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

Iáskara Vieira de Oliveira

Vitrificação de Complexos *Cumulus*-Oócito imaturos de *Rattus norvegicus* selecionados por Azul Cresil Brilhante

Porto Alegre
2017

Iáskara Vieira de Oliveira

Vitrificação de Complexos *Cumulus*-Oócito imaturos de *Rattus norvegicus* selecionados por Azul Cresil Brilhante

Dissertação de Mestrado submetida 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 grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Porto Alegre
2017

Catalogação na Publicação

Oliveira, Iáskara Vieira de
Vitrificação de complexos cumulus-oócito de rattus norvegicus selecionados por azul cresil brilhante / Iáskara Vieira de Oliveira. -- 2017.
81 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Orientador(a): Alexandre Tavares Duarte de Oliveira.

1. Vitrificação. 2. Azul Cresil Brilhante. 3. Complexo Cumulus-oócito. 4. Embriões. 5. Ratos. I. Título.

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

AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIAS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Professor Alexandre Tavares Duarte de Oliveira, pelos ensinamentos, dedicação, orientação, exemplo e paciência em todos os momentos.

Aos meus pais, Luiz Ilon e Rosângela, por todo apoio, ajuda e amor incondicional. Sempre me incentivando a me aperfeiçoar e melhorar.

Ao meu irmão Vinícius, pela ajuda, caronas e risadas sempre.

A minha avó Adiles, por todo carinho, apoio e preocupação.

As minhas colegas, amigas, Joana e Juliana, por toda ajuda e disposição no laboratório e fora dele, esse trabalho também é de vocês, sem vocês eu não conseguiria.

Aos meus amigos e família pela paciência e apoio nos momentos em que não pude me fazer presente.

Ao meu avô Lúcio, que partiu antes de eu conseguir terminar esse trabalho, principal incentivador de todos os netos para que sempre estudassem e aperfeiçoassem, por todo carinho e apoio. Esse trabalho é dedicado a ele.

Ao Theo, meu amor canino, pelo companheirismo e amor incondicional.

E por fim, aos animais utilizados, protagonistas deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

Uma das principais causas da baixa viabilidade de oócitos de ratos após a criopreservação é a seleção inadequada de gametas através de critérios morfológicos. O desenvolvimento e a validação de novos métodos de seleção de CCOs associados a criopreservação almejam identificar os gametas competentes propiciando resultados de fecundação e desenvolvimento embrionário semelhantes aos obtidos *in vivo*. O objetivo desse trabalho foi determinar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário após a ativação partenogenética de CCOs selecionados por diferentes concentrações de BCB e criopreservação. Fêmeas pré-puberes Wistar foram superovuladas com 20 UI de eCG intra peritonial (IP) e submetidas a eutanásia após 48 horas. Os ovários foram retirados da cavidade abdominal e mantidos em PBSm a 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, CCOs foram selecionados morfologicamente e incubados, em grupos, por 1 h em meio M16 (sem vermelho fenol) contendo BCB, com diferentes concentrações (13 µM, 16 µM e 20 µM) baseadas em Alcoba *et al*. (2013) (ALCOBA, DD *et al*. Selection of Rattus norvegicus oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. Zygote, v. 21, p. 238-245, 2013). Após 30 hs de maturação *in vitro* (MIV), foi realizada a ativação partenogenética com posterior acompanhamento do desenvolvimento embrionário *in vitro.* O grupo controle não foi exposto ao corante BCB. Baseado no melhor resultado da primeira etapa, o segundo experimento foi realizado com a seleção de CCOs pela morfologia e na sequência com a incubação em meio com 13 µM de BCB. A eficácia da seleção somada ao efeito da vitrificação dos CCOs foi avaliada pelo desenvolvimento embrionário *in vitro* após a ativação partenogenética. Os CCOs foram divididos em 4 grupos: BCB (+), BCB (-) , controle I (onde os CCOs foram selecionados morfologicamente, imediatamente maturados *in vitro,* ativados partenogeneticamente e mantidos *in vitro* para o desenvolvimento embrionário, sem vitrificação prévia) e controle II (onde os CCOs foram selecionados morfologicamente, vitrificados, maturados *in vitro* com avaliação do desenvolvimento embrionário in vitro após a ativação partenogenética). Após sete dias vitrificados, os CCOs foram reaquecidos, submetidos a MIV e a ativação partenogenética. Taxas de clivagem, mórula e blastocisto foram observadas durante 5 dias. No primeiro experimento, o grupo BCB 13 µM apresentou taxa de clivagem (41,98% - 55/131) similar aos grupos BCB 16 µM (49,55% - 55/111), controle (47,22% - 51/108) e BCB 20 µM (36,70% - 40/109). Por outro lado, apresentou níveis superiores estatisticamente de desenvolvimento embrionário do estádio de clivagem a mórula (65,45% - 36/55) quando comparado aos demais grupos. No segundo experimento, as taxas de clivagem (47,05% - 72/153) e mórula (33,55% - 51/153) do grupo controle não vitrificado foram superiores aos demais grupos. Entretanto, quando se compara as taxas de desenvolvimento de mórula a partir dos clivados entre os grupos

controle vitrificado e BCB (+), este último apresenta resultados estatisticamente melhores (19,23% - 5/26 e 64,7% - 11/17, respectivamente). Os resultados obtidos em nossos experimentos indicam que o teste BCB pode selecionar os gametas mais aptos a processos de manipulação *in vitro*, como a vitrificação, a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário. Entretanto, em virtude da complexidade dos eventos envolvidos, são necessários mais informações para determinar as condições adequadas para a seleção e a vitrificação de CCOs de *Rattus norvegicus.*

Palavras-chave: Vitrificação; Azul Cresil Brilhante; Complexo Cumulus-Oócitos; Embriões, Ratos

ABSTRACT

One of the major reasons of the low viability of rat oocytes after cryopreservation is inadequate selection of gametes using morphologic criteria. The development and validation of new methods to COCs selection associated to cryopreservation will allow identify the competent gametes and to achieve fecundation and embryo developmental results near to generate in vivo. The objective of this study was to determine the cleavage and embryo developmental rates after parthenogenetic activation of COCs selected by different concentrations of BCB and cryopreservation. Female pre-pubertal Wistar rats were superovulated with 20 IU of eCG by intraperitoneal (IP) injection and euthanized after 48 h. Ovaries were removed from the abdominal cavity and maintained in PBSm at 37°C until scarification to release the COCs. Observation and morphological selection of COCs were performed using a stereomicroscope. In the first experiment, COCs were morphologically selected and incubated in groups for 1 h in M16 medium (without phenol red) with increasing of concentrations of BCB (13 μM, 16 μM, and 20 μM) based on previous work of Alcoba *et al*. (2013) (ALCOBA, DD *et al.* Selection of Rattus norvegicus oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. Zygote, v. 21, p. 238-245, 2013). After 30 h, parthenogenetic activation was performed with subsequent monitoring of *in vitro* embryo development. The control group was not exposed to the BCB stain. Based on the best results of the first step, the second experiment was performed with the selection of COCs by morphology and in sequence with incubation in medium with 13 μM BCB. The efficacy of the selection added to the effect of the vitrification of the COCs was evaluated by embryo development *in vitro* after parthenogenetic activation. The COCs were divided into 4 groups: BCB (+), BCB (-), control I (in which COCs were selected morphologically, immediately matured *in vitro*, parthenogenetically activated and maintained *in vitro* for embryonic development without prior vitrification), and control II (in which COCs were selected morphologically, vitrified, matured *in vitro* with evaluation of embryonic development *in vitro* after parthenogenetic activation). After seven days, the COCs were warmed, submitted for *in vitro* maturation (IVM) and parthenogenetic activation. Rates of cleavage, morula and blastocyst development were observed for 5 days. In the first experiment, the 13 μM BCB group presented a cleavage rate (41.98% - 55/131) similar to the 16 μM BCB group (49.55% - 55/111), control (47.22% - 51/108), and 20 μM BCB (36.70% - 40/109). On the other hand, the 13 μM BCB group presented statistically superior levels of embryonic development from the cleavage stage to the morula stage (65.45% - 36/55) when compared to the other groups. In the second experiment, the cleavage rates (47.05% - 72/153) and morula (33.55% - 51/153) of the non-vitrified control group were higher than the other groups. However, when the rates of morula development from the cleavage stage between the control and BCB (+) groups are compared, the latter showed statistically better results (19.23% - 5/26 vs. 64.7% - 11/17, respectively). The results obtained in our experiments indicate that the BCB test can select the gametes most suitable for *in vitro* manipulation processes, such as vitrification, oocyte maturation, and embryonic development. However, due to the complexity of the events involved, further experiments are required to simplify the conditions suitable for selection and vitrification of *Rattus norvegicus* COCs.

Keywords: Vitrification, Brilliant Cresyl Blue, Cumulus-Oocytes Complexes, Embryos; Rats

Sumário

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....10

1.1 Aspectos Reprodutivos de ratos.....10

1.1.1 Ciclo Estral.....10

1.1.2 Desenvolvimento folicular.....11

1.1.3 Superovulação.....13

1.2 O complexo *cumulus-oócito*.....14

1.2.1 Aspectos Morfológicos e Bioquímicos.....14

1.2.2 Maturação Citoplasmática.....17

1.2.3 Maturação Nuclear.....18

1.3 Métodos de seleção oocitária.....20

1.3.1 Seleção Morfológica e outros métodos.....20

1.3.2 Seleção por Azul Cresil Brilhante.....21

1.4 Criopreservação de Complexos Cumulus-oócito.....24

1.4.1 Métodos utilizados.....24

1.4.2 Estágios de maturação.....27

1.5 Métodos de Avaliação da Viabilidade Oocitária.....29

1.5.1 Maturação *in vitro*.....29

1.5.2 Ativação Partenogenética.....31

1.5.3 Desenvolvimento Embrionário *in vitro*.....33

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....38

3 OBJETIVOS.....56

3.1 Gerais.....56

3.2 Específicos.....56

4 SITUAÇÃO DO MANUSCRITO.....57

5 ARTIGO CIENTÍFICO.....58

5.1 Abstract.....59

5.2 Introduction.....60

5.3 Materials and Methods.....63

5.4 Results.....67

5.5 Discussion.....71

5.6 References.....75

6 CONCLUSÃO.....78

ANEXOS.....79

Regras para Submissão da Revista Zygote.....79

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.....82

1 REVISÃO BIBLIOGÁFICA

1.1 Aspectos Reprodutivos de ratos

1.1.1 Ciclo Estral

O ciclo reprodutivo das fêmeas mamíferas, consideradas domésticas e de laboratório, tem por característica a secreção cíclica de gonadotrofinas hipofisárias e de esteróides ovarianos, tendo por finalidade a ovulação, que se define pela liberação do oócito pelo ovário, que se fecundado dará origem a um embrião. Em algumas espécies mamíferas, a ovulação ocorre apenas uma vez por ano, sendo denominados animais monoéstricos. As ratas, por outro lado, apresentam vários ciclos reprodutivos anualmente, sendo classificadas como poliéstricas (Dukes, 1996; Marcondes *et al.*, 2001).

O ciclo reprodutivo das ratas é titulado de ciclo estral e possui duração de, aproximadamente, quatro a cinco dias distribuídos em quatro fases (metaestro, diestro, proestro e estro) que podem ser observadas através da análise citológica da secreção vaginal (Marcondes *et al.*, 2002).

Em ratas, o proestro é caracterizado pelo predomínio de células epiteliais nucleadas encontradas no lúmen vaginal e dura aproximadamente 12 horas. O estro, fase com duração aproximada de 24 horas, corresponde ao período em que a fêmea é receptiva ao macho, havendo o predomínio de células queratinizadas anucleadas irregulares, que podem ser encontradas isoladas ou em grupos. Se não ocorrer a concepção, o estro é seguido pelo metaestro, período que dura entre 24 e 48 horas, caracterizado pela proporção equivalente de células epiteliais, queratinizadas e leucócitos. No diestro, que dura aproximadamente 24 horas, encontram-se predominantemente leucócitos, com algumas células epiteliais e muito muco, sendo o período de reinício da secreção de hormônios foliculares para o próximo ciclo. Durante o proestro, novos folículos recrutados dão continuidade ao seu crescimento e o útero aumenta de volume em preparação a uma possível implantação durante o estro seguinte (Marcondes *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2007)

Após a cópula as fêmeas apresentam o tampão na vagina que se forma 3 a 8 horas após o ato e pode permanecer no local por até 12 horas. Este tampão tem papel fundamental no transporte transcervical do esperma e na potencialização da fertilidade, pois impede a saída dos espermatozoides da genitália feminina após o coito. Se houver sucesso no processo de reprodução, a duração média da gestação da rata é de 21 dias e o número de filhotes nascidos varia de 6 a 12 (Mattaraia, 2007).

1.1.2 Desenvolvimento Folicular

Os ovários são os órgãos responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos e pela ovulação, bem como pela produção de hormônios sexuais que agem no trato reprodutivo. O folículo ovariano é a unidade funcional do ovário no qual o componente somático (células granulosas e tecais) e germinativo (oócitos) são interdependentes e associados. Na hipófise estão localizadas as células secretoras de gonadotrofinas, responsáveis pela produção e liberação dos hormônios que regulam a atividade reprodutiva ovariana, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). A síntese e liberação destes hormônios é comandada pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido no núcleo arqueado do hipotálamo (Manser, Morris, Brum, 1995). A secreção de GnRH é realizada em pulsos, o que determina também a pulsatilidade na secreção dos hormônios hipofisários (Picton, 2001; Campos *et al.*, 2012).

Os folículos ovarianos podem ser classificados de acordo com o grau de evolução, em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) (Mhawi *et al.*, 1991).

Os folículos primordiais, parados em fase de repouso desde o desenvolvimento fetal, deixam esse estádio e passam a ser folículos primários. A modificação das células da granulosa de pavimentosas para uma forma cuboide é o primeiro sinal que o folículo está em processo de crescimento. Após essa modificação, os folículos primários se desenvolvem por proliferação ativa das células da granulosa em folículos secundários e depois em terciários, caracterizados pela presença da cavidade antral (Mhawi *et al.*, 1991).

Durante o crescimento folicular, o oócito primário induz a diferenciação das células somáticas que circundam o folículo em células da teca. A formação do antro no folículo terciário desloca as células foliculares em relação ao oócito primário, formando um aglomerado de células chamado *cummulus oophorus*. Desta forma, o folículo vai se aproximando mais da superfície da gônada culminando com a ovulação do complexo cumulus-oócito (CCO). As modificações pelas quais os CCOs passam neste período são chamadas de capacitação oocitária e são essenciais para o desenvolvimento da competência do oócito (Hyttel P, 1997).

O crescimento folicular ocorre continuamente durante a vida, ou pelo menos até ocorrer o término da reserva de folículos primordiais. Quando um determinado folículo primordial é recrutado, ele irá se desenvolver até a ovulação ou entrar em atresia (morte das células foliculares e do oócito), sendo este processo responsável pela eliminação de aproximadamente 99,9% dos folículos presentes no ovário (Mayer *et al.*, 2004).

A determinação do número total de folículos no ovário da maioria dos mamíferos ocorre no período fetal, corroborando o dogma central da biologia reprodutiva, de que as fêmeas nascem com uma quantidade finita de células germinativas que degeneram sem reposição ao longo da vida pós-natal, porém em roedores ela também pode ocorrer logo após o nascimento (Ojeda *et al.*, 2000; Knight e Glister, 2006). No entanto, este dogma tem sido contestado. Pesquisadores observaram, em camundongos C57Bl6, a presença de células germinativas com capacidade de proliferação e diferenciação celular *in vitro*, capazes de produzir folículos e oócitos na vida pós-natal (Johnson *et al.*, 2004). Entretanto, em trabalho recente, Guo *et al.* (2016) identificaram essas células germinativas *in vivo* em camundongos, mas não conseguiram explicar ou comprovar a sua atividade (Guo *et al.*, 2016).

Outra diferença entre fêmeas de roedores e outros mamíferos, é a formação dos folículos primordiais. Em ratas eles são formados durante os três primeiros dias após o nascimento, enquanto em outros mamíferos, mais especificamente a mulher, são formandos durante o desenvolvimento fetal. Em relação ao recrutamento e seleção do folículo antral, os mecanismos são

semelhantes entre roedores e primatas. Entretanto, múltiplos folículos tornam-se dominantes a cada ciclo estral nas ratas (Hirshfield, 1991).

