equilibrium and cryoprotective solutions. The concentration of DMSO in G1 was the highest among all the groups - 0.96M (7.5%) in the equilibrium solution and 1.92M (15%) in the cryoprotective solution. With this in mind, it is possible that the main cause for the decreased meiosis resumption and nuclear maturation rates in this group is the excessively high concentration of DMSO.

It has been shown that DMSO has deleterious effects in asymmetric division and other factors essential for oocyte meiosis resumption and nuclear maturation [37]. Zhou *et al.* (2014) [37] exposed immature mouse oocytes to increasing concentrations of DMSO and evaluated its effects on asymmetric division, spindle formation, chromosome congression and actin cap formation. The authors found that, although exposure to low concentrations of DMSO ($\leq 0.5\%$) did not cause deleterious effects, exposure of oocytes to concentrations ranging from 2-4% DMSO caused perturbations in actin distribution, as well as disruption of spindle migration, asymmetric division and cytokinesis completion [37]. Moreover, the authors demonstrated that actin polymerization was disrupted by exposure to 1-4% DMSO [37]. These results indicate that the exposure of mouse oocytes to moderate and high concentrations of DMSO have impaired their ability to achieve maturation by influencing in determining events, such as asymmetric division, spindle formation, chromosome congression and actin polymerization [37]. These findings are consistent with our results from the first experiment and may be an explanation for the low meiosis resumption and nuclear maturation rates obtained in our first experiment, considering that this group was exposed to the highest concentration of DMSO.

Subsequently, we evaluated the ability of COCs to resume meiosis and to achieve nuclear maturation after vitrification under different exposure periods. For this second experiment, we used the equilibrium and cryoprotective solutions correspondent to G4 in the first experiment. At this point, we evaluated different exposure periods to cryoprotective solutions - 30, 60 and 90 seconds - with subsequent vitrification and further evaluation of meiosis resumption and nuclear maturation after warming and IVM. The results demonstrate that, again, the control group presented higher meiosis resumption and nuclear maturation rates, which is consistent with the previous experiment. However, among the groups exposed to vitrification, we did not observe statistically significant differences.

Wang *et al.* (2011) [13] exposed mouse oocytes to equilibrium and vitrification solution for several exposure durations, followed by vitrification, and evaluated their ability to achieve further development to blastocyst. The authors observed that, generally, there was a decrease in blastocyst rates as

the durations increase [13]. However, these results were more clearly observed when the exposure durations were too short or too long; for instance, 20 seconds or 180 seconds exposure, in which the blastocyst rates achieved percentages as low as 18.2%, while intermediate exposure durations, ranging from 50 to 90 seconds, did not cause such expressive decrease in blastocyst rates [13]. With this in mind, it is possible that the reason why our results did not provide any statistical differences is because the exposure durations we tested were narrowly restricted to a range of 30 to 90 seconds. Perhaps, with longer or shorter exposure durations, the results would have been more expressive. Also, due to the fact that our evaluation was limited to meiosis resumption and nuclear maturation rates, it is possible that the effects would be more clearly observed if embryo development was followed.

Our last experiment aimed to evaluate parthenogenetic activation and further development to blastocyst after vitrification of immature COCs. The results show that there were significant differences between the control group and the vitrified group regarding cleavage and morula rates. However, the rate of blastocyst did not differ between the two groups. This may be due to the fact that the oocytes still had to undergo *in vitro* maturation after warming, which might have influenced their ability to achieve more advanced stages of embryo development.

Similarly to our results, Imesch *et al.* (2013) [38] observed low parthenogenetic activation after vitrification of *in vitro* matured human oocytes. The authors obtained a rate of 12.7% of early stage embryos (4- to 6-cells embryos) and only 1.6% of blastocyst after vitrification. These results indicate that embryo development can be severely impaired by the vitrification process, and this is probably related to injuries and alterations caused to meiotic progression [39].

It has been suggested that the whole process of vitrification - including exposure to cryoprotectants and low temperatures - may cause a loss of coordination between nuclear and cytoplasmatic maturation [40]. For instance, it has been suggested that premature activation of CDK1 occurs when rat immature oocytes are vitrified, and this event may lead to precocious entry into M-phase of cell cycle, which in turn may result in an inappropriate

chromosome condensation [41, 42]. Moreover, many microtubule-dependent processes that take place during meiotic progression would likely be impaired due to vitrification, resulting in alterations in the positioning of mitochondria [43], endoplasmic reticulum [44] and acidic organelles [45]. All these alterations in important components required for nuclear and cytoplasmic maturation indicate that undesirable effects occur due to the vitrification process and these effects may not be evident until after fertilization and subsequent embryo development [42].