1.1.3 Superovulação

O termo superovulação significa aumentar o número fisiológico de ovulações próprias de uma determinada espécie através da administração exógena de gonadotrofinas (Cabodevila e Torquatri, 2001).

Para realizar um tratamento superovulatório é necessário o uso de hormônios que acarretem o desenvolvimento folicular e a liberação de oócitos em maior quantidade. Com este intuito, são usados hormônios como o FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e a gonadotrofina da menopausa humana (hGMG), que atuam na condução do desenvolvimento folicular e, o LH e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) que estimulam a indução da ovulação e ruptura do folículo (Martín-Coello *et al.*, 2008; Paim *et al.*, 2015). Dessa maneira, FSH e eCG possuem atividades biológicas equivalentes, estimulando o crescimento e a maturação do folículo ovariano (Hafez *et al.*, 2004; Alcoba *et al.*, 2013). O protocolo, preferencialmente, utilizado em roedores para hiperestimulação ovariana é de uma injeção de eCG, para reproduzir a atividade do FSH no desenvolvimento de múltiplos folículos, seguida de uma dose de hCG, para reproduzir os efeitos do LH em relação à maturação folicular e ovulação. Porém se o desfecho desejado são oócitos imaturos, somente o eCG é administrado, para não haver indução da maturação folicular *in vivo* (Rossi *et al.*, 2011; Paim *et al.*, 2015).

Com a administração de eCG, a incidência de folículos atrésicos reduz, isso, provavelmente, ocorre em decorrência da possível capacidade deste hormônio de impedir que folículos normais se tornem atrésicos ou, de forma menos provável, a indução dos folículos que chegaram ao estado de atresia a voltarem ao seu estado normal (Barros, 2015). Isso acarreta em grande quantidade de oócitos obtidas em camundongos e ratos, sendo o eCG indicado para tratamentos de superovulação em várias espécies de roedores (Martín-Coello *et al.*, 2008; Alcoba *et al.*, 2013)

1.2 O complexo *Cumulus*-oócito

1.2.1 Aspectos Morfológicos e Bioquímicos

Oócitos são células da linhagem germinativa em meiose que possuem um tamanho considerável e se desenvolvem nos folículos ovarianos. Durante a fecundação, estas células fornecem metade de seu material genético para o embrião, juntamente com o espermatozoide, e também a maioria dos determinantes citoplasmáticos para o desenvolvimento embrionário posterior. O oócito dos mamíferos é geralmente envolto por uma grossa camada de um material semelhante a uma gelatina, chamada zona pelúcida, que é composta por glicoproteínas, que separa o oócito das células foliculares ao redor (Sotelo e Porter, 1959; Gilchrist e Thompson, 2007). Estas células, chamadas células do *cumulus,* têm prolongamentos que se estendem através da zona pelúcida e mantêm contato com a superfície do oócito (Zamboni, 1970). Durante a formação do antro folicular, as células da granulosa se diferenciam em células da granulosa murais (aproximadamente 50.000 por folículo) e células do *cumulus oophorus* (em torno de 1.000 células por folículo). As células do *cumulus* estão em contato direto com o oócito e as da granulosa murais formam a parede folicular. O conjunto do oócito e das células do *cumulus* que estão em contato próximo formam o complexo *cumulus*-oócito (CCO). As células do *cumulus* possuem projeções citoplasmáticas que cruzam a zona pelúcida e se comunicam com o oolema através de junções do tipo *gap* (Rienzi *et al*., 2012; Li e Albertini, 2013). As junções gap estão presentes no final dessas projeções e são responsáveis pela transferência de moléculas de baixo peso molecular entre o oócito e as células do *cumulus*, incluindo íons, metabolitos, aminoácidos necessários para o crescimento do oócito, além de moléculas regulatórias responsáveis pelo controle do desenvolvimento oocitário (Gilchrist *et al.*, 2004). Este modelo de comunicação é essencial para o desenvolvimento e fertilidade, tendo um importante papel na disseminação local e sinalização endócrina para o oócito. Ainda não está elucidado como ocorre o controle das funções dessas projeções, bem como a sua atuação especifica. Porém, sabe-se que elas contem organelas citoplasmáticas e que há uma variação estrutural durante a foliculogênese e a maturação oocitária (Motta *et al.*, 1994).

O CCO sofre modificações morfológicas durante a foliculogênese. Na fase inicial do desenvolvimento, em estádios imaturos, o CCO é caracterizado pela presença de um número crescente de camadas de células do *cumulus* não expandidas. Em estádios maduros, mais avançados, as células do *cumulus* estão expandidas e em maior número (Lonergan, Faerge*, et al.*, 2003). Em ratos, também foi comprovada a necessidade de utilizar somente gametas com pelo menos três camadas de células do *cumulus* para a maturação *in vitro* (Jiao *et al.*, 2016).

As células do *cumulus*-oócito totalmente desenvolvidas exercem três importantes funções biológicas, controlando, antes da ovulação, a maturação do oócito, durante a ovulação, auxiliando na captação do oócito pela fimbria e durante a fecundação, participando dos mecanismos complexos que controlam o ligação do espermatozoide ao oócito (Tanghe *et al.*, 2002)

Para que os oócitos se tornem aptos a maturação e posteriormente possam ser fecundados e sigam o processo de desenvolvimento embrionário, é necessário que passem por uma fase de crescimento. Uma das modificações dessa fase de crescimento, compreende a formação da zona pelúcida, um envoltório glicoproteico que circunda o oócito (Van Den Hurk e Zhao, 2005). Esta camada desempenha diversas funções importantes, estando envolvida na reação acrossomal do espermatozoide e na prevenção da polispermia (Bleil e Wassarman, 1980).

Na parte interna do oócito, no citoplasma, componentes basofílicos podem ser encontrados, podendo variar em sua distribuição de acordo com a fase de crescimento do oócito (Jones-Seaton, 1950; Sun *et al.*, 2001). Em oócitos jovens e até maduros, essas partículas são menos evidentes do que nos oócitos fecundados e em desenvolvimento (Sotelo, 1959; Sun *et al.*, 2001). Entretanto, a presença de retículos endoplasmáticos não é proeminente em oócitos em desenvolvimento ou maduros e pode ser encontrado em associação com as mitocôndrias (Sun e Schatten, 2006).

O vitelo, na maioria dos invertebrados e vertebrados menores, é o componente citoplasmático mais proeminente no oócito em crescimento (Sotelo e Porter, 1959). Entretanto, os vertebrados maiores possuem diferenças nesta

estrutura pois, em geral, não possuem depósitos de gema. Nessas espécies, o componente citoplasmático correspondente ao vitelo pode ser identificado por sua localização associada com a mitocôndria, porém é menos homogêneo do que em vertebrados menores e invertebrados. Com a maturação e fecundação, o vitelo, ainda associado com a mitocôndria, adota uma distribuição mais homogênea no ooplasma; a continuidade das camadas corticais e perinucleares é perdida e há uma dispersão de massas mais condensadas (Sotelo e Porter, 1959). No final da telófase da segunda meiose, enquanto os cromossomos se agrupam, uma grande quantidade de nucléolos aparece no oócito. Tais nucléolos podem apresentar uma estrutura em formato anelar, contendo uma parede espessa e densa em volta de uma região central menos densa. Ainda, o material que compõe a parede do nucléolo consiste em uma estrutura difusa com pequenos grânulos densos (Sotelo, 1959; Weakley, 1966; Sun e Schatten, 2006).

Estruturas vesiculares chamadas de corpos multivesiculares podem ser encontradas em oócito dos mamíferos. Essas estruturas aparecem randomicamente dispersas em pequenas quantidades no oócito imaturo. Entretanto em oócitos maduros, elas aumentam em número e ocupam uma posição predominantemente periférica (Sotelo e Porter, 1959).

O início do crescimento do oócito, é marcado pelo começo de um período de hipertrofia e mudanças na expressão de genes para atender as necessidades de armazenamento de organelas e macromolélulas que serão transferidas ao embrião. Entre o oócito e as células somáticas, ocorrem cooperações metabólicas para garantir o fornecimento de substratos para o oócito em crescimento (Li e Albertini, 2013).

Durante o crescimento e maturação nuclear, o oócito se mantém parado no estágio de diplóteno da prófase da meiose I até que haja o estímulo do hormônio luteinizante, que é um hormônio glicoproteico dimérico secretado pela glândula hipofise (Zuccotti *et al.*, 2011; Li e Albertini, 2013). Após o pico de LH, fatores solúveis presentes no oócito ativam a produção de sinais indutores de meiose nas células do *cumulus* (Su *et al.*, 2009). 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 (Noma *et al.*, 2011). Com o estímulo do LH, a maturação é completada e a meiose é retomada, ocorrendo a quebra e dissolução da membrana nuclear e a condensação dos cromossomos (Li e Albertini, 2013).

1.2.2 Maturação Citoplasmática

O oócito sofre modificações nucleares e também completa sua maturação citoplasmática através de modificações estruturais, durante o processo de obtenção de competência. Essas modificações que tornam o oócito maduro, em nível citoplasmático, modulam e capacitam sua maquinaria celular para sustentar a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. A maturação citoplasmática também é essencial para progressão da meiose e prevenção da polispermia (Hyttel P, 1997; Lonergan, *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2009).

Hyttel *et al.* (1997) descrevem que a primeira evidencia de competência citoplasmática ocorre quando o oócito para sua fase de preparação e acúmulo de ácido ribonucléico (RNA) e síntese proteica, através de modificações da sua maquinaria de transcrição e tradução (condensação do núcleo e depleção dos ribossomos). Um segundo evento ocorre próximo ao pico de LH resultando na redistribuição das organelas citoplasmáticas, como as mitocôndrias e os grânulos corticais (GC) (Sirard e Coenen, 2006).

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 (Fulka *et al.*, 1998). Devido a importância da mitocôndria como componente responsável pelo suprimento energético, o deslocamento desta estrutura para áreas de maior nível de consumo de energia é crucial para o oócito (Krisher e Bavister, 1998; Stojkovic *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2009). Em oócitos de mamíferos, durante o período de maturação, as mitocôndrias se deslocam de uma posição mais periférica, distribuindo-se de maneira mais dispersa por todo o citoplasma (Hyttel *et al.*, 1986). Ao atingir a metáfase II, as mitocôndrias passam a ocupar uma posição

mais central na célula (Ferreira *et al.*, 2009).

O movimento das mitocôndrias para áreas de alto consumo de energia é crucial para o oócito e embrião durante períodos críticos do ciclo celular (Ferreira *et al.*, 2009). Em bovinos, a análise ultra-estrutural mostra que em oócitos submetidos a maturação *in vitro* (MIV), as mitocôndrias migram de regiões mais periféricas para porções na área central, após 22-24 horas (Silva *et al.*, 2013).

Em oócitos de mamíferos, a migração de grânulos corticais também é um importante passo na maturação citoplasmática, e tem sido usada como um critério na avaliação da maturação. Oócitos em estágio de vesícula germinativa (GV), possuem grânulos corticais distribuídos em aglomerados por todo o citoplasma; enquanto que no fim da maturação nuclear, os grânulos se deslocam para a porção mais próxima a membrana plasmática (Hosoe e Shioya, 1997).

Em roedores, a síntese e acúmulo de p34, que é a subunidade catalítica central do fator promotor de maturação, em oócitos em crescimento correlaciona-se fortemente a habilidade do oócito atingir a quebra da vesícula germinativa *in vivo* ou *in vitro* (Fulka *et al.*, 1998). Outra proteína, a DAZL, é essencial tanto para a maturação meiótica, como para a aquisição da capacidade de desenvolvimento embrionário (Sanchez e Smitz, 2012). A diminuição da expressão dessa proteína em oócitos em estágio de GV não apenas compromete a progressão da meiose, mas também a fecundação (Sanchez e Smitz, 2012).

1.2.3 Maturação Nuclear

Para que o oócito se torne competente ele precisa ter a habilidade de concluir a meiose, clivar após fecundação, desenvolver até blastocisto, induzir prenhez e de ter o nascimento de um indivíduo a termo e saudável. Para isso é indispensável que o oócito passe por um processo de maturação nuclear (Sirard e Coenen, 2006).

Gametas femininos permanecem em meiose estagnada na prófase I desde a fase fetal podendo alcançar o seu desenvolvimento completo apenas na

puberdade. A retomada da meiose é caracterizada pela condensação dos cromossomos, desintegração do envelope nuclear (quebra da vesícula germinativa) e formação do primeiro fuso meiótico. Ao final da primeira divisão meiótica, os cromossomos homólogos são segregados e o primeiro corpúsculo polar (CP) é projetado. Imediatamente, a segunda divisão meiótica inicia e progride até a etapa de metáfase II onde para até que ocorra a fecundação. Nesse momento, as cromátides são segregadas e há extrusão do segundo CP. A maturação nuclear do oócito é caracterizada pelo período entre a retomada da meiose até o estágio de metáfase II (MII) (Bevers e Izadyar, 2002)

A partir da quebra da vesícula germinativa (GVBD), o fuso meiótico da primeira metáfase se forma e quando todos os cromossomos bivalentes se estabilizam, a anáfase ocorre (Wassarman *et al.*, 1976; Solc *et al.*, 2010). Em oócitos murinos maturados *in vitro*, uma vez que os cromossomos estão alinhados na placa metafásica, o fuso da meiose I inicia a migração para o córtex e imediatamente inicia a anáfase (Li e Albertini, 2013). A divisão meiótica que ocorre durante a maturação oocitária é caracterizada por uma assimetria extrema no tamanho e no destino da célula-filha (Li e Albertini, 2013). A partir da primeira divisão meiótica, origina-se um grande oócito e uma célula muito menor chamada de corpúsculo polar, que irá degenerar (Li e Albertini, 2013).

Ao termino da primeira meiose, os oócitos entram diretamente na meiose II, sem passar pela fase S da interfase, onde eles se mantém parados em MII até que a fecundação desencadeia a retomada e o final da meiose II (Solc *et al.*, 2010).

.

1.3 Métodos de seleção oocitária

1.3.1 Seleção Morfológica e outros métodos

A seleção de oócitos competentes para a maturação é crucial para melhores resultados (Jiang *et al.*, 2010). A técnica mais comumente usada para seleção de oócitos, para manipulações *in vitro,* é baseada na morfologia

citoplasmática do próprio oócito e também na presença e organização das camadas de células do *cumulus oophorus* (Hazeleger *et al.*, 1995).

A avaliação morfológica sob microscopia de luz do CCO é um método não invasivo de seleção de gametas, muito utilizado e necessário, sendo que os oócitos provem de diferentes folículos havendo divergências entre si. Essa metodologia avalia a homogeneidade do citoplasma do oócito, a quantidade, qualidade e o grau de compactação das células do *cumulus* (CCs) que recobrem o gameta (Gandolfi *et al.*, 1995; Goovaerts *et al.*, 2010). Apesar da sua ampla utilização e das vantagens inerentes, é um método bastante subjetivo e apresenta baixa acurácia, uma vez que alguns oócitos com morfologia normal (selecionados como aptos por essa metodologia) podem estar em estado inicial de degeneração(Su *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos pelo emprego da seleção baseada em características morfológicas são divergentes. O que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela subjetividade da seleção realizada (Alm *et al.*, 2005; Torner *et al.*, 2008; Mota *et al.*, 2010). Além disso a seleção por morfologia, não avalia parâmetros determinantes da qualidade do gameta, como a atividade mitocondrial, metabolismo celular e mecanismos moleculares como a transcrição e a tradução (Goovaerts *et al.*, 2011; Opiela *et al.*, 2010). Ressaltando essas informações, a baixa taxa de formação de blastocisto em ratos, em alguns experimentos, indica a necessidade de selecionar de forma mais eficaz os gametas competentes, não sendo apenas pela avaliação morfológica (Goovaerts *et al.*, 2010; Paim, 2015).

Outra metodologia utilizada para a seleção de oócitos é a avaliação das células do *cumulus.* As CCs possuem um papel importante na maturação citoplasmática do oócito, no mecanismo de controle da interação entre o oócito e o espermatozoide e na transferência de pequenas moléculas para o gameta. (Gilula *et al.*, 1978). Os oócitos secretam substancias que estimulam a proliferação e diferenciação das CCs. Deste modo, ao mesmo tempo que a maturação do gameta é regulada através de produtos secretados pelas CCs, os oócitos regulam as células que o circudam, como a apoptose, proliferação e diferenciação (Hussein *et al.*, 2006).

Apesar do mecanismo pelo qual as CCs influenciam a competência do oócito não esteja completamente esclarecido, alguns pesquisadores investigaram marcadores moleculares de expressão das CCs, através da técnica de reação da polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) ou *microarray*, como um método de identificar os genes envolvidos no crescimento folicular e desenvolvimento oocitário (Assidi, 2008; Bettegowda *et al.*, 2008). A correlação da abundância do mRNA das catepsinas B,S,Z foi avaliada nas CCs de oócitos bovinos com potencial de desenvolvimento, *in vitro,* até blastocisto (Bettegowda *et al.*, 2008). Os autores mostraram uma associação negativa entre a expressão de mRNA dessas catepsinas e a competência oocitária, sugerindo seu uso como ferramenta indireta em predizer a capacidade de oócitos bovinos de alcançar o estágio de blastocisto após a fecundação.

Embora a técnica de avaliação de CCs pareça promissora, não está totalmente elucidado se podem auxiliar em determinar a capacidade de desenvolvimento do oócito em maturar e desenvolver até blastocisto após fecundação. Outro ponto é a técnica de biopsia para remover as CCs, que é um procedimento laborioso, pouco prático e de pouca aplicação na rotina de laboratórios de técnicas de fertilização *in vitro* (Goovaerts *et al.*, 2010).

1.3.2 Seleção por Azul Cresil Brilhante

Como um aprimoramento das técnicas de seleção de gametas, foi sugerido a combinação dos critérios de seleção morfológica e bioquímica. Ao longo do crescimento/capacitação do oócito, ocorrem modificações metabólicas mediadas por alteração de algumas enzimas-chaves no metabolismo do gameta (Epstein *et al.*, 1969; Tsutsumi *et al.*, 1992). Dentre elas, destaca-se a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que aumenta sua atividade ao longo do crescimento oocitário (Mangia e Epstein, 1975).

A G6PDH faz parte da via fosfato-pentose e tem papel importante na suplementação de energia das células por manter um nível de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina desidrogenase (NAPDH). Ela está ativa

em oócitos em desenvolvimento, mas apresenta atividade reduzida em oócitos que tiveram sua fase de crescimento concluída (Mangia e Epstein, 1975).

Em 1986, foi sugerido que a atividade especifica de G6PDH pode ser aferida de forma indireta, através da aplicação de um corante de vitalidade chamado Azul Cresil Brilhante (BCB). Uma vez que esse corante azulado pode ser reduzido a um composto incolor pela G6PDH, conclui-se que a taxa de coloração azulada corresponderia com o nível de atividade especifica desta enzima (Williams, 1986). Porém, somente em 1993 o uso do BCB foi sugerido como método de aferição da atividade especifica da enzima G6PDH em oócitos de suínos. Ericsson e colaboradores propuseram a utilização do corante BCB como método de seleção de gametas competentes para desenvolvimento. Aqueles que completaram sua fase de crescimento apresentam menor atividade específica de G6PDH e, consequentemente, quando expostos ao BCB apresentam coloração azulada (classificados como BCB positivos) sendo que o corante não é reduzido pela enzima. Os gametas que ainda estão em fase de crescimento apresentam maior atividade especifica da enzima, reduzindo o corante a um composto incolor, não colorindo os gametas, que permanecem incolores (sendo classificados como BCB negativos) (Ericsson *et al.*, 1993).

Alguns pesquisadores já indicaram que a seleção por BCB para maturação *in vitro* pode ser aplicada a oócitos de várias espécies, incluindo em células do *cumulus* de humanos (Alcoba *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013; Alcoba *et al.*, 2016). Em trabalho anterior de nosso grupo de pesquisa, utilizando CCOs de ratas Wistar, foi observado que os oócitos classificados como BCB(–) obtiveram piores resultados de sobrevivência do que os classificados como BCB(+) e os do grupo controle. Entretanto, nenhum resultado entre o grupo controle e o grupo BCB (+) apresentou diferença estatisticamente significativa (Alcoba *et al.,* 2013). Silva *et al.* (2013) relataram que entre os oócitos bovinos classificados com BCB(+), as taxas de maturação nuclear foram significativamente mais altas quando comparadas com as taxas dos oócitos classificados como BCB(-). Também observaram que o desenvolvimento embrionário do grupo BCB(+), BCB(–) e do controle foi similar na fase inicial de clivagem. Entretanto, as taxas de blastocisto no dia 7 foram maiores no grupo BCB(+) (35% -199/575), do que no BCB(–) (10%- 33/327) e no controle (28% -

119/425). Alcoba *et al.* (2016) concluiram que uso do corante BCB em células da granulosa e células do *cumulus* de humanos aparenta ser seguro, porém sugerem que mais experimentos devem ser realizados.

A baixa atividade enzimática de G6PDH encontrada em gametas BCB positivo não é o único fator associado com a competência do gameta, assim marcadores moleculares foram propostos como auxiliares no entendimento do porquê desses gametas classificados como BCB positivos serem mais competentes que os classificados como BCB negativos (Lopes *et al.*, 2015). Foi encontrado que oócitos BCB(+) expressam mais genes relacionados com a síntese proteica (Ghanem *et al.*, 2007), com o crescimento e desenvolvimento folicular (Tabandeh *et al.*, 2012), e com o controle de cópias do ácido desoxiribonucleico (DNA) mitocondrial (Opiela *et al.*, 2010). Por outro lado, oócitos BCB(-) expressam mais genes relacionados a atresia folicular, com supressão do crescimento do folículo (Ghanem *et al.*, 2007) e com apoptose (Su *et al.*, 2012) quando comparados aos seus homólogos positivos. Também foi observado que gametas BCB positivo e negativo apresentam diferenças nos seus mecanismos epigenéticos. Su *et al.* (2012) observaram maior acetilação de histonas, acarretando em maior transcrição pela presença de cromatina mais frouxa, em embriões oriundos de oócitos BCB(+) quando comparados a BCB(-).

Alcoba *et al.* (2013*)* conseguiram padronizar o tempo de exposição ao corante BCB em oócitos de ratas Wistar, pela retomada da meiose e maturação nuclear. Os pesquisadores testaram três diferentes tempos, 30, 60 e 90 minutos e concluíram que o tempo com a melhor acurácia e sensibilidade foi o de 60 minutos. Para encontrar a concentração de BCB ideal, os autores testaram três diferentes concentrações 13 µM, 20 µM e 26 µM, por 60 minutos, porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos. Foi observado que as concentrações de 13 µM e 20 µM, apresentaram melhores resultados, quando comparados a concentração de 26 µM, mostrando melhor acurácia e melhores taxas de retomada de meiose e maturação nuclear, sugerindo que alguma concentração intermediária seja testada, para melhores resultados.

1.4 Criopreservação de complexos *Cumulus-oócito*

1.4.1 Métodos utilizados

Os primeiros registros de sucesso com técnicas de criopreservação em embriões foram de Whittingham *et al.* (1972) e Wilmut (1972), onde foram congelados embriões de camundongos. Uma das técnicas realizadas 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 mergulhá-los em nitrogênio líquido a -196˚C (Whittingham *et al.*, 1972; Wilmut, 1972).

Para o sucesso da técnica utilizada por Whittingham *et al.*, os autores se basearam em conceitos relacionados ao comportamento dos oócitos e embriões diante 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. Em consequência, embriões e oócitos suspensos em soluções parcialmente congeladas respondem osmoticamente através da perda de água para permanecer em equilíbrio osmótico com a solução. 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. 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 (Leibo e Pool, 2011).

Diversas modificações foram feitas, ao longo dos anos, para melhorar os procedimentos de congelamento de oócitos e embriões, principalmente em animais domésticos (Leibo e Pool, 2011). O congelamento rápido, foi uma dessas mudanças, 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. Inicialmente, o decréscimo gradual de temperatura ocorria até -80ºC. Entre outras mudanças podemos citar 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 etilenoglicol (EG) e propilenoglicol (PROH) (Willadsen, 1977; Leibo, 1984). Além disso, nos protocolos atuais de congelamento, comumente se realiza 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 (Saragusty e Arav, 2011).

O congelamento foi a técnica padrão de criopreservação de embriões por muitos anos (De Santis e Coticchio, 2011). Entretanto, apesar de muitos autores obterem resultados bem sucedidos com o congelamento (Gardner *et al.*, 2003; Van Den Abbeel *et al.*, 2005; Liebermann, 2012), a formação de cristais de gelo frequentemente evidenciada, ainda torna esta técnica menos consistente em seus resultados clínicos (Liebermann, 2012). Além disso, por ser uma técnica laboriosa, 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 (Liebermann, 2012).

Após a aplicação de técnicas de congelamento de oócitos, alguns autores, têm obtido baixas taxas de sobrevida e desenvolvimento embrionário *in vitro* em diferentes espécies (Cao *et al.*, 2009; Martinez-Burgos *et al.*, 2011; Wong e Wong, 2011). Tais resultados têm sido atribuídos a possíveis danos causados pela formação de cristais de gelo, choque osmótico e efeitos dos solutos, bem como a ocorrência de alterações ultraestruturais nos oócitos que podem estar relacionadas a diminuição da capacidade de desenvolvimento embrionário (Cao *et al.*, 2009; Wong e Wong, 2011). Além disso, danos como endurecimento da zona pelúcida, exocitose prematura de grânulos corticais (GC), alterações nos microtúbulos e na formação de pró-núcleos já foram descritos após o congelamento de oócitos (Sathananthan *et al.*, 1988; Moller e Wassarman, 1989; Vincent *et al.*, 1990; Bos-Mikich *et al.*, 1995; Hotamisligil *et al.*, 1996; Le Gal e Massip, 1999; Mavrides e Morroll, 2005).

Com o passar dos anos, várias modificações foram feitas para tentar aprimorar a criopreservação de oócitos, como o surgimento da técnica de vitrificação, que já foi associada com altas taxas de desenvolvimento embrionário e gestações, além de ser uma técnica mais barata, rápida e prática (Cha *et al.*, 2011).

Para a vitrificação, o protocolo usual tanto de oócitos como de embriões consiste, inicialmente, em uma fase de equilíbrio com uma solução contendo concentrações menores dos agentes crioprotetores. Em seguida, a amostra é exposta rapidamente a uma solução com as concentrações maiores dos agentes crioprotetores e a alta pressão osmótica exercida pelos agentes crioprotetores faz com que ocorra uma desidratação rápida do citoplasma (Leibo e Pool, 2011). Após a desidratação do oócito ou embrião, a amostra deve ser armazenada em um recipiente adequado para vitrificação e mergulhado em nitrogênio líquido onde é armazenada a -196˚C (Leibo e Pool, 2011). 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 (Leibo e Pool, 2011).

A vitrificação envolve a transição da fase aquosa para uma fase vítrea (que se assemelha ao vidro) através de taxas de resfriamento extremamente rápidas, evitando que o oócito ou embrião passe por uma fase cristalina, limitando a formação de cristais de gelo (Vajta *et al.*, 1998; Brambillasca *et al.*, 2013). Esta estrutura sólida mantém a distribuição molecular e iônica normal do estado líquido e, portanto pode ser considerada um líquido extremamente viscoso superresfriado (Rall, 1987).

Essa técnica pode produzir diversos efeitos adversos em oócitos de diferentes espécies, principalmente porque as células germinativas são extremamente sensíveis a criopreservação (Fujiwara *et al.*, 2010). Algumas características já reconhecidamente relacionadas aos danos causados pela vitrificação são: a lise celular, a formação de cristais de gelo intracelulares, o rompimento do citoesqueleto, o estresse osmótico e dos microtúbulos do fuso meiótico, a ativação partenogenética e a poliploidia (Karlsson *et al.*, 2014). Além disso, como resultado da vitrificação, pode ocorrer a exocitose prematura de grânulos corticais dificultando a penetração dos espermatozóides (Carroll *et al.*, 1990; Mavrides e Morroll, 2005).

1.4.2 Estágios de maturação

Os oócitos podem sofrer alterações morfológicas e funcionais, que são

dependentes da espécie, estágio de desenvolvimento e da habilidade do oócito em reparar os danos, durante a vitrificação (Fuller e Paynter, 2004; Diez *et al.*, 2012). Os protocolos de vitrificação devem ser diferenciados para cada espécie, pois existem diferenças relacionadas ao volume, permeabilidade da membrana plasmática e conteúdo lipídico do oócito (Diez *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a membrana plasmática dos oócitos em MII tem baixo coeficiente de permeabilidade, fazendo com o que o movimento dos agentes crioprotetores e da água diminua (Ruffing *et al.*, 1993). Por esse motivo, a vitrificação de oócitos em fases iniciais da meiose, como vesícula germinativa, tem ganhado destaque nas pesquisas (Diez *et al.*, 2012).

Os oócitos imaturos e maduros apresentam propriedades fisiológicas e biofísicas diferentes que fazem com que eles sejam mais ou menos suscetíveis aos danos causados pela criopreservação e toxicidade dos crioprotetores (Brambillasca *et al.*, 2013). Em oócitos maduros, os principais danos são o rompimento das redes de polimerização e formação anormal dos microtúbulos e da actina e a dispersão irregular dos cromossomos (Eroglu *et al.*, 1998; Brambillasca *et al.*, 2013). 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 (Brambillasca *et al.*, 2013).

Apesar de escassos, existem relatos na literatura sobre vitrificação de CCOs de ratos (Kim *et al.*, 2014; Paim *et al.*, 2015; Paim, 2015). Alguns autores, recentemente, de um grupo de pesquisa importante dos Estados Unidos, publicaram um artigo que aborda os efeitos da vitrificação sobre o ciclo celular e o citoesqueleto de oócitos imaturos utilizando como modelo o rato (Kim *et al.*, 2014). Neste artigo, os autores experimentaram condições para vitrificação utilizando duas ou quatro etapas de equilíbrio e soluções de equilíbrio e crioprotetoras compostas por EG, dimetilsolfóxido (DMSO) e albumina sérica humana (ASH) com concentrações variadas (Kim *et al.*, 2014). Após avaliações sobre a integridade da cromatina, os autores constataram que uma grande porcentagem dos oócitos vitrificados e reaquecidos mostraram uma tendência a apresentar condensação anormal da cromatina, sugerindo que determinadas condições de vitrificação podem prejudicar a maturação nuclear (Kim *et al.*, 2014).

Outros experimentos também utilizaram CCOs de rato como objeto de pesquisa. Paim *et al.* (2015) utilizaram diferentes soluções de crioprotetores em CCOs de *Rattus norvegicus* e observaram a retomada de meiose e maturação nuclear dos gametas após vitrificação. Dentre os grupos, o controle (não vitrificado) apresentou maiores taxas de retomada de meiose e maturação nuclear, concordando com Kim *et al.* (2014), porém dentre os grupos vitrificados a solução que continha ácido hialurônico, foi o que apresentou melhores taxas. Corroborando a hipótese que para cada espécie, deve existir um protocolo de vitrificação diferenciado (Paim *et al.*, 2015).

Em outro experimento do nosso grupo (Paim, 2015) foram testadas diferentes concentrações de soluções de equilíbrio e crioprotetores em CCOs imaturos de ratos. Após o reaquecimento, os oócitos foram maturados *in vitro* por 30 horas e ativados partenogeneticamente, como método de avaliação da viabilidade dos gametas. Os resultados mostraram que no grupo controle (que não passou pelo processo de vitrificação) as taxas de clivagem e desenvolvimento até mórula (32/49 - 65,3% e 19/49 - 38,8% respectivamente), foram melhores que nos grupos vitrificados (8/55-14,5% e 1/55-1,8% respectivamente). Porém as taxas de desenvolvimento a blastocisto não mostraram diferença significativa, (2/49 - 4,1% no grupo controle e 1/55 - 1,8% no grupo vitrificado).

Alguns experimentos mostraram que a taxa de maturação e a viabilidade *in vitro* dos oócitos após a criopreservação ainda está distante da eficácia alcançada *in vivo* sem manipulação. Em ratos, as taxas de maturação após vitrificação variam de 9,24% a 20%, já no grupo controle, não vitrificado, os resultados são melhores, mostrando taxas de 55,75% (Paim *et al.*, 2015). Yamada *et al.* (Yamada *et al.*, 2007) obtiveram taxa de maturação em oócitos bovinos entre 4% e 29%, enquanto no grupo controle, não submetido a criopreservação, os oócitos chegaram a 75% de maturação *in vitro.* Em camundongos, a sobrevivência de oócitos criopreservados em estágio de metáfase II, não ultrapassa 25% após a vitrificação e reaquecimento (Mazur e Seki, 2011).