Moreover, during our experiments, we also observed that after warming, many oocytes lost their surrounding cumulus cells and this might also have influenced the oocytes ability to resume meiosis and achieve further embryo development. It is well known that the communication between the cumulus cells and the oocyte through gap junctions is important for maturation, fertilization and subsequent embryo development [46, 47]. For this reason, the impairment of cell contact between the oocyte and cumulus is likely to impact the maintenance of cell communication, as well as important paracrine activity, and to disturb biophysical properties of the oocytes cortex, leading to decreased ability of the cortex to store and immobilize factors important for later development [42, 48-51].

5.6 Conclusion

Our results show that the use of EG alone as a cryoprotective agent provided significantly better meiosis resumption and nuclear maturation rates compared to the other solutions. Moreover, there were no significant differences regarding times of exposure to cryoprotective solution, although this may be due to a limited range of time that we applied for the experiment.

Also, we demonstrated that although embryo development was significantly lower in the vitrified group compared to the control group, we were able to obtain considerable cleavage and morula rates in the vitrified group, indicating that the conditions applied in our experiments for vitrification of rat COCs allowed subsequent embryo development to a certain extent.

More research is required in order to provide more reliable conditions for vitrification of rat oocytes. However, our data provides new insights regarding the effects of different concentrations of cryoprotectants, as well as

exposure times in rat oocyte maturation and embryo development after vitrification.

5.7 Declaration of Conflicting Interests

The authors declare that there were no conflicting interests regarding the execution of this research and the presentation of the data.

5.8 References

- [1] Spricigo JF, Morais K, Ferreira AR, Machado GM, Gomes AC, Rumpf R, et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: Assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*. 2014 Oct;69(2):256-65.
- [2] Zhang Z, Liu Y, Xing Q, Zhou P, Cao Y. Cryopreservation of human failed-matured oocytes followed by in vitro maturation: vitrification is superior to the slow freezing method. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:156.
- [3] Suo L, Zhou GB, Meng QG, Yan CL, Fan ZQ, Zhao XM, et al. OPS vitrification of mouse immature oocytes before or after meiosis: the effect on cumulus cells maintenance and subsequent development. *Zygote*. 2009 Feb;17(1):71-7.
- [4] Khosravi-Farsani S, Sobhani A, Amidi F, Mahmoudi R. Mouse oocyte vitrification: the effects of two methods on maturing germinal vesicle breakdown oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2010 May;27(5):233-8.
- [5] Diez C, Munoz M, Caamano JN, Gomez E. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reprod Domest Anim*. 2012 Jun;47 Suppl 3:76-83.
- [6] Mazur P, Leibo SP, Seidel GE, Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod*. 2008 Jan;78(1):2-12.
- [7] Hedrich HD. History, Strains and Models. In: Krinke GJ, editor. *The Laboratory Rat*. San Diego: Academic Press; 2000. p. 3-16.
- [8] Downs SM. Mouse versus rat: Profound differences in meiotic regulation at the level of the isolated oocyte. *Mol Reprod Dev*. 2011 Oct-Nov;78(10-11):778-94.
- [9] Boja ES, Hoodbhoy T, Garfield M, Fales HM. Structural conservation of mouse and rat zona pellucida glycoproteins. Probing the native rat zona pellucida proteome by mass spectrometry. *Biochemistry*. 2005 Dec 20;44(50):16445-60.