Ainda não está definido qual o estágio de maturação dos oócitos mais promissor para a criopreservação. O processo de criopreservação de oócitos

imaturos, quanto os maturados, provocam aumento nos índices de polipliodia, e diminuição dos índices de fecundação, quando comparados a grupos controle (Costa *et al.*, 2002).

1.5 Métodos de avaliação da viabilidade oocitária

1.5.1 Maturação *in vitro (MIV)*

A MIV é uma técnica comumente usada na produção de embriões em laboratórios de reprodução animal, embora em humanos ainda seja considerada experimental na prática clínica (Gilchrist e Thompson, 2007). A MIV atua auxiliando no tratamento da infertilidade, clonagem animal, produção de animais transgênicos e serve como um método de avaliação da viabilidade dos gametas femininos (Gilchrist e Thompson, 2007). Esta técnica foi desenvolvida, principalmente, durante a segunda metade do século passado e obteve êxito em meados de 1980 como uma ferramenta de pesquisa que se desenvolveu e tornou essencial nos processos de produção *in vitro* de embriões (Sirard *et al.*, 1988; Sirard *et al.*, 2006).

A técnica de MIV consiste em remover artificialmente os CCOs dos folículos antrais, cultivá-los em meio de cultivo próprio para maturação por 24 - 48 horas até os gametas alcançarem a metáfase II (Gilchrist e Thompson, 2007).

Para a maturação oocitária ocorrer é necessário que modificações bioquímicas e moleculares aconteçam, porém, com o conhecimento atual sobre este tema e as técnicas de MIV utilizadas, esses eventos são limitados *in vitro*, diferindo dos processos de maturação *in vivo*. Primeiramente, os CCOs são coletados de folículos antrais de tamanho médio e artificialmente, 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 serem fecundados e promoverem a embriogênese inicial (Gilchrist e Thompson, 2007). A coleta de CCOs mecanicamente, 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* (Gilchrist e Thompson, 2007).

O uso de meios de cultivo com suplementações e formulações diferentes, é propicio para que a maturação nuclear e citoplasmática ocorra de forma sincronizada e adequada, pois CCOs devem ser supridos com os mesmos nutrientes a que seriam submetidos se estivessem no ambiente ovariano (Gilchrist e Thompson, 2007). Os diferentes meios de cultivo utilizados podem ter resultados 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 abordada de maneira exclusiva em cada espécie (Bukowska *et al.*, 2012).

Porém, a composição básica desses meios de cultivo não é altamente efetiva e para permitir a progressão da meiose e maturação nuclear, suplementos são adicionados para melhorar as condições de cultivo *in vitro*, dentre eles estão o FSH, LH, hCG, fator de crescimento epidérmico (EGF), antibióticos, proteínas e aminoácidos (Bukowska *et al.*, 2012). A suplementação de componentes protéicos, como o soro fetal bovino (SFB) é outra estratégia importante na maturação *in vitro* de oócitos (Ali *et al.*, 2006). O SFB contém uma proteína chamada fetuina que inibe o endurecimento da zona pelúcida, iniciado pela liberação de grânulos corticais (Ali *et al.*, 2006). 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 (Ali *et al.*, 2006). Apesar dos oócitos poderem ser maturados sem a suplementação proteica, a produção de embriões aumenta quando uma fonte proteica é adicionada ao meio (Ali e Sirard, 2002).

1.5.2 Ativação Partenogênetica

O método mais comumente utilizado para avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário *in vitro* é a fecundação *in vitro* (FIV) que consiste em uma série de técnicas em que o oócito é fecundado por um espermatozóide fora do organismo, dentro de um laboratório, com o objetivo de obter embriões viáveis para o desenvolvimento (Paffoni *et al.*, 2008). Apesar de blastocistos serem produzidos *in vitro* eficientemente em várias espécies, ainda existem certas ineficiências (Paim, 2015). O rato de laboratório é extremamente importante para a pesquisa biomédica, porém o desenvolvimento embrionário *in*

vitro dessa espécie, até o momento, não é o mais eficaz (Daniel *et al.*, 1989; Agca e Agca, 2014; Paim, 2015).

Um protocolo de fecundação *in vitro* para ratos foi proposto há alguns anos, porém não foi muito utilizado e difundido, devido a dificuldades e demanda de tempo necessário para o sucesso da técnica (Toyoda e Chang, 1974; Niwa e Chang, 1975; Aoto *et al.*, 2011).

Por outro lado, 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 (Paffoni *et al.*, 2008).

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 (Paffoni *et al.*, 2008). Um dos métodos para ativação partenogenética consiste na utilização de oócitos na segunda meiose com posterior indução da extrusão do segundo corpúsculo polar e levando a formação de um partenoto haplóide (Paffoni *et al.*, 2008). 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 (Henery e Kaufman, 1992).

A obtenção de partenotos diplóides podem ocorrer 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 (Balakier e Tarkowski, 1976). Essa tecnica é utilizada por não afetar a formação e movimentos do pró-núcleo (Balakier e Tarkowski, 1976). 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 (Kubiak *et al.*, 1991). 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 (Paffoni *et al.*, 2008).

A proteína 6- Dimetilaminapurina (6-DMAP) foi proposta para utilização em ativação partenogenética em diversas espécies como murinos, suínos e bovinos (Szollosi *et al.*, 1993; Moses e Masui, 1994; Susko-Parrish *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2001). 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 das outras espécies (Miyoshi *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2002). 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 (Jiang *et al.*, 2002). Porém, quando utiliza-se a 6-DMAP associada com estimulação elétrica, as taxas de clivagem e subsequente desenvolvimento até blastocisto aumentam significativamente (Jiang *et al.*, 2002).

Para obter uma técnica efetiva de ativação partenogenética em ratos, Mizutani *et al.* (2004) testaram dois protocolos de ativação partenogenética: estimulação elétrica associada com 6-DMAP ou ionomicina associada com 6-DMAP. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois, mas os autores relataram que as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até blastocisto, aumentaram significativamente em ionomicina e 6-DMAP, ambas com baixa osmolaridade (Mizutani *et al.*, 2004). 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 5µg por 5 minutos, em combinação com 6-DMAP 2µg por 4 horas, ambos em R1ECMm (meio de cultivo in vitro de embriões de rato) de baixa osmolaridade, seguido de cultivo em meio R1ECMm (Mizutani *et al.*, 2004).

Rogers *et al*. (2004) realizaram um experimento em que foi possível validar o uso de partenotos como modelo de desenvolvimento embrionário *in vitro* de humanos. Neste estudo, os autores compararam o desenvolvimento embrionário de oócitos ativados partenogeneticamente e fecundados *in vitro,* onde resultados mostraram que após a ativação ou inseminação e 42-48 e 66-68 horas, as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* não mostraram diferença estatisticamente significativa (Rogers *et al.*, 2004). Em outro

experimento, onde foi realizado o congelamento de oócitos humanos e, após o reaquecimento, a ativação dos oócitos partenogeneticamente para avaliar o desenvolvimento embrionário *in vitro* resultando em taxas de ativação de 86,1%, sendo que desses 96,8% clivaram e 16,7% formaram blastocistos (De Fried *et al.*, 2008). Os resultados destes trabalhos indicam que a ativação partenogenética pode ser utilizada como modelo experimental de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

1.5.3 Desenvolvimento Embrionário *in vitro*

O sucesso do cultivo *in vitro* do estádio de zigoto até blastocisto é crucial para as técnicas de reprodução *in vitro*. Essas técnicas são essenciais, além do manejo da reprodução, para o tratamento de infertilidade, pesquisas na área da saúde, produção de animais transgênicos, clonagem, desenvolvimento de novas técnicas de manipulação de embriões e gametas (Day, 2000; Agca e Agca, 2014).

Em condições de cultivo adequadas, os embriões tendem a se desenvolver até estágios pré-implantacionais avançados, como blastocisto, podendo até mesmo iniciar os processos de eclosão *in vitro* (Gardner e Lane, 2004a). 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 (Gardner e Lane, 2004a).

Alguns autores presumem 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 NPB e do tempo de quebra da membrana nuclear (Garello *et al.*, 1999; Tesarik e Greco, 1999; Gardner e Lane, 2004a).

No estágio de clivagem, o critério mais utilizado para avaliação de embriões, 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 (Bavister, 1995). Alguns autores avaliam os embriões mamíferos em relação à clivagem no período de 25 horas após a fecundação ou ativação, porém esse tempo é variável conforme a espécie investigada (Shoukir *et al.*, 1997; Sakkas *et al.*, 1998). 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 (Gardner e Lane, 2004b).

Para o sucesso do desenvolvimento embrionário *in vitro*, é necessário que haja o controle de diversos fatores durante os procedimentos de manipulação e cultivo (Gardner e Lane, 2004b). Vários estudos demonstram 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 (Rinaudo *et al.*, 2006; Giritharan *et al.*, 2007; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Delle Piane *et al.*, 2010; Goovaerts *et al.*, 2011; Hentemann *et al.*, 2011; Feuer *et al.*, 2013). 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* (Feuer *et al.*, 2013).

O meio de cultivo R1ECM é o mais utilizado em ratos. Miyoshi, *et al* (1995) testaram a capacidade de desenvolvimento até blastocisto em meio R1ECM suplementado com glutamina, aminoácidos essenciais e não essenciais em diferentes osmolaridades. Os resultados deste experimento mostraram porcentagens satisfatórias 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 (Miyoshi *et al.*, 1995).

Porém, mesmo com técnicas pretensamente estabelecidas, as taxas de desenvolvimento até blastocisto ainda não são ideais pois dependem de muitos fatores locais que variam de laboratório para laboratório. Alguns pesquisadores optam por fecundar em *in vitro* e transferir os prováveis zigotos para desenvolvimento *in vivo,* ou fecundar *in vivo* e fazer o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Aoto *et al.*, 2011; Agca e Agca, 2014).

As taxas de desenvolvimento até blastocisto em ratos não são consistentes e variam de um trabalho a outro, assim como as técnicas utilizadas para a captação e desenvolvimento de embriões. Os resultados variam de 95% a 4,1% de formação de blastocisto em cinco dias. Onde as taxas mais altas são de zigotos produzidos *in vivo* e seguidos de desenvolvimento *in vitro,* e as mais baixas de produção e desenvolvimento *in vitro* (Aflalo *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2011; Agca e Agca, 2014; Paim, 2015).

A seleção de oócitos que sejam capazes de se desenvolver em embriões é crucial tanto para as técnicas de reprodução humana assistida como para as técnicas de embriologia experimental e aplicada envolvendo animais. Tanto a MIV e FIV quanto a criopreservação permitiram avanços nas áreas biomedica e veterinária, porém as diferenças nas espécies não tornam possível um protocolo universal, sendo necessárias pesquisas relacionadas à otimização das técnicas de criopreservação, maturação *in vitro* e seleção de gametas (Wu *et al.*, 2007; Diez *et al.*, 2012; Alcoba *et al.*, 2013).

As baixas taxas de viabilidade e maturação nuclear após procedimentos de criopreservação (Mazur e Seki, 2011; Paim *et al.*, 2015) nos mostram que mesmo com o desenvolvimento dos protocolos de vitrificação, essa técnica ainda pode causar diversos efeitos adversos as células, e juntamente com a seleção de gametas não aptos, podem render resultados insatisfatórios (Alm *et al.*, 2005).

Desde a antiguidade modelos animais são utilizados em pesquisas. O rato de laboratório é apto a servir como modelo em análises de doenças cardiovasculares, neurológicas, pesquisas comportamentais, doenças autoimunes, transplantes, técnicas de reprodução assistida, dentre outras

(Hedrich, 2000). Portanto a seleção, criopreservação e maturação de gametas desta espécie permitem melhorar a eficiência da sua utilização como modelo experimental em diversos sistemas para humanos (Khosravi-Farsani *et al.*, 2010).

Somente um trabalho, no que nos é conhecido, testou a taxa de maturação *in vitro* após criopreservação com a seleção por BCB. Foram selecionados oócitos imaturos de bovinos e expostos a concentrações de BCB por tempos iguais, 26 µM por 90 minutos. Depois foram vitrificados e mantidos em nitrogênio líquido por 10 dias. Após a vitrificação foram submetidos a MIV. Foi concluído que o grupo que sofreu mais degeneração após a vitrificação foi o BCB(-) (15/68- 22%) comparado ao BCB(+) (5-/71 - 7,4%) e o controle vitrificado (6,2%). Também foi relatado que os oócitos do grupo BCB(+) alcançaram melhores taxas de maturação nuclear (34/66 - 51,58%) quando comparados aos grupos BCB(–) (15/53 - 27,9%) e controle vitrificado (28/70 - 40,3%), porém resultados inferiores ao controle não vitrificado (63/72 - 87%)(Hadi *et al.*, 2010).

Até o presente momento, ao que cabe nosso conhecimento, não há estudos sobre a viabilidade de oócitos selecionados através do teste BCB, para vitrificação e posterior MIV e desenvolvimento embrionário em *Rattus norvegicus*, sendo este trabalho pioneiro nessa abordagem.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFLALO, E. D. *et al*. Differences in the implantation rates of rat embryos developed in vivo and in vitro: possible role for plasminogen activators. **Fertil Steril,** v. 81 Suppl 1, p. 780-5, Mar 2004. ISSN 0015-0282. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019809 >.

AGCA, C.; AGCA, Y. Molecular and ultrastuctural changes of rat pre-implantation embryos during two-cell developmental arrest. **J Assist Reprod Genet,** v. 31, n. 6, p. 767-80, Jun 2014. ISSN 1573-7330. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658924 >.

ALCOBA, D. D. *et al*. Safety of brilliant cresyl blue staining protocols on human granulosa and cumulus cells. **Zygote,** v. 24, n. 1, p. 83-8, Feb 2016. ISSN 1469-8730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25921213 >.

ALCOBA, D. D. *et al*. Selection of Rattus norvegicus oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. **Zygote,** v. 21, n. 3, p. 238-45, Aug 2013. ISSN 1469-8730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791168 >.

ALI, A.; BENKHALIFA, M.; MIRON, P. In-vitro maturation of oocytes: biological aspects. **Reprod Biomed Online,** v. 13, n. 3, p. 437-46, Sep 2006. ISSN 1472-6483. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984779 >.

ALI, A.; SIRARD, M. A. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. **Zygote,** v. 10, n. 1, p. 65-71, Feb 2002. ISSN 0967-1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964093 >.

ALM, H. *et al*. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brillant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology,** v. 63, n. 8, p. 2194-205, May 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826683 >.

AOTO, T.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M. A protocol for rat in vitro fertilization during conventional laboratory working hours. **Transgenic Res,** v. 20, n. 6, p. 1245-52, Dec 2011. ISSN 1573-9368. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21359657 >.

ASSIDI M , D. I., ALI A , HAMEL M , ALGRIANY O , DIELEMANN S , SIRARD MA . **Identification of potential markers of oocyte competence expressed in**

bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. Biol Reprod. 79**:** 209-222 p. 2008.

BALAKIER, H.; TARKOWSKI, A. K. Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. **J Embryol Exp Morphol,** v. 35, n. 1, p. 25-39, Feb 1976. ISSN 0022-0752. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/944760 >.

BARROS, F. F. P., *ET AL.* **Reproductive Endocrine and I*n vitro* ProductionAspects in Paca (p*aca cuniculus*-Linnaeus,1766)Reproductive Endocrine and In vitro Production Aspects in Paca (paca cuniculus-Linnaeus, 1766)**. **Rev. Invest. Vet**Rev. Invest. Vet. 14**:** 1-6 p. 2015.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Hum Reprod Update,** v. 1, n. 2, p. 91-148, Mar 1995. ISSN 1355-4786. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15726768 >.

BETTEGOWDA, A. *et al*. Identification of novel bovine cumulus cell molecular markers predictive of oocyte competence: functional and diagnostic implications. **Biol Reprod,** v. 79, n. 2, p. 301-9, Aug 2008. ISSN 0006-3363. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417713 >.

BEVERS, M. M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Mol Cell Endocrinol,** v. 197, n. 1-2, p. 173-8, Nov 2002. ISSN 0303-7207. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431810 >.

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. **Dev Biol,** v. 76, n. 1, p. 185-202, Apr 1980. ISSN 0012-1606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7380091 >.

BOS-MIKICH, A. *et al*. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. **Biol Reprod,** v. 53, n. 4, p. 780-5, Oct 1995. ISSN 0006-3363. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547470 >.

BRAMBILLASCA, F. *et al*. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. **J Assist Reprod Genet,** v. 30, n. 12, p. 1531-9, Dec 2013. ISSN 1573-7330. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114631 >.

BUKOWSKA, D. *et al*. The in vitro culture supplements and selected aspects of canine oocytes maturation. **Pol J Vet Sci,** v. 15, n. 1, p. 199-205, 2012. ISSN 1505-1773. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708378 >.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G. A. (Ed.). **Biotecnologia de la reproducción**. Argentina: INTA, v.1ª Edição, 2001 p.79-108

CAMPBELL, K. D.; REED, W. A.; WHITE, K. L. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. **Biol Reprod,** v. 62, n. 6, p. 1702-9, Jun 2000. ISSN 0006-3363. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10819774 >.

CAMPOS, C. O. *et al*. Preventing Microbial Contamination during Long-Term In Vitro Culture of Human Granulosa-Lutein Cells: An Ultrastructural Analysis. **ISRN Obstet Gynecol,** v. 2012, p. 152781, 2012. ISSN 2090-4444. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988519 >.

CAO, Y. X. *et al*. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. **Fertil Steril,** v. 92, n. 4, p. 1306-11, Oct 2009. ISSN 1556-5653. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930218 >.

CARROLL, J.; DEPYPERE, H.; MATTHEWS, C. D. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **J Reprod Fertil,** v. 90, n. 2, p. 547-53, Nov 1990. ISSN 0022-4251. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2250252 >.

CHA, S. K. *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,** v. 38, n. 1, p. 24-30, Mar 2011. ISSN 2233-8241. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22384414 >.

COSTA, E. P. *et al*. Criopreservação de Ovócitos de Bovinos Imaturos Desnudados ou Não, Utilizando o Etilenoglicol pelo Método da Vitrificação. **R. Bras. Zootec**. 31**:** 1122-1129 p. 2002.

DANIEL, S. A.; ARMSTRONG, D. T.; GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Res,** v. 24, n. 1, p. 109-21, Sep 1989. ISSN 0148-7280. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2591848 >.

DAY, B. N. Reproductive biotechnologies: current status in porcine reproduction. **Anim Reprod Sci,** v. 60-61, p. 161-72, Jul 2000. ISSN 0378-4320. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844192 >.

DE FRIED, E. P. *et al*. Human parthenogenetic blastocysts derived from noninseminated cryopreserved human oocytes. **Fertil Steril,** v. 89, n. 4, p. 943-7, Apr 2008. ISSN 1556-5653. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706204 >.

DE SANTIS, L.; COTICCHIO, G. Reprint of: Theoretical and experimental basis of slow freezing. **Reprod Biomed Online,** v. 23, n. 3, p. 290-7, Sep 2011. ISSN 1472-6491. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889729 >.

DELLE PIANE, L. *et al*. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an IVF mouse model. **Hum Reprod,** v. 25, n. 8, p. 2039-46, Aug 2010. ISSN 1460-2350. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576634 >.

DUKES, H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. Guanabara Koogan, 1996.

DÍEZ, C. *et al*. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. **Reprod Domest Anim,** v. 47 Suppl 3, p. 76-83, Jun 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681301 >.

EPSTEIN, C. J.; WEGIENKA, E. A.; SMITH, C. W. Biochemical development of preimplantation mouse embryos: in vivo activities of fructose 1,6-diphosphate aldolase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase. **Biochem Genet,** v. 3, n. 3, p. 271-81, Jun 1969. ISSN 0006-2928. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5409407 >.

ERICSSON, S. A. *et al*. **Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue**. Theriogenology: Theriogenology 39**:** 214 p. 1993.

EROGLU, A.; TOTH, T. L.; TONER, M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. **Fertil Steril,** v. 69, n. 5, p. 944-57, May 1998. ISSN 0015-0282. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9591507 >.

FERNANDEZ-GONZALEZ, R. *et al*. Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. **Reproduction,** v. 137, n. 2, p. 271-83, Feb 2009. ISSN 1741-7899. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017722 >.

FERREIRA, E. M. *et al*. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology,** v. 71, n. 5, p. 836-48, Mar 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121865 >.

FEUER, S. K.; CAMARANO, L.; RINAUDO, P. F. ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. **Mol Hum Reprod,** v. 19, n. 4, p. 189-204, Apr 2013. ISSN 1460-2407. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264495 >.

FUJIWARA, K. *et al*. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. **J Reprod Dev,** v. 56, n. 1, p. 169-75, Feb 2010. ISSN 0916-8818. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996553 >.

FULKA, J., JR.; FIRST, N. L.; MOOR, R. M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Mol Hum Reprod,** v. 4, n. 1, p. 41-9, Jan 1998. ISSN 1360-9947. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510010 >.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reprod Biomed Online,** v. 9, n. 6, p. 680-91, Dec 2004. ISSN 1472-6483. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15670420 >.

GANDOLFI, F. *et al*. In Vitro development of preimplantation embryos from domestic species. **Toxicol In Vitro,** v. 9, n. 5, p. 607-13, Oct 1995. ISSN 0887-2333. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650136 >.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Assessment of Preimplantation Embryo Development and Viability. In: GARDNER, D. K.;LANE, M., *et al* (Ed.). **A laboratory guide to the mammalian embryo**. 1st. USA: Oxford University Press, 2004a. cap. 4,

GARDNER, D. K.; LANE, M. Culture of the Mammalian Preimplantation Embryo. In: GARDNER, D. K.;LANE, M., *et al* (Ed.). **A laboratory guide to the mammalian embryo**. 1st. USA: Oxford University Press, 2004b. cap. 3,

GARDNER, D. K. *et al*. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. **Fertil Steril,** v. 79, n. 2, p. 407-10, Feb 2003. ISSN 0015-0282. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12568853 >.

GARELLO, C. *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,** v. 14, n. 10, p. 2588-95, Oct 1999. ISSN 0268-1161. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10527992 >.

GHANEM, N. *et al*. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **BMC Dev Biol,** v. 7, p. 90, Jul 2007. ISSN 1471-213X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662127 >.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Anim Reprod Sci,** v. 82-83, p. 431-46, Jul 2004. ISSN 0378-4320. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271471 >.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology,** v. 67, n. 1, p. 6-15, Jan 1 2007. ISSN 0093-691X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092551 >.

GILULA, N. B.; EPSTEIN, M. L.; BEERS, W. H. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. **J Cell Biol,** v. 78, n. 1, p. 58-75, Jul 1978. ISSN 0021-9525. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/670298 >.

GIRITHARAN, G. *et al*. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. **Reproduction,** v. 134, n. 1, p. 63-72, Jul 2007. ISSN 1470-1626. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641089 >.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol,** v. 80, n. 2, p. 84-97, Apr 2007. ISSN 1542-9733. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17342777 >.

GOOVAERTS, I. G. *et al*. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. **Theriogenology,** v. 74, n. 9, p. 1509-20, Dec 2010. ISSN 1879-3231. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708251 >.

GOOVAERTS, I. G. *et al*. Single in vitro bovine embryo production: coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology,** v. 76, n. 7, p. 1293-303, Oct 15 2011. ISSN 1879-3231. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752451 >.

GUO, K. *et al*. Germ stem cells are active in postnatal mouse ovary under physiological conditions. **Mol Hum Reprod,** v. 22, n. 5, p. 316-28, May 2016. ISSN 1460-2407. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916381 >.

HADI, H. *et al*. Selection of Immature Bovine Oocytes Using Brilliant Cresyl Blue Enhances Nuclear Maturity after Vitrification. **Journal of Animal and Veterinary Advances: MedWellJournal.** 9**:** 2710-2713 p. 2010.

HAFEZ, E. S.; GOFF, L.; HAFEZ, B. Mammalian fertilization, IVF, ICSI: physiological/molecular parameters, clinical application. **Arch Androl,** v. 50, n. 2, p. 69-88, 2004 Mar-Apr 2004. ISSN 0148-5016. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15002414 >.

HAZELEGER, N. L. *et al*. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. **Theriogenology,** v. 43, n. 2, p. 509-22, Jan 1995. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16727642 >.

HEDRICH, H. J. History, strains and models. In: KRINKE, G. J. (Ed.). **The Laboratory Rat** Academic Press: Academic Press v.1, 2000 cap. 1, p.3-8.

HENERY, C. C.; KAUFMAN, M. H. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. **Mol Reprod Dev,** v. 31, n. 4, p. 258-63, Apr 1992. ISSN 1040-452X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571160 >.

HENTEMANN, M.; MOUSAVI, K.; BERTHEUSSEN, K. Differential pH in embryo culture. **Fertil Steril,** v. 95, n. 4, p. 1291-4, Mar 15 2011. ISSN 1556-5653. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21067724 >.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int Rev Cytol,** v. 124, p. 43-101, 1991. ISSN 0074-7696. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2001918 >.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote,** v. 5, n. 4, p. 371-6, Nov 1997. ISSN 0967-1994. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9563685 >.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biol Reprod,** v. 55, n. 1, p. 161-8, Jul 1996. ISSN 0006-3363. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793071 >.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Dev Biol,** v. 296, n. 2, p. 514-21,

Aug 2006. ISSN 0012-1606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854407 >.

HYTTEL P, F. T., CALLESEN H AND GREVE T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology.** 47**:** 23-32 p. 1997.

JIANG, J. Y. *et al*. Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. **Mol Reprod Dev,** v. 61, n. 1, p. 120-5, Jan 2002. ISSN 1040-452X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774383 >.

JIANG, J. Y. *et al*. Mural granulosa cell gene expression associated with oocyte developmental competence. **J Ovarian Res,** v. 3, p. 6, Mar 2010. ISSN 1757-2215. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205929 >.

JIAO, G. Z. *et al*. Optimized Protocols for In Vitro Maturation of Rat Oocytes Dramatically Improve Their Developmental Competence to a Level Similar to That of Ovulated Oocytes. **Cell Reprogram,** v. 18, n. 1, p. 17-29, Feb 2016. ISSN 2152-4998. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679437 >.

JOHNSON, J. *et al*. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature,** v. 428, n. 6979, p. 145-50, Mar 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014492 >.

JONES-SEATON, A. [Study of the cytoplasmic organization of the ovum of rodents, principally in regard to the ribonucleic basophilia]. **Arch Biol (Liege),** v. 61, n. 3, p. 291-444, 1950. ISSN 0003-9624. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14790820 >.

KARLSSON, J. O. *et al*. Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. **Cryobiology,** v. 68, n. 1, p. 18-28, Feb 2014. ISSN 1090-2392. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24246951 >.

KHOSRAVI-FARSANI, S. *et al*. Mouse oocyte vitrification: the effects of two methods on maturing germinal vesicle breakdown oocytes. **J Assist Reprod Genet,** v. 27, n. 5, p. 233-8, May 2010. ISSN 1573-7330. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407816 >.

KIM, S. S. *et al*. The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. **J Assist Reprod Genet,** v. 31, n. 6, p. 739-47, Jun 2014. ISSN 1573-7330. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668208 >.

KINGHT, P. G.; GLISTER, C. Potential regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction,** 2001 Apr;121(4):503-12.

KOO, D. B. *et al*. Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. **Mol Reprod Dev,** v. 58, n. 1, p. 15-21, Jan 2001. ISSN 1040-452X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144215 >.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology,** v. 49, n. 1, p. 103-14, Jan 1 1998. ISSN 0093-691X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732124 >.

KUBIAK, J. *et al*. Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. **Development,** v. 111, n. 3, p. 763-9, Mar 1991. ISSN 0950-1991. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1879340 >.

LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology,** v. 38, n. 4, p. 290-300, Jun 1999. ISSN 0011-2240. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10413572 >.

LEIBO, S. P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology,** v. 21, n. 5, p. 767-90, May 1984. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16725925 >.

LEIBO, S. P.; POOL, T. B. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. **Fertil Steril,** v. 96, n. 2, p. 269-76, Aug 2011. ISSN 1556-5653. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782053 >.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nat Rev Mol Cell Biol,** v. 14, n. 3, p. 141-52, Mar 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429793 >.

LIEBERMANN, J. Vitrification of oocytes and embryos. In: KATKOV, I. I. (Ed.). **Current frontiers in cryobiology**. Rijeka: InTech, 2012. cap. 6, p.169-184. ISBN 978-953-51-0191-8.

LONERGAN, P. *et al*. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev,** v. 64, n. 3, p. 369-78, Mar 2003. ISSN 1040-452X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548669 >.

LOPES, E. F. *et al*. Gene Expression of Monocarboxylate Transporters and Oocyte-secreted Factors in Bovine Cumulus-oocyte Complexes Selected by Brilliant Cresyl Blue. **Reprod Domest Anim,** v. 50, n. 5, p. 763-70, Oct 2015. ISSN 1439-0531. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280459 >.

MANGIA, F.; EPSTEIN, C. J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. **Dev Biol,** v. 45, n. 2, p. 211-20, Aug 1975. ISSN 0012-1606. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1242707 >.

MANSER, C. E.; MORRIS, T. H.; BROOM, D. M. An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rats. **Lab Anim,** v. 29, n. 4, p. 353-63, 1995.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol,** v. 62, n. 4A, p. 609-14, Nov 2002. ISSN 1519-6984. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12659010 >.

MARCONDES, F. K. *et al*. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiol Behav,** v. 74, n. 4-5, p. 435-40, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 0031-9384. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790402 >.

MARTINEZ-BURGOS, M. *et al*. Vitrification versus slow freezing of oocytes: effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. **Fertil Steril,** v. 95, n. 1, p. 374-7, Jan 2011. ISSN 1556-5653. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828688 >.

MARTÍN-COELLO, J. *et al*. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (Mus musculus, Mus spretus and Mus spicilegus). **Theriogenology,** v. 70, n. 6, p. 1004-13, Oct 2008. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640710 >.

MATTARAIA, V. **Eficiência reprodutiva de ratos Wistar: sincronização, restrição alimentar e sistemas de produção.** 2007. (Tese de doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista

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,** v. 118, n. 1, p. 66-70, Jan 10 2005. ISSN 0301-2115. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596275 >.

MAYER, L. P. *et al*. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol Reprod,** v. 71, n. 1, p. 130-8, Jul 2004. ISSN 0006-3363. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998904 >.

MAZUR, P.; SEKI, S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to 70,000°C/min and warmed at 610° to 118,000°C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. **Cryobiology,** v. 62, n. 1, p. 1-7, Feb 2011. ISSN 1090-2392. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21055397 >.

MHAWI, A. J.; KANKA, J.; MOTLÍK, J. Follicle and oocyte growth in early postnatal calves: cytochemical, autoradiographical and electron microscopical studies. **Reprod Nutr Dev,** v. 31, n. 2, p. 115-26, 1991. ISSN 0926-5287. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1863321 >.

MIYOSHI, K. *et al*. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. **J Reprod Fertil,** v. 103, n. 1, p. 27-32, Jan 1995. ISSN 0022-4251. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707298 >.

MIZUTANI, E. *et al*. Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. **J Reprod Dev,** v. 50, n. 1, p. 139-46, Feb 2004. ISSN 0916-8818. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15007211 >.

MOLLER, C. C.; WASSARMAN, P. M. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. **Dev Biol,** v. 132, n. 1, p. 103-12, Mar 1989. ISSN 0012-1606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2492959 >.

MOSES, R. M.; MASUI, Y. Enhancement of mouse egg activation by the kinase inhibitor, 6-dimethylaminopurine (6-DMAP). **J Exp Zool,** v. 270, n. 2, p. 211-8, Oct 1 1994. ISSN 0022-104X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964556 >.

MOTA, G. B. *et al*. Developmental competence and expression of the MATER and ZAR1 genes in immature bovine oocytes selected by brilliant cresyl blue. **Zygote,** v. 18, n. 3, p. 209-16, Aug 2010. ISSN 1469-8730. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19939331 >.

MOTTA, A. B. *et al*. Influences of oxytocin on the synthesis of prostaglandins by uterus from rats in different stages of the estrous cycle. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,** v. 51, n. 2, p. 133-9, Aug 1994. ISSN 0952-3278. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7972267 >.

NIWA, K.; CHANG, M. C. Requirement of capacitation for sperm penetration of zona-free rat eggs. **J Reprod Fertil,** v. 44, n. 2, p. 305-8, Aug 1975. ISSN 0022-4251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1159667 >.

NOMA, N. *et al*. LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. **Mol Endocrinol,** v. 25, n. 1, p. 104-16, Jan 2011. ISSN 1944-9917. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047912 >.

OJEDA, S. R. *et al*. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular devolopment. **Mol Cell Endocrinol.** 2000 May 25;163(1-2):67-71.