- [10] Sotelo JR, Porter KR. An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol.* 1959 Mar 25;5(2):327-42.
- [11] Weakley BS. Comparison of cytoplasmic lamellae and membranous elements in the oocytes of five mammalian species. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;85(1):109-23.
- [12] Zeilmaker GH, Verhamme CM. Observations on rat oocyte maturation in vitro: morphology and energy requirements. *Biol Reprod.* 1974 Sep;11(2):145-52.
- [13] Wang L, Liu J, Zhou GB, Hou YP, Li JJ, Zhu SE. Quantitative investigations on the effects of exposure durations to the combined cryoprotective agents on mouse oocyte vitrification procedures. *Biol Reprod.* 2011 Nov;85(5):884-94.
- [14] Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. *J Reprod Dev.* 2010 Feb;56(1):169-75.
- [15] Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril.* 2001 Apr;75(4):769-77.
- [16] Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil.* 1993 Nov;99(2):471-7.
- [17] Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 1993 Nov;99(2):353-8.
- [18] Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jul;48(7):1905-12.
- [19] Martino A, Pollard JW, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 1996 Dec;45(4):503-12.
- [20] Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology.* 1997 Nov;35(3):219-29.
- [21] Songsasen N, Buckrell BC, Plante C, Leibo SP. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology.* 1995 Feb;32(1):78-91.
- [22] Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 2000 Aug;63(2):513-8.

- [23] Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl.* 1971 Jun;14:7-21.
- [24] Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1982 Sep;66(1):161-8.
- [25] Miyoshi K, Abeydeera LR, Okuda K, Niwa K. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. *J Reprod Fertil.* 1995 Jan;103(1):27-32.
- [26] Alcoba DD, da Rosa Braga BL, Sandi-Monroy NL, Proenca LA, Felix Lopes RF, de Oliveira AT. Selection of *Rattus norvegicus* oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. *Zygote.* 2013 Aug;21(3):238-45.
- [27] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998 Sep;51(1):53-8.
- [28] Yamada C, Caetano HV, Simoes R, Nicacio AC, Feitosa WB, Assumpcao ME, et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. *Anim Reprod Sci.* 2007 Jun;99(3-4):384-8.
- [29] Fahy GM. Cryoprotectant toxicity - Biochemical or osmotic? *Cryo Letters.* 1984;5:79-90.
- [30] Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1992;14:73-100.
- [31] Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril.* 1998 May;69(5):944-57.
- [32] Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil.* 1990 Nov;90(2):547-53.
- [33] Shaw JM, Trounson AO. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2-propanediol is influenced by temperature, oocyte age, and cumulus removal. *Gamete Res.* 1989 Nov;24(3):269-79.
- [34] Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology.* 1992 Oct;29(5):549-62.
- [35] Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod.* 1987 Nov;2(8):695-700.

- [36] Szurek EA, Eroglu A. Comparison and avoidance of toxicity of penetrating cryoprotectants. *PLoS One*. 2011;6(11):e27604.
- [37] Zhou D, Shen X, Gu Y, Zhang N, Li T, Wu X, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *BMC Dev Biol*. 2014;14:28.
- [38] Imesch P, Scheiner D, Xie M, Fink D, Macas E, Dubey R, et al. Developmental potential of human oocytes matured in vitro followed by vitrification and activation. *J Ovarian Res*. 2013;6:30.
- [39] Kim HS, Jeong YI, Lee JY, Jeong YW, Hossein MS, Hyun HS, et al. Effects of recombinant relaxin on in vitro maturation of porcine oocytes. *J Vet Med Sci*. 2010 Mar;72(3):333-7.
- [40] Van Blerkom J. Maturation at high frequency of germinal-vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation: alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Hum Reprod*. 1989;4(8):883-98.
- [41] Wickramasinghe D, Albertini DF. Cell cycle control during mammalian oogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 1993;28:125-53.
- [42] Kim SS, Olsen R, Kim DD, Albertini DF. The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Jun;31(6):739-47.
- [43] Van Blerkom J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jun 1;88(11):5031-5.
- [44] FitzHarris G, Marangos P, Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol*. 2007 May 1;305(1):133-44.
- [45] Albertini DF. Cytoplasmic reorganization during the resumption of meiosis in cultured preovulatory rat oocytes. *Dev Biol*. 1987 Mar;120(1):121-31.
- [46] Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during in vitro maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol Reprod*. 2004 Mar;70(3):548-56.
- [47] Navarro-Costa P, Correia SC, Gouveia-Oliveira A, Negreiro F, Jorge S, Cidado AJ, et al. Effects of mouse ovarian tissue cryopreservation on granulosa cell-oocyte interaction. *Hum Reprod*. 2005 Jun;20(6):1607-14.
- [48] Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human

oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod*. 1997 Dec;3(12):1067-86.