OPIELA, J. *et al*. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Anim Reprod Sci,** v. 118, n. 2-4, p. 188-93, Apr 2010. ISSN 1873-2232. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671488 >.

PAFFONI, A. *et al*. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. **Placenta,** v. 29 Suppl B, p. 121-5, Oct 2008. ISSN 0143-4004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778853 >.

PAIM, L. M. *et al*. Vitrification of Rattus norvegicus immature cumulus-oocyte complexes using hyaluronic acid. **In Vitro Cell Dev Biol Anim,** v. 51, n. 10, p. 995-1002, Nov 2015. ISSN 1543-706X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198050 >.

PAIM, L. M. G. **EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUSOÓCITO IMATUROS DE Rattus norvegicus UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**. 2015. 111 (Mestrado). Ciências da Saúde, UFCSPA, Brazil.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle. **Theriogenology,** v. 55, n. 6, p. 1193-210, Apr 2001. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11327680 >.

POPOVA, E.; BADER, M.; KRIVOKHARCHENKO, A. Effect of culture conditions on viability of mouse and rat embryos developed in vitro. **Genes (Basel),** v. 2, n. 2, p. 332-44, 2011. ISSN 2073-4425. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710194 >.

RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology,** v. 24, n. 5, p. 387-402, Oct 1987. ISSN 0011-2240. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3652721 >.

RIENZI, L. *et al*. **The oocyte** Human R*eproduction*. 27**:** i2-i21p. 2012.

RINAUDO, P. F. *et al*. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. **Fertil Steril,** v. 86, n. 4 Suppl, p. 1252-65, 1265 e1-36, Oct 2006. ISSN 1556-5653. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008149 >.

ROGERS, N. T. *et al*. Phospholipase Czeta causes Ca2+ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. **Reproduction,** v. 128, n. 6, p. 697-702, Dec 2004. ISSN 1470-1626. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579586 >.

ROSSI, L. M. *et al*. Ação dos medicamentos para estimulação ovariana sobre a primeira geração de filhotes de camundongos Mus musculus. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**. 56**:** 1-6 p. 2011.

RUFFING, N. A. *et al*. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology,** v. 30, n. 6, p. 562-80, Dec 1993. ISSN 0011-2240. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306705 >.

SAKKAS, D. *et al*. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. **Hum Reprod,** v. 13, n. 1, p. 182-7, Jan 1998. ISSN 0268-1161. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9512254 >.

SANCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta,** v. 1822, n. 12, p. 1896-912, Dec 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22634430 >.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction,** v. 141, n. 1, p. 1-19, Jan 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974741 >.

SATHANANTHAN, A. H. *et al*. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. **Gamete Res,** v. 21, n. 4, p. 385-401, Dec 1988. ISSN 0148-7280. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3220431 >.

SHOUKIR, Y. *et al*. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. **Hum Reprod,** v. 12, n. 7, p. 1531-6, Jul 1997. ISSN 0268-1161. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9262291 >.

SILVA, D. S. *et al*. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote,** v. 21, n. 3, p. 250-5, Aug 2013. ISSN 1469-8730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791164 >.

SIRARD, M. A.; COENEN, K. In vitro maturation and embryo production in cattle. **Methods Mol Biol,** v. 348, p. 35-42, 2006. ISSN 1064-3745. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988370 >.

SIRARD, M. A. *et al*. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biol Reprod,** v. 39, n. 3, p. 546-52, Oct 1988. ISSN 0006-3363. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3196788 >.

SMITH, S. L. *et al*. Gene expression profiling of single bovine embryos uncovers significant effects of in vitro maturation, fertilization and culture. **Mol Reprod Dev,** v. 76, n. 1, p. 38-47, Jan 2009. ISSN 1098-2795. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449896 >.

SOLC, P.; SCHULTZ, R. M.; 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,** v. 16, n. 9, p. 654-64, Sep 2010. ISSN 1460-2407. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20453035 >.

SOTELO, J. R. An electron microscope study on the cytoplasmic and nuclear components of rat primary oocytes. **Z Zellforsch Mikrosk Anat,** v. 50, p. 749-65, 1959. ISSN 0340-0336. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13832971 >.

SOTELO, J. R.; PORTER, K. R. An electron microscope study of the rat ovum. **J Biophys Biochem Cytol,** v. 5, n. 2, p. 327-42, Mar 25 1959. ISSN 0095-9901. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13654454 >.

STOJKOVIC, M. *et al*. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod,** v. 64, n. 3, p. 904-9, Mar 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207207 >.

SU, J. *et al*. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e36181, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558373 >.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. **Semin Reprod Med,** v. 27, n. 1, p. 32-42, Jan 2009. ISSN 1526-4564. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19197803 >.

SUN, Q. Y. *et al*. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Biol Reprod,** v. 64, n. 3, p. 879-89, Mar 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207204 >.

SUN, Q. Y.; SCHATTEN, H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. **Reproduction,** v. 131, n. 2, p. 193-205, Feb 2006. ISSN 1470-1626. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452714 >.

SUSKO-PARRISH, J. L. *et al*. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Dev Biol,** v. 166, n. 2, p. 729-39, Dec 1994. ISSN 0012-1606. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813790 >.

SZOLLOSI, M. S. *et al*. Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. **J Cell Sci,** v. 104 (Pt 3), p. 861-72, Mar 1993. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8391012 >.

TABANDEH, M. R. *et al*. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. **Anim Reprod Sci,** v. 131, n. 1-2, p. 30-40, Mar 2012. ISSN 1873-2232. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391295 >.

TANGHE, S. *et al*. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol Reprod Dev,** v. 61, n. 3, p. 414-24, Mar 2002. ISSN 1040-452X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835587 >.

TESARIK, J.; GRECO, E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage

morphology. **Hum Reprod,** v. 14, n. 5, p. 1318-23, May 1999. ISSN 0268-1161. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325285 >.

TORNER, H. *et al*. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction,** v. 135, n. 2, p. 197-212, Feb 2008. ISSN 1470-1626. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239049 >.

TOYODA, Y.; CHANG, M. C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **J Reprod Fertil,** v. 36, n. 1, p. 9-22, Jan 1974. ISSN 0022-4251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4809715 >.

TSUTSUMI, O. *et al*. Determination of enzyme activities of energy metabolism in the maturing rat oocyte. **Mol Reprod Dev,** v. 33, n. 3, p. 333-7, Nov 1992. ISSN 1040-452X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1449800 >.

VAJTA, G. *et al*. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev,** v. 51, n. 1, p. 53-8, Sep 1998. ISSN 1040-452X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712317 >.

VAN DEN ABBEEL, E. *et al*. Slow controlled-rate freezing of sequentially cultured human blastocysts: an evaluation of two freezing strategies. **Hum Reprod,** v. 20, n. 10, p. 2939-45, Oct 2005. ISSN 0268-1161. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958398 >.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology,** v. 63, n. 6, p. 1717-51, Apr 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15763114 >.

VINCENT, C.; PICKERING, S. J.; JOHNSON, M. H. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. **J Reprod Fertil,** v. 89, n. 1, p. 253-9, May 1990. ISSN 0022-4251. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2374118 >.

WASSARMAN, P. M.; JOSEFOWICZ, W. J.; LETOURNEAU, G. E. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. **J Cell Sci,** v. 22, n. 3, p. 531-45, Dec 1976. ISSN 0021-9533. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/190244 >.

WEAKLEY, B. S. Electron microscopy of the oocyte and granulosa cells in the developing ovarian follicles of the golden hamster (Mesocricetus auratus). **J Anat,** v. 100, n. Pt 3, p. 503-34, Jul 1966. ISSN 0021-8782. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6007460 >.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. **Science,** v. 178, n. 4059, p. 411-4, Oct 1972. ISSN 0036-8075. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5077328 >.

WILLADSEN, S. M. Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. **Ciba Found Symp**, n. 52, p. 175-201, 1977 Jan 18-20 1977. ISSN 0300-5208. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/244394 >.

WILLIAMS, T. J. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Theriogenology,** v. 25, n. 5, p. 733-9, May 1986. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16726164 >.

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.

WONG, J. Y.; WONG, A. Y. Phasing-in of vitrification into routine practice: why, how, and what. **Hong Kong Med J,** v. 17, n. 2, p. 119-26, Apr 2011. ISSN 1024-2708. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21471591 >.

WU, Y.-G. *et al*. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Res,** v. 17, n. 8, p. 722-731, 08//print 2007. ISSN 1001-0602. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.66 >.

YAMADA, C. *et al*. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Anim Reprod Sci,** v. 99, n. 3-4, p. 384-8, Jun 2007. ISSN 0378-4320. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049766 >.

ZAMBONI, L. **Ultrastructure of mammalian oocytes and ova**. Biol Reprod. 2**:** 44-63 p. 1970.

ZUCCOTTI, M. *et al*. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Hum Reprod Update,** v. 17, n. 4, p. 525-40, Jul-Aug 2011. ISSN 1460-2369. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21444328 >.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Determinar um protocolo de seleção de CCOs de *Rattus norvegicus* pelo teste BCB para manipulação e desenvolvimento *in vitro* de embriões.
- Avaliar a viabilidade e capacidade de desenvolvimento de CCOs após vitrificação, maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

3.2 Específicos

- Determinar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário após a ativação partenogenética de CCOs selecionados por diferentes concentrações de BCB;
- Determinar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário após a ativação partenogenética de CCOs selecionados por BCB ou apenas morfologicamente e submetidos a criopreservação.

4. SITUAÇÃO DO MANUSCRITO

O manuscrito intitulado “Selection of *Rattus norvegicus cumulus*-oocyte complex for vitrification by brilliant cresyl blue” encontra-se em preparação pelos autores e será submetido a revista científica *Zygote*, de fator de impacto 1,37.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Title: "Selection of *Rattus norvegicus cumulus*-oocyte complex for vitrification by brilliant cresyl blue".

Authors:

Iaskara Vieira de Oliveira[a,b] e-mail: iaskaravieira@hotmail.com

Joana Fisch[a,b] e-mail: joanafisch@hotmail.com

Juliana Fank Gomes[b] e-mail: julianafank@gmail.com

Rui Fernando Felix Lopes[b] e-mail: rui.lopes@ufrgs.br

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira[a,b] e-mail: atdo@ufrgs.br

[a] PPG – Ciências da Saúde - 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.

Corresponding Author:

Alexandre Tavares Duarte de Oliveira

Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmento Leite, 500, sala 111 - Porto Alegre- 90050-170

E-mail: atdo@ufrgs.br

5.1 Abstract

One of the major reasons of the low viability of rat oocytes after vitrification is inadequate selection of gametes using morphologic criteria. The objective of this study was to determine the cleavage and embryo developmental rates after parthenogenetic activation of COCs selected by different concentrations of BCB and cryopreservation. In the first experiment, COCs were evaluated after incubation for 1 h in medium containing increasing concentrations of BCB (13 µM, 16 µM, or 20 µM). The control group was not exposed to BCB staining. In the second experiment, COCs were divided into 4 groups: 13 µM BCB(+), 13 µM BCB(-), control I (selected by morphologic observation and immediately matured *in vitro* without vitrification) and control II (selected by morphologic evaluation, vitrified, and matured *in vitro*). In the first experiment, the 13 µM BCB group presented higher rates of development of morula/cleavage stages (65.45% - 36/55) when compared to the other groups. In the second experiment, cleavage (47.05% - 72/153) and morula development (33.55% - 51/153) of control group of fresh COCs were increased compared to the other groups. However, when comparing morula/cleavage rates between vitrified COC control and BCB (+) groups, the BCB (+) group had better results (19.23% - 5/26 and 64.7% - 11/17, respectively). Our best result in the selection of *Rattus norvegicus* COCs by BCB staining were obtained using a concentration of 13 µM. This selection could be a valuable tool to improve vitrification outcome, as observed by the BCB (+) group that demonstrated better results compared to the vitrified COC control group.

key words: rat, COC, vitrification, BCB and embryo development

5.2 Introduction

The main difficulty when handling cumulus-oocyte complexes (COCs) outside the ovarian environment is the identification and selection of competent oocytes for further *in vivo* or *in vitro* embryo development. Successful use of biotechnologies such as in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF), cryopreservation of oocytes, and embryonic development depend on the ability to separate oocytes using conditions that allow us to follow their development from those that are destined to degenerate (Opiela e Kątska-Książkiewicz, 2013).

COCs can be routinely obtained by slicing the ovary surface, resulting in oocytes with heterogeneous diameter, different COC morphology and, possibly, at varying stages of atresia (Catalá *et al*., 2011). Generally, COCs are selected using morphological assessment by observing the numbers and compactness of cumulus cell layers surrounding the oocyte, granulation and homogeneity of the cytoplasm. However, the viability of oocytes selected using these criteria is often inaccurate, making it difficult to distinguish oocytes by developmental competence (Su *et al*., 2012). It has been shown that a portion of morphologically selected oocytes are still in the growth phase and are unable to mature (Alm *et al.*, 2005).

An alternative method that improves oocyte selection and, therefore, allows identification of oocytes with greater competence for later development is BCB staining, which has been used in several animal models including rats (Alcoba *et al.*, 2013), swine (Wongsrikeao *et al*., 2006), bovine (Alm *et al*., 2005) and mice (Wu *et al.*, 2007), among others species. Despite the widespread use of this stain, the literature reports some divergent results, pointing to the need to improve the techniques that have already been described (Ghanem *et al*., 2007; Opiela *et al*., 2010; Su *et al*., 2012; Tabandeh *et al*., 2012; (Opiela e Kątska-Książkiewicz, 2013; Lopes *et al*., 2015).

The use of BCB staining is noninvasive and measures the activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). This enzyme is active in growing

oocytes, but in oocytes that have already completed this phase, G6PDH activity declines. And it's synthesized within the oocytes during oogenesis, G6PDH is a component of the pentose phosphate cycle which provides ribose phosphate for nucleotide synthesis and much of the NAPDH utilized as an electron or hydrogen donor in reductive biosynthetic reactions such as the formation of fatty acids. G6PDH metabolizes and neutralizes the BCB, resulting in colorless oocytes. Thus, we can infer the level of enzymatic activity of G6PDH and the competence of the oocyte to undergo successful IVM (Alm *et al.,* 2005, Opiela e Kątska-Książkiewicz, 2013). Oocytes that have terminated the growth phase, having low G6PDH enzyme activity, will retain the stain in the cytoplasm and appear blue (classified as BCB [+]). Oocytes still in the growth phase, having high levels of G6PDH activity, will appear colorless (classified as BCB [-]) (Torner *et al.,* 2008, Opiela e Kątska-Książkiewicz, 2013).

Although some studies have shown the effectiveness of the BCB staining for oocyte selection, it is necessary to establish a species-specific protocol, including relevant exposure times and specific concentrations (Alm *et al.,* 2005; Mirshamsi *et al*., 2013; Silva *et al*., 2013*).* Our group, in a previous report, tested different exposure times and different concentrations of BCB staining to select rat cumulus-oocyte complexes for IVM. However, this is the only published work regarding the use of BCB staining for this species. The best exposure time observed was 1 h, but the best concentration was not well established, ranging from 13 to 20 μM. Therefore, it is still necessary to optimize this methodology (Alcoba *et al.,* 2013).

In the same way, an alternative to increase oocyte survival after vitrification is to improve COC assessment by other methods than morphological evaluation using a stereomicroscope (Hadi *et al*., 2010). Differences in the maturation stage of oocytes result in different physiological and biophysical properties that affect susceptibility to damage caused by cryopreservation and toxicity of cryoprotectants (Brambillasca *et al.*, 2013). In mature oocytes, damage observed includes disruption of polymerization

chains, abnormal formation of microtubules and actin, and irregular dispersion of chromosomes (Brambillasca *et al.*, 2013). In theory, because immature oocyte microtubules are not organized at the meiotic spindle, cryopreservation at this stage might avoid the risk of chromosomal aberrations since the chromatin is protected by the nuclear envelope (Brambillasca *et al.*, 2013). Hadi *et al*. (2010) stated that the stage of oocyte development may also play an important role in all *in vitro* reproduction procedures.