[49] Godard NM, Pukazhenthil BS, Wildt DE, Comizzoli P. Paracrine factors from cumulus-enclosed oocytes ensure the successful maturation and fertilization in vitro of denuded oocytes in the cat model. *Fertil Steril*. 2009 May;91(5 Suppl):2051-60.

[50] Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008 Mar-Apr;14(2):159-77.

[51] Albertini DF, Barrett SL. Oocyte-somatic cell communication. *Reprod Suppl*. 2003;61:49-54.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos experimentos mostraram que a exposição de CCOs imaturos de *Rattus norvegicus* à solução de equilíbrio composta por 1,35 M de EG + 0,96 M de DMSO, com subsequente exposição à solução crioprotetora composta por 2,7 M de EG + 1,92 M de DMSO + 0,5 M de sacarose + 0,025 M de ácido hialurônico proporcionaram menores taxas de retomada de meiose e maturação nuclear quando comparado aos outros grupos expostos. Essa diminuída capacidade de maturação pode ter ocorrido devido às altas concentrações de DMSO presentes em ambas as soluções, pois estas soluções continham as maiores concentrações de DMSO dentre os grupos expostos. Além disso, não houve diferença estatística quanto ao tempo de exposição à solução crioprotetora. Além disso, foram observadas diferenças estatísticas em relação às taxas de clivagem e mórula entre os grupos vitrificado e controle, entretanto as taxas de blastocisto não diferiram entre os dois grupos.

De maneira geral, foi observado que o grupo controle (não exposto às condições e soluções crioprotetoras) apresentou taxas de retomada de meiose e maturação nuclear maiores, bem como de clivagem e mórula em relação aos grupos expostos. Isso mostra que as condições de vitrificação ainda não são ideais e, por esse motivo, mais experimentos precisam ser realizados para que se testem condições mais adequadas de criopreservação para os CCOs. Entretanto, os resultados obtidos neste experimento proporcionam dados inéditos referentes a condições de exposição e a toxicidade dos crioprotetores em CCOs de *Rattus norvegicus*, auxiliando para o desenvolvimento de uma tecnologia mais eficaz para criopreservação do material biológico desta espécie.

7 REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA *THERIOGENOLOGY*

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further

information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the

article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2,500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun

2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life

- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

AI	ANOVA	ADP	ATP	BSA
cAMP	CL	DEAE-cellulose	DMSO	DNA
eCG	EDTA	EGF	ELISA	FSH
GH	GnRH	hCG	HEPE	ShMG
IVC	IVF	IVM	LH	MOET
MSH	mRNA	NAD	NADH	PBS
PGF2 α	PGFM	PIPES	PRID	PRL
RIA	RNA	SDS-PAGE	SCNT	TRH
TRIS	tRNA	TSH		

Units of Measure

cpm - counts per min
 dpm - disintegrations per min
 g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h - hour
 kg - kilogram
 L - liter
 mL - milliliter
 μ L - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id - intradermal
 im - intramuscular
 iu - intrauterine
 iv - intravenous
 sc - subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation
 df - degrees of freedom
 F - variance ratio
 NS - not significant
 P - probability
 SD - standard deviation
 SEM - standard error of the mean
 r - correlation coefficient
 r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition*.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop

(<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple

articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

8 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº:

2) DATA DO PARECER: 08/06/2013

3) TÍTULO DO PROJETO:

Vitrificação de Complexos Cumulus-Oócitos Imaturos de *Rattus norvegicus*

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

5) RESUMO DO PROJETO:

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Determinar um protocolo de vitrificação que permita a manipulação da viabilidade dos CCOs criopreservados

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

mestrado

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Ver comentário abaixo.

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Abril / junho	Ratos	M	15
Abril a Junho	Ratos	F	60

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Comentários gerais sobre o projeto:

O projeto acima mencionado encontra-se dentro dos critérios estabelecidos por este Comitê.



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA UFCSPA

A Comissão de Ética no uso de Animais, analisou o Projeto:

Projeto: 13-108

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA

RUI FERNANDO FELIX LOPES

LIA MARA GOMES PAIM

Título: VITRIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS DE RATTUS NORVEGICUS

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Todo e qualquer alteração do projeto, assim com eventos adversos graves, deverão ser comunicados a esta CEUA.

Porto Alegre, 13 de junho de 2013.


Katya V. Rigatto
Coordenadora do CEUA
UFCSPA