Recently, the effects of various vitrification protocols on the cell cycle and the cytoskeleton of immature rat oocytes was observed (Kim *et al.*, 2014). In this article, the authors used varying conditions of vitrification including two or four stages of balance and equilibrium and cryoprotectant solutions composed of ethylene glycol, DMSO and human serum albumin (HSA) at varying concentrations. After assessing chromatin integrity, the authors found that a large percentage of vitrified and warmed oocytes tended to exhibit abnormal chromatin condensation, suggesting that vitrification conditions may impair nuclear maturation (Kim *et al.*, 2014). In another study, experiments in rats used COCs as a research object. Paim *et al.* (2015) used different cryoprotectants solutions in COCs of *Rattus norvegicus* and observed the recovery of meiotic and nuclear maturation of gametes after vitrification. Among the groups, the control group (non-vitrified) had higher rates of meiosis resumption and nuclear maturation, in accordance with Kim *et al*. (2014), but among the vitrified groups, those containing hyaluronic acid demonstrated the best rates of meiosis resumption and nuclear maturation. These results corroborate the hypothesis that for each species, there must be a specific vitrification protocol (Paim *et al.*, 2015).

Oocytes or COCs may undergo morphological and functional changes during vitrification, depending on the species, stage of development, and ability to repair damage. Cryopreservation of immature oocytes (during early phases of meiosis) has gained attention, since the plasma membrane of these cells, during this phase of

meiosis, has a low permeability coefficient, causing movement of cryoprotectants and water to occur within more acceptable parameters for the cryopreserved cell (Díez *et al.*, 2012).

The objectives of this work were to determine a protocol for the selection of *Rattus norvegicus* COCs using the BCB test for *in vitro* procedures and to evaluate the viability and *in vitro* developmental capacity of COCs selected by BCB staining after vitrification and *in vitro* maturation.

5.3 Materials and methods

All the reagents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated in the text.

5.3.1 Animals

Fifty-seven female Wistar rats (31±2.1 days old) obtained from the Animal Facility at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brazil) were used in these experiments. The animals were housed in a vivarium at the Federal University of Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS) in standard cages (41 x 34 x 17.8 cm; Beiramar, Campinas, Brazil) with woodchip bedding in a colony room. The animal room was maintained at 22 ± 2°C, 50–57% humidity and on a 12/12 h light dark cycle (lights on at 06:00 h). They were given a commercial pelletized diet (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Colombo, Brazil) and water *ad libitum*.

All experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brazil) through the approval 29.990/16. Furthermore, all animal experiments were conducted in strict accordance with the recommendations by the International Animal Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and according to Brazilian law n° 11794/2008 for animal experiments. All procedures of euthanasia in this experiment followed Normative

Resolution 13, of September 20, 2013 by the National Council of Animal Experimentation Control (CONCEA).

5.3.2 Experimental Design

This study was conducted in two main experiments. In the first experiment, all COCs were selected by morphological criteria and separated in 4 groups. COCs used as control group were *in vitro* matured immediately. In the other groups, COCs were incubated, during 1 hour, in M16 medium (without phenol red) containing BCB at different concentrations (group 1:13 µM; group 2: 16 µM; and group 3: 20 µM). After the incubation, IVM and parthenogenetic activation were conducted to induce embryonic development. The objective of this experiment was to find the best concentration of BCB for selection of rat COCs. The range of BCB concentrations was based in previous work of our group (Alcoba *et al*., 2013). The effect of BCB was evaluated on *in vitro* embryo development after parthenogenetic activation. In each repetition of experiment 1, 10-40 COCs were grouped by treatment. A total of 6 repetitions was accomplished in experiment 1. Based on the results of the first experiment, the second experiment was performed using the best concentration of BCB for COC evaluation. The effect of COC selection by BCB and vitrification was evaluated on *in vitro* embryo development after parthenogenetic activation. COCs were divided into 4 groups: BCB (+) (blue), BCB (-) (colorless), control I (COCs selected by morphological criteria and immediately *in vitro* matured, without vitrification) and control II (COCs selected by morphological criteria, vitrified, and *in vitro* matured). In each repetition of experiment 2, 3-50 COCs were grouped by treatment. A total of 5 repetitions was accomplished in experiment 2.

5.3.3 *Cumulus*-Oocyte Complex Recovery

Females intended for superovulation were treated with 20 UI eCG (Folligon, Intervet, Boxmeer, The Netherlands) by IP injection. After 48 h, rats were euthanized with isoflurane vapor overdose. Immediately after euthanasia, the ovaries were removed from the abdominal cavity of each female as described by Alcoba *et al*. (2013) and Paim *et al*. (2015). Briefly, ovaries were maintained at 37°C in modified PBS (mPBS) (Whittingham, 1971) until the moment of scraping. Then, the ovaries were transferred to a plastic Petri dish containing mPBS supplemented with 2% FBS and the cortexes were sliced using a scalpel blade to release COCs into the medium. After this procedure, Petri dishes containing COCs were analyzed using a stereomicroscope (Meiji EMZ 13TR, Meiji Techno Co, Saitama, Japan) for further morphological selection. COCs containing compact *cumulus* cells and that demonstrated homogeneous ooplasm were selected, as described by Alcoba *et al*. (2013) and Paim *et al*. (2015), and placed in a dish containing manipulation medium (M2) (Quinn *et al.*, 1982). Selected COCs used as control groups in experiment 1 and 2 were immediately *in vitro* matured.

5.3.4 Brilliant Cresyl Blue staining

For staining, COCs were incubated in M16 medium (Whittingham, 1971), without phenol red, containing BCB (Sigma, B-5388) at different concentrations for each experiment, as mentioned above, at 37ºC with 100% relative humidity under 5% CO_2 atmosphere. After incubation, COCs were examined under a stereomicroscope (EMZ-13TR, Meiji Techno Co. Ltd) at 50x magnification and were divided into two groups according to oocyte cytoplasm coloration: oocytes that have terminated the growth phase, having low G6PDH enzyme activity, will retain the stain in the cytoplasm and appear blue (classified as BCB +), oocytes still in the growth phase, having high levels of G6PDH activity, will appear colorless (classified as BCB -). COCs from different cytoplasm staining groups were washed several times in M16 medium in order to remove any remaining stain and were then submitted to IVM or vitrification, depending on the experiment.

5.3.5 Vitrification and Warming

Cumulus-oocyte complexes were exposed to equilibrium solution composed of 2.7 M ethylene glycol (EG) diluted in mPBS and cryoprotective solution composed of 5.4 M EG, 0.5 M sucrose, and 0.025 M hyaluronic acid diluted in mPBS (Paim *et al*., 2015). For vitrification, after exposure to cryoprotective solution, COCs were held by capillary action in the tip of a straw with reduced diameter such as an Open Pulled Straw (OPS; Vajta *et al.*, 1998) and immediately plunged directly into liquid nitrogen. Five to ten COCs were stored per straw, which were kept in a 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 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. For warming, OPS were removed from the liquid nitrogen container, kept in the air for 5 seconds and the tip of the OPS capillary was placed in a 400 µL microdrop containing mPBS supplemented with 0.5 M sucrose, releasing COCs into the medium. COCs were kept in the medium for 5 minutes before IVM (Pornwiroon *et al.*, 2006).

5.3.6. *In vitro* Maturation

After washing, COCs were transferred to IVM plates containing 100 µL maturation medium - M16 (Whittingham, 1971) supplemented with 10% FBS, 0.1 IU LH (Chorulan 100 UI Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda), and 5 µg/mL FSH (Foltropin, Intervet International B.V., Boxmeer, Holanda), covered with mineral oil. Ten to fifteen COCs were placed in each microdrop and the plates were maintained in an incubator containing 5% CO_2 atmosphere with 100% humidity at 37°C for 30 hours for maturation.

5.3.7 Parthenogenetic Activation and Embryonic Development

For parthenogenetic activation, COCs were initially exposed to ionomycin calcium salt (5 µM) diluted in mR1ECM medium (Myioshi *et al*., 1995) for 5 min at room temperature. Subsequently, COCs were washed in M2 medium and incubated in 2 mM 6-(Dimethylamino) purine (6-DMAP) diluted in mR1ECM for 4 hours in an incubator containing 5% CO_2 atmosphere with 100% humidity at 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 analyzed after 48 h incubation and subsequent morula and blastocyst rates were analyzed during the next 5 days. Ten to fifteen zygotes/embryos were maintained in each microdrop for parthenogenetic activation and *in vitro* development.

5.3.8 Statistical Analysis

Cleavage, morula, and blastocyst rates were analyzed using Chi-square ($\chi 2$) test, supplemented by adjusted residual calculation, when statistical differences were observed. Fisher's exact test was used to replace Chi-square test when necessary. Differences were considered significant if $p \leq 0.05$.

5.4 Results

5.4.1 Experiment 1

A total of 459 COCs were obtained and used in this experiment that was repeated 6 times. Statistically, cleavage rates were similar in the control group and the BCB groups (Table 1). However, morula rates were lower in 20 µM BCB group compared with the other groups. Blastocyst rates were similar in all groups. When we compared development up to morula stage from the cleaved embryos, statistically higher rates were observed in the 13 µM BCB group compared with the other BCB groups and even with the control group. The percentage of oocytes classified as negative was similar (p=0.2512) between COCs exposed to BCB 13 µM (12/143 - 8.39%) , 16 µM (15/126 -

11.90%) or 20 µM (19/128 - 14.84%). None of the CCOs classified as BCB (-) were able to proceed with *in vitro* embryonic development. Data regarding embryo development of the control and BCB (+) groups are summarized in Table 1.

5.4.2 Experiment 2

The experiment was repeated 5 times, and a total of 437 CCOs were used. As shown in Table 2, in the control group I (fresh COCs), cleavage, morula, and blastocysts rates were statistically higher than the other groups. However, when we compared the rates of morula and morula by cleavage, in BCB (+) and Control II (vitrified), we observed a statistically significant difference between the groups.

Table 1. Evaluation of parthenogenetic activation and embryo development (from cleavage to blastocyst) after morphological assessment and 1 h of incubation with different concentrations of BCB staining in *Rattus norvegicus* cumulus-oocyte complexes (COCs).

Group	COC	Cleavage		Morula		Blastocyst		Morula/Cleavage	
	N	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Control (MA)	108	51	(47.22)	30 [A]	(27.78)	17	(15.74)	30/51 [B]	(58.82)
13 µM BCB (+)	131	55	(41.98)	36 [A]	(27.48)	17	(12.98)	36/55 [A]	(65.45)
16 µM BCB (+)	111	55	(49.55)	27 [A]	(24.32)	14	(12.61)	27/55 [B]	(49.09)
20 µM BCB (+)	109	40	(36.70)	13 [B]	(11.93)	6	(5.50)	13/40 [C]	(32.50)
		p = 0.220		p = 0.015		p = 0.111		p = 0.011	

N= total number of COCs used in each group; n= number of embryos at each stage of embryonic development; % percentage of embryos at each stage of embryonic development; [A, B, C] values with different superscripts within same column are statistically different; MA: selected only by morphological assessment; Data obtained after 6 repetitions.

Table 2. Evaluation of parthenogenetic activation and embryo development (from the first cleavage to blastocyst) after morphological assessment, 13 µM BCB staining incubation and vitrification of *Rattus norvegicus* cumulus-oocyte complexes.

Group	COC	Cleavage		Morula		Blastocyst		Morula/Cleavage		Blastocyst/Cleavage	
	N	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Fresh Control	153	72^{A}	(47.06)	51^{A}	(33.55)	7^{A}	(4.57)	$51/72^{A}$	(70.83)	07/72	(9.72)
Vitrified Control	138	26^{B}	(18.57)	05^{B}	(3.62)	1^{B}	(0.77)	$05/26^{B}$	(19.23)	01/26	(3.84)
Vitrified BCB (+)	122	17^{B}	(13.93)	11^{B}	(9.01)	0^{B}	(0.00)	$11/17^{A}$	(64.70)	0/17	(0.00)
Vitrified BCB (-)	24	4^{B}	(16.66)	0^{B}	(0.00)	0^{B}	(0.00)	$0/4^{B}$	(0.0)	0/4	(0.00)
		p<0.001		p<0.001		p=0.017		p<0.001		p=0.409	

N= total number of COCs used in each group; n= number of embryos at each stage of embryonic development; % percentage of embryos at each stage of embryonic development; $^{A, B, C}$ values with different superscripts within same column are statistically different;, COCs were not submitted to vitrification in fresh control group; In vitrified control group, COCs were selected only by morphological criteria and vitrified with same protocol that BCB + and BCB - groups; Data obtained after 5 repetitions.

289 **5.5 Discussion**

290 To our knowledge, this is the first study using BCB to test the feasibility of *Rattus*
291 *norvegicus* COCs undergoing vitrification, IVM, and *in vitro* embryo development. In an
292 earlier publication by our research group, Alcoba *et al*. (2013) tested 3 concentrations of
293 BCB in immature rat COCs, showing the applicability of BCB staining in this species.
294 However, the ideal concentration for this technique was not elucidated and it would be a
295 restriction for subsequent *in vitro* embryonic development of the COCs, since only the
296 oocyte maturation capacity was tested (Alcoba *et al.*, 2013). The present work showed
297 that BCB staining can be used to identify rat COCs that are suitable for use in *in vitro*
298 manipulation techniques, and the best BCB concentration identified was 13 μM, which
299 was superior even to the control group, when the development up to morula stage was
300 compared from the cleaved embryos.

301 Several concentrations of BCB have already been tested in different species
302 (Alcoba *et al.*, 2013; Alm *et al*., 2005; Wongsrikeao *et al*. 2006; Wu *et al*., 2007) and it
303 was observed that higher concentrations of BCB cause poor results, since high
304 concentrations of this stain can negatively affect cell viability (Alcoba *et al.*, 2013). This
305 effect was also verified in the first experiment by the results obtained in the 20 μM group,
306 wherein the development to morula stage by cleavage were the lowest compared to
307 other groups. In the same way, Alcoba *et al*. (2013) showed that in IVM experiments
308 using rat oocytes, among the tested concentrations, the one with the best accuracy and
309 the highest rate of meiosis resumption was 13 μM, which is similar to our results.

310 In the second experiment, better developmental rates were observed up to the
311 morula stage, considering the number of embryos cleaved in the BCB (+) group
312 compared to the vitrified control group (only morphological evaluation), in agreement with
313 Hadi *et al*. (2010) who exposed bovine oocytes to BCB prior to vitrification and IVM. In
314 this work, the authors demonstrated that nuclear maturation rates of oocytes selected
315 using BCB staining were statistically higher than vitrified control group. In the present
316 study, the CCOs of the control group, which did not undergo vitrification, presented

317 similar embryonic development until morula from cleaved embryos. On the other hand,
318 Hadi *et al*. (2010) showed better nuclear maturation rates in their study. It is known that
319 for successful *in vitro* development of IVM/IVF to occur, it is necessary for the oocyte to
320 complete nuclear maturation during IVM in order to undergo normal fertilization (Gandolfi
321 *et al.*, 1995). Based on these observations, we can assume that BCB + COCs present
322 better quality than those of the control group.

323 One explanation for the better results of BCB+ group was higher quality of
324 blastocysts produced from COCs selected by BCB stain observed in bovine and goats.
325 COCs selected by BCB stain formed blastocysts with higher number of total cells,
326 trophectoderm cells (TE), and inner cell mass (ICM) cells, and even the ratio of ICM: TE
327 was significantly higher in BCB+ blastocysts compared with BCB - blastocysts. The total
328 number of blastomeres and the ICM: TE ratio was also significantly higher in the BCB+
329 blastocysts than in control blastocysts (Catalá *et al*., 2011; Su *et al*., 2012). Also, the
330 number of apoptotic cells was lower in the BCB + blastocysts than in the BCB - and
331 control blastocysts (Su *et al*., 2012). Another reason that cannot be ruled out to explain
332 the results of embryonic development up to blastocyst is the subjectivity of the
333 morphological evaluation of COCs (Alcoba *et al*., 2013).

334 None of the CCOs classified as BCB (-) were able to proceed with *in vitro*
335 embryonic development. But, those classified as BCB (+) reached embryonic
336 development up to the morula stage, considering cleaved embryos, at levels higher than
337 the vitrified control. It has been proposed that the low specific activity of G6PDH enzyme
338 found in gametes classified as BCB (+) express more genes related to protein translation,
339 as RPL24 (Ghanem *et al.*, 2007), with growth and follicular development (Tabandeh *et*
340 *al.*, 2012) and the control of mitochondrial DNA copies (Opiela *et al.*, 2010). On the other
341 hand, gametes classified as BCB (-) express more genes related to follicular atresia
342 (PTTG1) with suppression of follicle growth (MSX1) (Ghanem *et al.*, 2007), and
343 apoptosis, when compared to their positive counterparts (Su *et al.*, 2012). In addition,

some transcripts may alter their levels during the maturation process and be influenced by BCB staining (Opiela e Kątska-Książkiewicz, 2013; Lopes *et al*., 2015). Also, blastocysts developed from BCB(+) COC had better quality than BCB (-) and control. Up-regulated expression of SOX2 (key regulator of pluripotency) and caudal-type homeodomain protein, CDX2 (marker of the TE lineage) in the BCB (+) blastocysts may be associated with the higher quality of these embryos (Su *et al*., 2012). Also, down-regulation of Bax in the BCB (+) blastocysts compared with BCB (-) and control blastocysts can explain the lower apoptotic index and higher development of BCB (+) embryos (Su *et al*., 2012).

During our experiments, we observed that after vitrification and warming, a subset of COCs lost the cumulus cells that surround them (observed in COCs of all vitrified groups) and this may have impaired their ability to resume meiosis and proceed with embryonic development. Communication between cumulus and oocyte cells occurs via gap type junctions, which is very important for maturation, fertilization, and subsequent embryonic development (Tanghe *et al.*, 2002; Rienzi *et al.*, 2012). The lack of these cells may have resulted in the low blastocyst development rates in our experiments (Rienzi *et al.*, 2012). Paim (2015) also observed low rates of *in vitro* development of *Rattus norvegicus* embryos, similar to those found in our experiments, even in the control group where the rate of development to the blastocyst stage was only 4.1% (2/49). Low development up to blastocyst stage could be related to the fact that COCs undergo *in vitro* maturation after vitrification and warming, which may decrease the ability to reach more advanced stages of embryonic development (Kim *et al.*, 2014).

The effects of vitrification may appear only after fertilization and embryonic development, and it has not been observed in studies on oocyte maturation after vitrification, as demonstrated by Paim *et al*. (2015). It has been suggested that the vitrification process, including exposure to cryoprotectants and low temperatures, may cause loss of coordination between nuclear and cytoplasmic maturation (Van Blerkom, 1989). Several changes observed in important components required for cytoplasmic and

372 nuclear maturation indicate that undesired affects occur during the vitrification process
373 (Kim *et al.*, 2014).

374 One concern among researchers is about the possible toxic effect that the BCB
375 may have about the female gametes and later embryos. Despite the knowledge of the
376 interaction between the BCB and the G6PDH enzyme, the biochemical basis of this stain
377 metabolism is not yet totally established. It has been suggested that BCB exhibits
378 electron acceptor role during glucose oxidation (Alm *et al.*, 2005).

379 The toxicity of BCB on COCs and embryos is a controversial theme (Opiela e
380 Kątska-Książkiewicz, 2013). Some researchers reported that, apparently, BCB does not
381 affect the viability of oocytes and embryos exposed (Alm *et al.*, 2005; Torner *et al.*, 2008).
382 The safety of the use of BCB staining can be inferred through the observation of normal
383 morphology of blastocysts developed from exposed oocytes, as demonstrated in our
384 study and other authors, indicating that, in some concentrations, BCB has no negative
385 effect on embryonic development (Alm *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*,
386 2013). In addition, birth of cattle, generated by oocytes exposed to BCB have already
387 been reported (Su *et al.*, 2012). However, was observed that exposure to high
388 concentrations of BCB can impaired rat oocyte *in vitro* maturation (Alcoba *et al*., 2013).

389 The results found in the vitrified BCB (+) group were equal to control not vitrified
390 and were superior to control vitrified regarding morula development from cleaved
391 embryos. Among the BCB (+) oocytes, those that underwent cleavage were more
392 successful at embryonic development. Some authors have already demonstrated that
393 selection by morphological criteria in conjunction with BCB staining might be better than
394 morphological selection only, as demonstrated by Silva *et al*. (2013), wherein the
395 development up to the blastocyst stage was higher in the BCB (+) group compared to
396 the control and BCB (-) groups. Similar results were also found by Su *et al*. (2012),
397 wherein *in vitro* development of cloned bovine embryos was superior in the BCB (+)
398 group compared to the control group. Furthermore, Mirshamsi *et al*. (2013) compared
399 the embryonic development of cattle oocytes and zygotes selected by BCB and reported

a higher blastocyst development rate in the BCB (+) oocyte group compared to the other groups (Su *et al.*, 2012; Mirshamsi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2013).

The results of our experiment indicate that additional incubation of *Rattus norvegicus* COCs in 1 h microdroplets in medium with 13 µM BCB maintains viability after *in vitro* maturation, vitrification, and parthenogenetic activation at levels similar to or even higher than morphological evaluation alone. The BCB (+) vitrified group demonstrated that development to the morula stage take into consideration cleaved embryos was superior to the other vitrified groups including the vitrified control.

There are few reports using BCB and vitrification of *Rattus norvegicus* COC in the literature, demonstrating the importance of our study that provides data from these two poorly studied subjects. Further studies on the effect of the BCB test on rat embryos generated by IVF and their gene expression are suggested.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflict of interests.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

5.6 References

ALCOBA, D. D. *et al*. Selection of Rattus norvegicus oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining. **Zygote,** v. 21, n. 3, p. 238-45, Aug 2013. ISSN 1469-8730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791168 >.

ALM, H. *et al*. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brillant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Theriogenology,** v. 63, n. 8, p. 2194-205, May 2005. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15826683 >.

BRAMBILLASCA, F. *et al*. The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. **J Assist Reprod Genet,** v. 30, n. 12, p. 1531-9, Dec 2013. ISSN 1573-7330. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114631 >.

CATALÁ MG *et al*. Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. Reproduction, v.142, n.4, p.517-527, Out 2011. ISSN 1741-7899. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757473>.

DÍEZ, C. *et al*. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. **Reprod Domest Anim,** v. 47 Suppl 3, p. 76-83, Jun 2012. ISSN 1439-0531. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22681301 >.

GANDOLFI, F. *et al*. In Vitro development of preimplantation embryos from domestic species. **Toxicol In Vitro,** v. 9, n. 5, p. 607-13, Oct 1995. ISSN 0887-2333. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20650136 >.

GHANEM, N. *et al*. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. **BMC Dev Biol,** v. 7, p. 90, Jul 2007. ISSN 1471-213X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662127 >.

HADI, H. *et al*. Selection of Immature Bovine Oocytes Using Brilliant Cresyl Blue Enhances Nuclear Maturity after Vitrification. **J Anim Vet Adv,** v. 9**, p.** 2710-2713, 2010.

KIM, S. S. *et al*. The impact of vitrification on immature oocyte cell cycle and cytoskeletal integrity in a rat model. **J Assist Reprod Genet,** v. 31, n. 6, p. 739-47, Jun 2014. ISSN 1573-7330. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24668208 >.

LOPES, E.F. *et al*. Gene Expression of Monocarboxylate Transporters and Oocyte-secreted Factorsin Bovine Cumulus-oocyte Complexes Selected by Brilliant Cresyl Blue. **Reprod Dom Anim**, v.50, n.5, p.763-770, Out 2015. ISSN 0936-6768. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280459 >

MIRSHAMSI, S. M. *et al*. Combination of oocyte and zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental potential to the blastocyst in cattle. **Anim Reprod Sci,** v. 136, n. 4, p. 245-51, Jan 2013. ISSN 1873-2232. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228698 >.

MIYOSHI K. *et al*. Effects of osmolarity and amino acids in a chemically defined medium on development of rat one-cell embryos. **J Reprod Ferti,**. v.103, n.1, p.27-32. Jan 1995. ISSN 0022-4251. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707298>.

OPIELA, J.; KĄTSKA-KSIĄŻKIEWICZ, L. The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). **Reprod Biol,** v. 13, n. 3, p. 177-83, Sep 2013. ISSN 2300-732X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011188 >.

OPIELA J *et al*. Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. **Anim Reprod Sci.** v.118, n.2-4, p.188-193, Abr 2010. ISSN 0378-4820 Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19671488>.

PAIM, L. M. *et al*. Vitrification of Rattus norvegicus immature cumulus-oocyte complexes using hyaluronic acid. **In Vitro Cell Dev Biol Anim,** v. 51, n. 10, p. 995-1002, Nov 2015. ISSN 1543-706X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198050 >.

PAIM, L. M. G. EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUSOÓCITO IMATUROS DE Rattus norvegicus UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE A MATURAÇÃO NUCLEAR E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO. 2015. 111 (Mestrado). Ciências da Saúde, UFCSPA, Brazil.

PORNWIROON, S. *et al*. Vitrification of mouse oocyte using open pulled straws compared with needles. **J Med Assoc Thai,** v. 89, n. 12, p. 2015-20, Dec 2006. ISSN 0125-2208. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17214051 >.

QUINN, P.; BARROS, C.; WHITTINGHAM, D. G. Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. **J Reprod Fertil,** v. 66, n. 1, p. 161-8, Sep 1982. ISSN 0022-4251. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7120180 >.

RIENZI, L. *et al*. **The oocyte.** Human R*eproduction*. 27**:** i2-i21, p. 2012.

SILVA, D. S. *et al*. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. **Zygote,** v. 21, n. 3, p. 250-5, Aug 2013. ISSN 1469-8730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791164 >.

SU, J. *et al*. Oocytes selected using BCB staining enhance nuclear reprogramming and the in vivo development of SCNT embryos in cattle. **PLoS One,** v. 7, n. 4, p. e36181, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558373 >.

TABANDEH, M. R. *et al*. Gene expression pattern of adiponectin and adiponectin receptors in dominant and atretic follicles and oocytes screened based on brilliant cresyl blue staining. **Anim Reprod Sci,** v. 131, n. 1-2, p. 30-40, Mar 2012. ISSN 1873-2232. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391295 >.

TANGHE, S. *et al*. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Mol Reprod Dev,** v. 61, n. 3, p. 414-24, Mar 2002. ISSN 1040-452X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835587 >.

TORNER, H. *et al*. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction,** v. 135, n. 2, p. 197-212, Feb 2008. ISSN 1470-1626. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239049 >.

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,** v. 4, n. 8, p. 883-98, Nov 1989. ISSN 0268-1161. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2693483 >.

VAJTA G. *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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712317>.

WHITTINGHAM D. G. Culture of mouse ova. J **Reprod Fertil Suppl**. 1971 Jun;14:7-21.

WONGSRIKEAO, P. *et al*. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. **Theriogenology,** v. 66, n. 2, p. 366-72, Jul 2006. ISSN 0093-691X. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16414109 >.

WU, Y.-G. *et al*. Selection of oocytes for in vitro maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. **Cell Res,** v. 17, n. 8, p. 722-731, 08//print 2007. ISSN 1001-0602. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.66 >.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho foi o pioneiro em testar diferentes concentrações de corante BCB de *Rattus norvegicus*, para maturação *in vitro,* criopreservação e ativação partenogenética para desenvolvimento embrionário *in vitro*. Considerando os resultados observados em nossos experimentos, podemos concluir que a melhor concentração do corante BCB nesta espécie é de 13 µM e permite selecionar CCOs com maior potencial de desenvolvimento (avaliado pela ativação partenogenética) e também permite a diferenciação de dois grupos de gametas com potenciais de desenvolvimento diferentes: oócitos corados com BCB apresentam melhores resultados do que seus homólogos que permaneceram incolores após exposição ao corante. Ainda apresentou melhores taxas de desenvolvimento após MIV e criopreservação quando comparado ao grupo controle, que passou somente pelo processo de MIV e vitrificação.

Futuros experimentos são necessários para comprovar a eficácia do teste BCB em técnicas de manipulação *in vitro*, analisando outros procedimentos de viabilidade oócitaria, como a fecundação *in vitro*.

Por fim, os resultados do presente trabalho foram obtidos com a utilização de ratas da linhagem Wistar, sendo que diferentes linhagens podem responder diferentemente frente aos protocolos utilizados.

ANEXOS

REGRAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA ZYGOTE

Instructions for contributors

Zygote is an international journal dedicated to the rapid publication of original research in early embryology. It covers interdisciplinary studies in animals and humans, from gametogenesis through fertilization to gastrulation. The scope includes gametogenesis, sperm–oocyte interaction, gamete and embryo physiology, cell polarity, cell–cell interactions, nuclear transfer, haploidization, molecular genetics, developmental genetics, *in-vitro* fertilization, and stem-cell and cryoconservation technologies. **Please note:** papers of a technical nature or which involve industrial-scale IVF are not suitable for Zygote and should be submitted elsewhere.

The editors favour work describing fundamental processes in the cellular and molecular mechanisms of animal development, and, in particular, the identification of unifying principles in biology. New technologies, clinical papers, review articles, debates and letters will become prominent features.

All manuscripts must be submitted online at:

http://mc.manuscriptcentral.com/zygote

Submission of a paper will be taken to imply that it is unpublished and it is not being considered for publication elsewhere. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved) and you will receive a copyright assignment form for signature on acceptance of your paper.

There is no formal restriction on length; however, *Original Articles* and *Reviews* of less than 15000 words are likely to appear sooner than longer ones. *Short Communications* should not exceed 1500 words and *News and Views Commentaries* should not exceed 500 words.

Preparation of manuscripts

Manuscripts should be organised as follows: Title page (with full names and addresses of all authors, a running headline of up to 35 characters, and a contact address with telephone and fax numbers), an Abstract of not more than 250 words followed by 5 Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (combined Results and Discussion may be used for short papers), Acknowledgements, References, Endnotes, Tables and Figure Legends.

Manuscripts should be prepared using SI units.

Figures

Figures should be numbered consecutively as they appear in the text. Any indication of features of special interest should also be included. Figures must be supplied electronically. They must be saved at final publication size and ideally supplied in the

following file formats: halftone figures (black & white, and colour) as TIF files at 300 dpi; black & white line figures as TIF or EPS files at 1000–1200 dpi. PDF format is also accepted. When relevant, photographs should be submitted with proposed reduction or magnification indicated by a scale line on or beside, the illustration. The places for insertion into the text should be indicated in the text as 'Fig. 1' etc. Legends for all illustrations should be typed together, separately from the main text. There is no charge for online publication of colour photographs or figures. More detailed information is available at: www.cambridge.org/core/services/authors/journals/journals-artwork-guide.

Tables

Tables with concise headings should be placed at the end of the paper. Each table must have a text reference, in the form 'Table 1' etc.

References

References should be cited in the text 'as Conklin (1905) showed' or 'as shown (Conklin, 1905)'. For papers with three or more authors, use *et al*. A full list of references in alphabetical order should be given at the end of the text: surname of author and initials; year of publication (in parentheses); title of paper; journal or book name (the former being abbreviated in accordance with the World List of Scientific Periodicals); volume number; first and last page of the reference. For books and conference proceedings, the place of publication and publisher (and editor(s) if appropriate) should be included.

Acknowledgements

You may acknowledge individuals or organisations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

Financial Support

Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH)". Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement: "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

Statement of Interest

Please provide details of all known financial, professional and personal relationships with the potential to bias the work. Where no known conflicts of interest exist, please include the following statement: "None."

Ethical Standards

Where research involves human and/or animal experimentation, the following statements should be included (as applicable): "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional committees on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008." and "The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals."

Open Access

Authors in *Zygote* have the option to publish their paper under a fully Open Access agreement, upon payment of a one-off Article Processing Charge. In this case, the final published Version of Record will be made freely available to all in perpetuity under a creative commons license, enabling its re-use and re-distribution. This Open Access option is only offered to authors upon acceptance of an article for publication. For more information please see www.cambridge.org/core/services/open-access-policies

Proofs

Proofs will be sent to the author for checking. Typographical or factual errors only may be changed at proof stage. The publisher reserves the right to charge authors for correction of non-typographical errors.

Offprints

A PDF offprint of each article will be supplied free to each first named author. Paper offprints may be purchased from the publisher if ordered at proof stage.

U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CEUA UFRGS

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29990
Título: SELEÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS–OÓCITO DE RATTUS NORVEGICUS POR AZUL CRESIL BRILHANTE PARA VITRIFICAÇÃO E MATURAÇÃO IN VITRO

Vigência: 20/10/2015 à 28/02/2017

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA - coordenador desde 20/10/2015
RUI FERNANDO FELIX LOPES - pesquisador desde 20/10/2015

Equipe Externa:

Iaskara Vieira de Oliveira - pesquisador desde 20/10/2015
Joana Fisch - pesquisador desde 20/10/2015
Juliana Fank Gomes - pesquisador desde 20/10/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 72 fêmeas Rattus norvegicus (Wistar), com idade entre 30 e 40 dias, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas e da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 8 de Março de 2016

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética