

LETÍCIA SOARES DE ARAÚJO TEIXEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS OVINOS NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

TERESINA
PIAUÍ-BRASIL
2019

LETÍCIA SOARES DE ARAÚJO TEIXEIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS OVINOS NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

TERESINA
PIAUI-BRASIL
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

T266c Teixeira, Leticia Soares de Araújo
Criopreservação lenta e vitrificação de oócitos ovinos na produção *in vitro* de embriões. / Leticia Soares de Araújo Teixeira – 2019.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

1. Reprodução animal 2. Congelação lenta 3. Produção de embriões
4. Vitrificação I. Título

CDD 636.08926

**CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS OVINOS NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

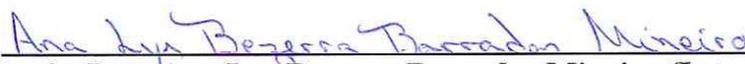
LETÍCIA SOARES DE ARAÚJO TEIXEIRA

Dissertação aprovada em: 25/02/2019

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Janaína de Fátima Saraiva Cardoso (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Pesquisadora. Dra. Tânia Maria Leal (Externa) / EMBRAPA

*A Deus, a meus Pais, Domingos Ferreira
Teixeira e Regina Maria Soares de Araújo
Vieira, a meu esposo, José Augusto Lima Nery
Barbosa, a minha querida Irmã, Luana Soares
de Araújo Teixeira Ferreira e a meus lindos
sobrinhos, Luís Felipe Soares e Maria Helena
Soares*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza, meu refrigerio, minha esperança e a paz que excede todo meu entendimento.

Aos meus queridos pais, Domingos Ferreira Teixeira e Regina Soares de Araújo Vieira, por todo amor, carinho, amizade, paciência e apoio incondicional durante toda minha existência. Pela educação e pelos conselhos maravilhosos nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu amado esposo, José Augusto Lima Nery Barbosa, por ser tão especial em minha vida, companheiro de todas as horas, paciente, amigo e por contribuir diariamente para minha felicidade.

A meus queridos avós maternos e paternos, tios e tias, primos e primas, por todo apoio.

A meu querido padastro, Marconi Vieira da Silva, por todo apoio incondicional.

A minha querida madrastra, Sandra Santiago Teixeira, pelo carinho, orações e conselhos.

A minha irmã, Luana Soares de Araújo Teixeira Ferreira, pela amizade, conselhos e por todo apoio.

Aos meus sobrinhos, Luís Felipe Soares e Maria Helena Soares, por serem a alegria da nossa Família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela excelência na orientação durante os anos de mestrado, por toda paciência, amizade e apoio. Por ser um exemplo de como um bom profissional e educador deve ser, por todos os ensinamentos e conselhos.

A professora Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, por ser uma das melhores pessoas que conheço, por toda paciência ao longo dos anos de graduação nas iniciações científicas, pelos conselhos e pela amizade.

A todos os professores que contribuíram para a concretização dessa conquista, em especial a Profa. Dra. Janaina de Fátima Saraiva Cardoso e ao Prof. Dr. Leonardo Tondello Martins.

A equipe do laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento da Universidade de Fortaleza (Unifor), por toda ajuda e colaboração na conclusão dessa pesquisa, em especial a Matheus Soares Alves, Raul Andrei e Geovani Carvalho Nepomuceno.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal, em especial aos graduandos, Leonardo Lopes Furtado e Clarissa de Castro e Braga pela amizade e pela contribuição na conclusão desse trabalho.

A pós-graduanda, Marlene Sipaúba de Oliveira, pela amizade sincera, paciência, companhia durante toda a realização da pesquisa e pelos bons momentos que passamos juntas nesses dois anos de mestrado.

Ao pós-graduando, Kenney de Paiva Porfirio, por toda ajuda e colaboração na construção e concretização desse trabalho.

Aos amigos, Misael das Virgens Santana, Francisco Felipe Ferreira, Homero Batista, Pedro Henrique, Tuanny Damasceno, Raíssa Costa Amorim e Louis pela amizade sincera e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí por minha formação profissional.

Ao CNPq pela concessão de Bolsa de estudo.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Particularidades do ovário.....	17
2.2 Bases morfofisiológicas do complexo <i>cumulus</i> oócito (CCO).....	18
2.3 Métodos para obtenção de CCO's.....	20
2.4 Classificação dos CCO's.....	21
2.5 Crioprotetores.....	22
2.6 Água de coco em pó (ACP).....	23
2.7 Congelação clássica (lenta).....	24
2.8 Vitrificação.....	25
2.9 Efeito da criopreservação na viabilidade oocitária.....	27
2.10 Análise da viabilidade de oócitos pelo teste do azul cresil brilhante (ACB).....	28
2.11 Análise da integridade de membrana do oócito.....	29
2.12 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	31
2.13 Ativação partenogenética.....	33
2.14 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	34
2.15 Avaliação da viabilidade embrionária após cultivo <i>in vitro</i>	35
3. CAPÍTULO I – CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS OVINOS IMATUROS NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES....	36
Resumo.....	1
1. Introdução.....	2
2. Materiais e métodos.....	3
2.1 Local de realização do estudo.....	3
2.2 Produtos químicos e reagentes.....	4
2.3 Colheita de ovários, obtenção e classificação dos complexos <i>cumulus</i> oócitos (CCO's).....	4
2.4 Congelação lenta dos oócitos e descongelação.....	4
2.5 Vitrificação dos oócitos e desvitrificação.....	5
2.6 Análise da viabilidade oocitária através de sondas fluorescentes.....	6
2.7 Teste do azul cresil brilhante (ACB).....	6
2.8 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	7
2.9 Avaliação da maturação nuclear.....	7
2.10 Ativação partenogenética de oócitos.....	7
2.11 Cultivo <i>in vitro</i> dos oócitos ativados.....	8
2.12 Avaliação das clivagens após cultivo <i>in vitro</i>	8
2.13 Análise estatística.....	8
3. Resultados.....	9
3.1 Taxa de recuperação de complexos <i>cumulus</i> oócitos.....	9
3.2 Avaliação do desempenho de oócitos ovinos criopreservados na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	9
3.3 Análise da competência oocitária na maturação <i>in vitro</i> pelo teste azul cresil brilhante.....	10
3.4 Avaliação oocitária por sondas fluorescentes.....	10
4. Discussão.....	10
5. Conclusão.....	17
Referências.....	17
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

ANEXO A.....	48
ANEXO B.....	49
ANEXO C.....	50
ANEXO D.....	51
ANEXO E.....	52

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Classificação de Complexos <i>Cumulus</i> Oócitos	22
Figura 2	Oócitos ovinos submetidos à produção <i>in vitro</i> de embriões	25
Figura 3	Oócito viável oriundo da congelação lenta avaliado pela sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína	25
Figura 4	Oócito não viável oriundo da vitrificação avaliado pela sonda fluorescente iodeto de propídio	26
Figura 5	Oócito viável oriundo da vitrificação avaliado pela sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína	26

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Análise descritiva com o quantitativo de oócitos ovinos estudados	23
Tabela 2	Análise de oócitos frescos, oócitos submetidos à congelação lenta e vitrificação nas etapas de produção <i>in vitro</i> de embriões ovinos partenogénéticos	23
Tabela 3	Taxa de coloração de oócitos ovinos expostos ao corante ACB por 45 min após avaliação morfológica	24
Tabela 4	Análise da associação entre o teste ACB e os oócitos maturados e imaturos do grupo controle	24
Tabela 5	Análise da viabilidade de membrana de oócitos ovinos através da associação de sondas fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio)	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ACB	Azul Cresil Brilhante
ACB-	Azul Cresil Brilhante Negativo
ACB+	Azul Cresil Brilhante Positivo
ACP	Água de Coco em Pó
BGA	Banco de germoplasma
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
°C	Graus Celsius
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
Ca ²⁺	Cálcio
CCA	Centro de Ciência Agrárias
CCO's	Complexo <i>Cumulus</i> Oócitos
CE	Ceará
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i> (Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo)
6-DMAP	<i>6-Dimethylaminopurine</i> (6-Dimetilaminopurina)
DMPBS	<i>Saline Phosphate Buffered Modified by Dulbecco</i> (Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetilsufóxido
DS	<i>Dilution Solution</i> (Solução de Diluição)
D2	Dia 2
D3	Dia 3
D7	Dia 7
D8	Dia 8
EG	Etilenoglicol
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Fator de Crescimento Epidérmico)
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	<i>Equilibrium Solution</i> (Solução de Equilíbrio)
EUA	Estados Unidos
FDA	<i>Carboxyfluorescein Diacetate</i> (Diacetato de Carboxifluoresceína)

FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio Folículo Estimulante)
GLY	Glicerol
G6PDH	<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i> (Glicose-6-Fosfato Desidrogenase)
GSH	<i>Glutathione</i> (Glutationa)
HEPES	<i>2-Hidroxietyl -1-Piperazinoetanossulfico</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (Fator de Crescimento de Hepatócito)
IGF1	<i>Insulin-Like Growth Factor</i> (Fator de Crescimento semelhante a Insulina-1)
IP	Iodeto de Propídio
kD	Kilodaltons
LBMD	Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormônio Luteinizante)
LOPU	<i>Laparoscopic Ovum Pick-Up</i> (Colheita de óvulo por laparoscopia)
LRA	Laboratório de Reprodução Animal
LTDA	Empresas de Sociedade Limitada
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteína cinase ativada por mitogênio)
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
µg	Microgramas
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
µl	Microlitros
mm	Milímetro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
MO	Missouri
MPF	<i>Maturation Promoting Factor</i> (Fator promotor da maturação)
N ₂	Nitrogênio
N _a Cl	Cloreto de Sódio
NADPH	<i>Nicotinamide and Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina)
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> (Fator de Crescimento do Nervo)
NUBEX	Núcleo de Biologia Experimental
NY	<i>New York</i> (Nova York)
O ₂	Oxigênio

HO	Hidroxila
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução salina com tampão fosfato)
p34cdc ²	<i>Cyclin-Dependent Kinase 1</i> (Ciclina-1 dependente de quinase)
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
%	Porcentagem
PROH	Propanodiol
RNAm	RNA mensageiro
SDF1	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i> (Fator Derivado de Células Estromais)
SOE	Soro de Ovelha em Estro
SOF	<i>Oviduct Synthetic Fluid</i> (Fluído Sintético de Oviduto)
SRD	Sem Raça Definida
St	<i>Saint</i>
TCM	<i>Tissue Culture Medium</i> (Meio de Cultivo Tecidual)
TS	<i>Warming Solution</i> (Solução de Aquecimento)
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UI	Unidade Internacional
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
USA	Estados Unidos
VG	Vesícula Germinativa
VS1	<i>Vitrification Solution</i> (Solução de Vitrificação 1)
VS2	<i>Vitrification Solution</i> (Solução de Vitrificação 2)
WS1	<i>Wash Solution</i> (Solução de Lavagem 1)
WS2	<i>Wash Solution</i> (Solução de Lavagem 2)
ZP	Zona Pelúcida

RESUMO

TEIXEIRA, L. S. A. **CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS OVINOS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**. 2019. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

Objetivou-se avaliar a viabilidade de oócitos ovinos imaturos submetidos à congelação lenta e vitrificação na produção *in vitro* de embriões partenogenéticos. Para tanto, foram colhidos 394 ovários oriundos de 197 ovelhas púberes, provenientes de abatedouros localizados no município de Teresina, PI. Os ovários foram transportados para o laboratório em garrafa térmica, contendo solução salina fisiológica a 37 °C acrescida de 40mg/mL de sulfato de gentamicina. Os ovários foram aspirados utilizando-se um aspirador cirúrgico adaptado, contendo na extremidade de aspiração uma agulha 21G. Foram recuperados 616 CCO's, obtendo-se uma taxa de recuperação de 3,13 CCO's por par de ovários. Após seleção e classificação, os CCO's foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, oócitos destinado a congelação lenta, oócitos destinado a vitrificação e oócitos do grupo controle. Em seguida os CCO's foram desnudados e, então, submetidos à congelação lenta e vitrificação. Após o período mínimo de 30 dias, os oócitos da congelação lenta e vitrificação foram descongelados. Um grupo aleatório de oócitos oriundos da congelação lenta foi submetido ao teste do Azul Cresil Brillante (ACB). 10% dos oócitos criopreservados foram submetidos à análise através da associação de sondas fluorescentes (iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína). Ulteriormente, os oócitos oriundos da vitrificação e da congelação lenta, inclusive os que haviam sido avaliados no teste do ACB, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV). Após 24 horas de MIV, procedeu-se a avaliação da maturação nuclear. Seguidamente, às 28 horas após MIV, os oócitos foram submetidos à ativação partenogenética. Ao término da ativação, com 32 horas, os oócitos foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) durante oito dias. As estruturas em CIV foram avaliadas no D2, D7 e D8. No último dia de CIV, realizou-se a coloração das estruturas com Hoechts 33342. Neste estudo, observou-se que o grupo controle (oócitos frescos) apresentou melhor desempenho nas etapas de produção *in vitro* de embriões, apresentando um maior número de oócitos maturados *in vitro* (47,5%), havendo clivagem no D2 e desenvolvimento embrionário até a fase de mórula, a qual foi evidenciada no D7 e D8 do cultivo *in vitro* (P=0,008). Entretanto, os oócitos oriundos dos grupos congelação lenta e vitrificação, não apresentaram competência de desenvolvimento embrionário *in vitro* (P=0,008). Na análise de sondas fluorescentes o grupo de oócitos da congelação lenta demonstrou integridade de membrana, enquanto que no grupo de vitrificados houve oócitos com membrana íntegra e lesionada (P = 0,280). No teste do ACB houve relação positiva dos oócitos oriundos da congelação lenta em relação à taxa de maturação *in vitro* (P = 0,001). Após criopreservação, os oócitos ovinos imaturos alcançaram a maturação *in vitro*, no entanto, não progrediram no desenvolvimento embrionário. Dessa forma, sendo relevante a realização de mais pesquisas voltadas às técnicas de congelação lenta e vitrificação de oócitos ovinos, a fim de produzir embriões *in vitro*.

Palavras-chave: Congelação lenta; Vitrificação; Partenogênese; Produção *in vitro* de embriões ovinos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, L. S. A. **SLOW CRIOPRESERVATION AND VITRIFICATION OF OOCYTE SHEEP *IN VITRO* PRODUCTION OF EMBRYOS**. 2019. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

The objective of this study was to evaluate the viability of immature sheep oocytes submitted to slow freezing and vitrification in vitro production of parthenogenetic embryos. To this end, 394 ovaries from 197 pubescent ewes were collected from slaughterhouses located in Teresina, PI. The ovaries were transported to the laboratory in a thermal bottle containing physiological saline solution at 37 ° C plus 40 mg / mL of gentamicin sulfate. The ovaries were aspirated using an adapted surgical aspirator, containing at the suction end a 21G needle. 616 CCO's were recovered, obtaining a recovery rate of 3.13 CCO's per ovarian pair. After selection and classification, the CCOs were randomly divided into three experimental groups, oocytes for slow freezing, oocytes for vitrification and oocytes of the control group. Then the CCO's were stripped and then subjected to slow freezing and vitrification. After the minimum period of 30 days, the oocytes from slow freezing and vitrification were thawed. A random group of oocytes from slow freezing was subjected to the Brilliant Cresyl Blue (CBA) test. 10% of the cryopreserved oocytes were submitted to analysis by the association of fluorescent probes (propidium iodide and carboxyphureuretic diacetate. Later, oocytes from vitrification and slow freezing, including those that had been evaluated in the CBA test, were subjected to in vitro maturation (IVM). After 24 hours of IVM, the nuclear maturation was evaluated. Then, at 28 hours after IVM, the oocytes were submitted to parthenogenetic activation. At the end of the activation, at 32 hours, the oocytes were submitted to in vitro culture (IVC) for eight days. The structures in IVC were evaluated in D2, D7 and D8. On the last day of IVC, staining of the structures was performed with Hoechts 33342. In this study, it was observed that the control group (fresh oocytes) presented better performance in the in vitro embryo production stages, presenting a greater number of oocytes matured in vitro (47.5%), with D2 cleavage and embryo development until the morula phase, which was evidenced in D7 and D8 of the in vitro culture ($P = 0.008$). However, oocytes from the slow freezing and vitrification groups did not present in vitro embryo development competence ($P = 0.008$). In the fluorescence probes analysis, the oocytes from slow freezing demonstrated membrane integrity, while in the vitrified group there were oocytes with intact and diseased membrane ($P = 0.280$). In the CBA test there was a positive relation of the oocytes from slow freezing to the in vitro maturation rate ($P = 0.001$). After cryopreservation, immature ovine oocytes reached maturation in vitro, however, they did not progress in the embryonic development. Therefore, it is relevant to carry out more research on the techniques of slow freezing and vitrification of ovine oocytes in order to produce embryos in vitro.

Keywords: Slow freezing; Vitrification; Parthenogenesis; In vitro production of sheep embryos.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o efetivo de ovinos chega a 13,77 milhões de animais (IBGE, 2017). A região nordeste destaca-se na criação dessa espécie, concentrando cerca de 9 milhões (64,2%) de cabeças de ovinos do país. Vale ressaltar que os estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí representam grande parte do número de ovinos na região nordeste, sendo o Estado da Bahia o de maior destaque, apresentando 20,9% do rebanho atual. A região norte, assume posição inferior à região nordeste possuindo cerca de 408, 398 mil cabeças de ovinos, acompanhada pelas regiões sudeste, centro-oeste e sul (IBGE, 2017).

O nordeste brasileiro é caracterizado como uma região vocacionada para desenvolver atividades econômicas envolvendo a espécie ovina, devido principalmente à adaptabilidade desta espécie às condições edafoclimáticas da região. Dessa forma, a ovinocultura é apontada como uma das atividades mais apropriadas para o nordeste (SOUSA, 2016).

Atualmente, com o crescimento do rebanho de ovinos no Brasil, pesquisas na área de biotécnicas aplicadas à reprodução assistida em animais de produção, têm recebido destaque, uma vez que proporciona aumento significativo do número de animais com genética selecionada e de alto mérito zootécnico, auxiliando o melhoramento genético dos rebanhos no Brasil. Nesse contexto, várias pesquisas são realizadas, sobretudo na área de criopreservação de gametas femininos e masculinos, a fim de estabelecer metodologias eficazes para manutenção da integridade e viabilidade celular, minimizando as perdas durante as etapas do processo e durante o período em que as células criopreservadas permanecem armazenadas (CHIAN et al., 2004; BOGLIOLO et al., 2007; CARVALHO et al., 2011).

Na criopreservação de gametas femininos, masculinos e de embriões, existem dois métodos conhecidos, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação clássica ou lenta, método convencional, é caracterizada pela utilização de agentes crioprotetores em baixas concentrações, assim como pela redução gradual da temperatura, comumente controlada por máquina programável. Ao passo que a vitrificação caracteriza-se por ser um método de rápida redução da temperatura, utilizando elevadas concentrações de agentes crioprotetores. Este método evita ao máximo ou não forma cristais de gelo no espaço intracelular, diferindo do que ocorre na congelação lenta, porém, as altas

concentrações de crioprotetores apresentam toxicidade para as células (CARVALHO et al., 2011; PRENTICE; ANZAR, 2011; BANDEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A produção *in vitro* de embriões ainda enfrenta algumas dificuldades, devido a fatores que dificultam a evolução no processo de maturação, fertilização, cultivo e criopreservação, por isso, a eficiência da PIV ainda é baixa quando comparada aos resultados obtidos *in vivo* (COCROMO et al., 2012). Outro fator prejudicial durante o processo da PIV é o estresse oxidativo que ocorre em células de cultivo *in vitro*. Este ocasiona um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de agentes antioxidantes, o que provoca danos às moléculas de DNA das células germinativas (CROCOMO et al., 2012).

Apesar das dificuldades, a produção *in vitro* de embriões (PIV) de pequeno ruminante, em especial de ovinos, já tem avançado consideravelmente quanto a pesquisas científicas, e vem se tornando uma biotécnica reprodutiva de crescimento ascendente, uma vez que possibilita o aumento de rebanhos com raças geneticamente privilegiadas e viabiliza o melhoramento genético nessa espécie (BEZERRA et al., 2014). Além disso, essa biotecnologia pode minimizar problemas como: baixas taxas de fecundação, ocorrência de regressão prematura do corpo lúteo e altos custos relativos a procedimentos cirúrgicos para a colheita e transferência de embriões (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004).

Diante dos benefícios proporcionados pela biotécnica de reprodução assistida, produção *in vitro* de embriões, e da relevância da criopreservação de gametas para formação de bancos de germoplasma, visando uso futuro na PIV, objetivou-se por meio deste estudo, a avaliação da viabilidade de oócitos imaturos de ovinos submetidos à congelamento lento e vitrificação na produção *in vitro* de embriões partenogênicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Particularidades do ovário

Os ovários compreendem a gônada das fêmeas, constituindo-se dentre os segmentos do aparelho reprodutor o mais importante, uma vez que são responsáveis pela produção de hormônios (estradiol, progesterona) indispensáveis para o funcionamento da ciclicidade reprodutiva (ciclo estral), assim como pela síntese de fatores de crescimento e peptídeos, e por ser o órgão que sintetiza e matura o gameta feminino, oócito, para que haja posteriormente a fecundação e perpetuação da espécie (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Desse modo, apresenta duas funções distintas e relevantes, a endócrina e a gametogênica ou exócrina (PONTES, 2015).

A gônada feminina é envolvida externamente pelo epitélio germinativo e por uma túnica albugínea. Internamente é composta por duas regiões, a medular (camada interna) e a cortical (camada externa), na região medular encontram-se os vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, que penetram o órgão através do hilo. A região cortical ou córtex ovariano é formado por células germinativas (ovócitos), células somáticas (células da granulosa e células tecais) e estroma ovariano (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No córtex encontram-se as unidades morfofuncionais, os folículos ovarianos, em diferentes fases de crescimento, os quais albergam em seu interior o gameta feminino em vários estádios de desenvolvimento, podendo estar em estágio de vesícula germinativa (prófase I, subfase diplóteno ou dictióteno da primeira divisão meiótica) ou em fase nuclear de metáfase II (SILVA, 2014).

Observa-se em folículos próximo a ovulação, que as células da granulosa estão dispostas ao redor do ovócito, formando as células do mural externamente ao antro folicular, as células do *cumulus oophorus*, e imediatamente próximo ao gameta feminino, a corona radiata (SILVA, 2015). Dessa forma, as células da granulosa constituem a camada mais interna do folículo. Após esta camada há uma lâmina basal, e em seguida encontram-se as células da teca interna, e mais externamente próxima ao estroma, encontram-se as células da teca externa, as quais são menos especializadas e formadas pelo rearranjo das células do estroma (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Durante o ciclo estral ocorre um fenômeno chamado de dinâmica folicular, caracterizando-se pelo recrutamento de folículos, seleção, divergência e dominância de apenas um ou mais folículos, dependendo da espécie animal. Os folículos que atingem a

dominância tornam-se folículos pré-ovulatórios. Por ocasião da ovulação ocorre a liberação do ovócito secundário, em metáfase II da segunda divisão meiótica, e somente após a fecundação o ovócito completa a segunda divisão meiótica com liberação do segundo corpúsculo polar (PESSOA, 2013). As células foliculares passam por transformações estruturais e de síntese e secreção hormonal, dando origem ao corpo lúteo, o qual produzirá o hormônio progesterona (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2 Bases morfofisiológicas do complexo *cumulus* oócito (CCO)

O complexo *cumulus* oócito é constituído por células especializadas, células da granulosa, células do *cumulus* – as células somáticas que circundam o oócito, células da corona radiata – camada de células imediatamente adjacentes ao oócito, e ovócito ou oócito – gameta feminino. Além dessas células, encontram-se estruturas como, por exemplo, a zona pelúcida – que envolve o oócito externamente criando um espaço entre si e o oócito, o espaço perivitelínico (HAFEZ; HAFEZ, 2004; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

A zona pelúcida é constituída por três glicoproteínas, ZP1, ZP2 e ZP3. Estas desempenham papéis distintos no momento da fertilização. A ZP3 possui uma molécula que se liga ao receptor primário da célula espermática, promovendo a reação acrossomal. Ao passo que a ZP2 está relacionada à ligação secundária do espermatozoide reagido ao oócito. Salienta-se que a união do espermatozoide à zona pelúcida é espécie-específica. Desse modo, as moléculas que constituem a zona pelúcida de um oócito de determinada espécie são reconhecidas apenas por espermatozoides da mesma espécie (LANDIM-ALVARENGA; PRESTES, 2017).

As células somáticas que circundam o oócito desempenham importantes funções no controle da maturação e desenvolvimento do mesmo. Inclui-se como funções relevantes a produção de hormônios ovarianos, que interferem na evolução do desenvolvimento do oócito, produção de substâncias reguladoras e entre outros. Vale ressaltar que na maturação *in vitro* de oócitos, a presença, número de camadas e aparência das células somáticas circundantes, constitui-se em um dos principais parâmetros de avaliação morfológica para seleção de complexos *cumulus* oócitos (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; SOUSA-FABJAN et al., 2014).

Ao nascimento, as fêmeas domésticas, apresentam em seus ovários uma população de folículos pré-antrais, que compõem o estoque de folículos ovarianos ao longo da vida reprodutiva destas. Os oócitos, presentes no interior desses folículos,

passarão por fases de crescimento (estando ainda quiescentes no estágio de vesícula germinativa) e maturação até atingirem competência meiótica e estarem aptos à fertilização (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; SOUSA-FABJAN et al., 2014; LANDIM-ALVARENGA; PRESTES, 2017).

O oócito é ativado, na fase de crescimento folicular, provavelmente por mecanismos de sinalização estimulatória advinda das células do *cumulus*. As células da corona radiata, dispõem-se imediatamente próximas ao oócito, apresentando longas extensões citoplasmáticas que penetram a zona pelúcida e terminam em bulbos associados ao oolema por meio de junções comunicantes. Devido a essas junções há passagem de pequenos metabólicos, nutrientes e substâncias reguladoras oriundos das células do *cumulus* para o oócito (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; DADASHPOUR; KOHRAM; ZAINOALDINI, 2012; SOUSA-FABJAN et al., 2014; LANDIM-ALVARENGA; PRESTES, 2017).

Folículos primordiais albergam oócitos imaturos, que serão ativados e passarão por várias transformações a níveis ultra-estrutural e bioquímico, a fim de alcançarem competência para reiniciar a maturação nuclear. O desencadeamento da maturação nuclear oocitária envolve o reinício da primeira divisão meiótica, conclusão e início da segunda divisão meiótica, ou seja, é necessário que ocorra a progressão da fase G₂ (intervalo entre a síntese de DNA e a divisão celular) para a fase M (divisão celular propriamente dita, meiose). Entretanto, para que essas fases ocorram é necessário que o oócito possua enzimas, como, por exemplo, as fosfatases, cinases, e ocorra a síntese de um RNA mensageiro (mRNA), que codifica para produção do fator intracelular promotor da fase M (MPF). Este é indispensável para a progressão da maturação nuclear do oócito (OLIVEIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2014).

O MPF é composto por uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora, sendo cada subunidade formada por uma proteína, a proteína p34cdc² (34kD) e a proteína ciclina B (45kD), respectivamente. Observa-se que oócitos em fase de crescimento são deficientes em mRNA, que codifica para a síntese do MPF, consequentemente apresentam um nível significativamente baixo da proteína p34cdc², dessa forma, são incapazes de progredir da fase G₂ para a fase M. Contudo, oócitos crescidos ou no final da fase de crescimento, apresentam concentrações adequadas de p34cdc², a qual está em atividade aumentada, e, assim o oócito alcança a competência meiótica. Salienta-se que a enzima, fosfatase cdc25, está diretamente envolvida no

mecanismo de ativação do MPF (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2014).

2.3 Métodos para obtenção de CCO's

A primeira etapa para a produção *in vitro* de embriões é a obtenção dos oócitos. Para tanto, a escolha do método de colheita é de extrema importância visando uma ótima taxa de recuperação das estruturas. A colheita de complexos *cumulus*-oócitos oriundos de ovários de abatedouros, ainda é o principal método de colheita nas espécies domésticas, quando a finalidade é pesquisa, tendo em vista que facilita o alcance de folículos localizados mais profundamente no estroma, os quais podem ser recuperados através da aspiração folicular, por fatiamento do ovário (slicing) ou dissecação dos folículos (SOUSA-FABJAN et al., 2014; FERRAZ et al., 2016; DAMASCENO, 2017).

Ovários provenientes de abatedouros constituem-se de uma fonte abundante de oócitos, apesar das perdas que podem ocorrer durante o processo de punção para obtenção dos CCOs. Nesse método, os ovários são colhidos e transportados em soro fisiológico aquecido (35 a 37°C). Vale ressaltar que o transporte pode levar no máximo três horas até o laboratório onde ocorrerá a manipulação para aspiração dos oócitos. O ideal é que os ovários colhidos sejam conduzidos imediatamente para o laboratório (LIMA VERDE; RONDINA; FREITAS, 2003; PAULA et al., 2008).

De acordo com GOODARZI et al. (2018) o tipo de meio para transporte dos ovários, a temperatura do meio e o tempo de armazenamento durante o traslado, estão entre os principais fatores que afetam a qualidade folicular e oocitária, interferindo na competência do oócito. Dessa forma, o tempo de transporte dos ovários ao laboratório deve ser o mínimo possível, não excedendo uma hora. Ao chegar no laboratório, os ovários devem ser lavados com soro fisiológico e colocados aquecidos em banho-maria contendo um recipiente com PBS, durante todo o período de aspiração. A punção é realizada com uma agulha acoplada a uma seringa ou uma bomba de vácuo. Esta prática é frequentemente utilizada visando a realização de estudos ou pesquisas na área, uma vez que animais de abatedouros geralmente não têm raça definida e apresentam estado sanitário duvidoso (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Além da colheita de oócitos oriundos de ovários de abatedouros, existem outros métodos muito eficazes realizados *in vivo*, como ovum pick-up guiada por laparoscopia (LOPU), punção folicular guiada por ultrassonografia e laparotomia. Dentre esses métodos, a colheita de oócitos guiada por laparoscopia (LOPU) é o que tem

demonstrado maior relevância, pois pode ser realizado várias vezes na mesma doadora, apresentando uma boa taxa de recuperação de oócitos, é menos traumático e de rápida realização (BALDASSARRE et al., 2002, 2003, 2016; BALDASSARRE, 2012).

Segundo BALDASSARRE et al. (2004), para o sucesso da LOPU, as fêmeas doadoras são inicialmente submetidas a protocolos de sincronização do estro e estimuladas com doses de gonadotrofinas. Salienta-se, que para a comercialização de animais a fim de promover o melhoramento genético, as práticas supracitadas são as mais utilizadas e de escolha, visto que se almeja no mercado animais de alto valor zootécnico, econômico e que tenha um histórico sanitário conhecido (SOUSA-FABJAN et al., 2014). Contudo, não se exclui a utilização desses métodos com a finalidade de pesquisa.

2.4 Classificação dos CCO's

A avaliação e classificação morfológica dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's), ainda é um método de escolha, não invasivo, para selecionar estruturas viáveis após a colheita de ovários e aspiração folicular (SOUZA-FABJAN et al., 2014). De acordo com o descrito por STRINGFELLOW e GIVENS (2010), os complexos *cumulus*-oócitos (CCO's) devem ser classificados levando-se em consideração características baseadas na compactação das células do *cumulus*, e homogeneidade e transparência do ooplasma. Com base nos parâmetros de avaliação, os CCO's viáveis enquadram-se nas categorias I e II, sobretudo quando a finalidade é a produção *in vitro* de embriões. Os CCO's de categorias inferiores são descartados (III e IV).

Os complexos *cumulus* oócitos são avaliados em estereomicroscópio e classificados em uma escala de qualidade que varia de I a IV (figura 1), onde os CCO's de grau I caracterizam-se por apresentar *cumulus* compacto e com mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e apresentando coloração marrom. Os de grau II destacam-se como oócitos contendo menos de três camadas de células do *cumulus oophorus*, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo encontrar-se mais concentradas no centro e menos na periferia ou ainda condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, e o ooplasma preenche todo interior da zona pelúcida. Os de grau III são oócitos com presença de *cumulus*, porém já expandidas, ooplasma contraído no interior do espaço perivitelínico, apresentando espaço entre o oolema e a zona pelúcida, assim, com preenchimento irregular no espaço perivitelino. Oócitos

degenerados e fragmentados. Os CCO's de grau IV caracterizam-se pela ausência de células do *cumulus* (desnudos), apresentando ooplasma com cor e granulações anormais e aspecto apoptótico (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010; PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2014).

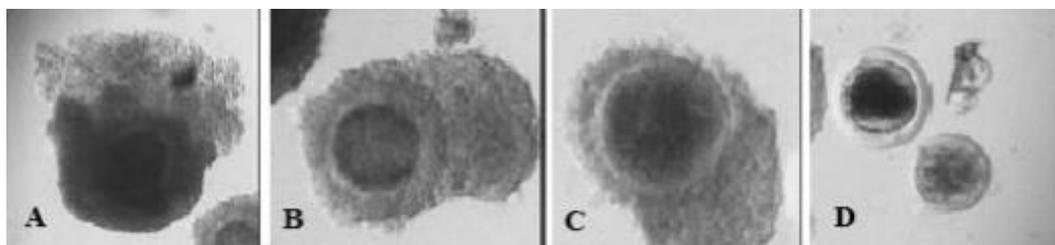


Figura1: Classificação de complexos *cumulus* oócitos. **A:** Grau I; **B:** Grau II; **C:** Grau III; **D:** Grau IV. Fonte: STRINGFELLOW e GIVENS (2010).

2.5 Crioprotetores

Os crioprotetores utilizados na criopreservação de oócitos são classificados em dois grupos, crioprotetores penetrantes (intracelulares) e crioprotetores não penetrantes (extracelulares). Os crioprotetores penetrantes constituem-se de pequenas moléculas que penetram na membrana celular, formando ligações de hidrogênio nas moléculas de água e baixam a temperatura de congelação. Os crioprotetores penetrantes utilizados para criopreservação de oócitos são: etilenoglicol (EG), propanoldiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol (GLY) (SILVA, 2015). Além desses, o metanol e butanodiol são classificados como crioprotetores penetrantes. Vale ressaltar que o glicerol é rotineiramente mais aplicado na criopreservação de sêmen (RODRIGUES et al., 2001).

A utilização dos crioprotetores previne à formação de cristais de gelo no espaço intracelular, entretanto, a utilização destes em elevadas concentrações nas soluções de vitrificação são tóxicas para a célula. Enquanto os crioprotetores penetrantes penetram a célula por possuírem baixo peso molecular através de difusão passiva, os não penetrantes, permanecem no espaço extracelular, viabilizando a remoção de água livre no interior da célula e conseqüentemente sua desidratação. Têm-se como crioprotetores não penetrantes a trealose, glucose e sucrose (RODRIGUES et al., 2001; SILVA; GUERRA, 2011; SILVA, 2015).

Existem quatro tipos de crioprotetores testados em pequenos ruminantes (ovinos e caprinos), etilenoglicol (EG), glicerol (GLY), dimetilsulfóxido (DMSO) e o propanoldiol (PROH). Dentre esses crioprotetores, o que mais tem recebido destaque

quanto a utilização é o crioprotetor penetrante, etilenoglicol (EG), demonstrando elevadas taxas de sobrevivência embrionária, aproximando-se àquelas obtidas com embriões frescos. Verifica-se que a criopreservação deve ser utilizada de preferência nos embriões em estágio de mórula compacta até blastocisto, visando uma maior segurança sanitária na inovulação, pois há presença de zona pelúcida, bem como, por apresentar maior sobrevivência após a transferência dos embriões para as fêmeas receptoras (NICACIO, 2008; CARRILHO, 2013).

O dimetilsulfóxido (DMSO) interage com as membranas, possuindo boa permeabilidade celular através do processo de difusão, previne adequadamente a formação de cristais de gelo intracelular, forma três pontes de hidrogênio com as moléculas de água e induz o estreitamento da membrana celular. Assim, resultando em aumento da fluidez da membrana lipídica, favorecendo a livre movimentação das moléculas crioprotetoras e de água através da membrana plasmática. Todavia, em elevadas concentrações, o DMSO pode levar a formação de poros na membrana celular, gerando como consequência a desintegração da bicamada lipídica (CASTRO et al., 2011; RAKHA et al., 2018).

O etilenoglicol ou monoetilenoglicol é um álcool que possui dois grupos de hidroxila (OH), obtido a partir da hidrólise do óxido de eteno, pode ser empregado como anticongelante em sistemas de refrigeração automotivos. Esse álcool tem sido requerido e aplicado como agente crioprotetor penetrante (intracelular), uma vez que apresenta propriedades, como, baixo ponto de fusão (-15,6°C), baixo peso molecular (62,7 g/mol), alta permeabilidade e baixa toxicidade. Esta propriedade explica a vasta utilização do etilenoglicol na criopreservação de oócitos maturados e oócitos imaturos (CASTRO et al., 2011; SILVA; GUERRA, 2011).

2.6 Água de coco em pó (ACP®)

A água de coco ou líquido endospermico do coco é comumente denominada de solução, uma vez que é constituída por uma variedade de nutrientes. Caracteriza-se por ser uma solução pouco ácida e estéril, rica em proteínas, sais minerais, fatores de crescimento (fitormônios), vitaminas e menos enriquecida de fosfolipídeos (NUNES; SALGUEIRO, 1999; PINTO et al., 2015). Os fatores de crescimento, presentes na água de coco, apresentam propriedades semelhantes às citocinas e auxinas, assim, favorecendo divisões celulares nos vegetais e em microrganismos, bem como, regulando seu crescimento. Em estudos posteriores evidenciou-se que a auxina,

encontrada na água de coco, era o ácido 3 indol-acético (LETHAM, 1974; NUNES; SALGUEIRO, 1999).

Tendo em vista as várias particularidades benéficas encontradas na água de coco, trabalhos vêm sendo conduzidos para avaliar a eficácia da água de coco na preservação de enxertos teciduais para transplante. Nessa perspectiva, estudo realizado com ratas Wistar, submetidas a procedimento cirúrgico para retirada de ovários, baço e fragmento de pele, a fim de avaliar a conservação dos mesmos em soluções de ringer lactato, solução de belzer, água de coco maduro, água de coco verde e água de coco modificada, obteve-se como resultado eficiência equivalente das soluções à base de água de coco em relação às demais, na preservação dos órgãos e pele de ratas, durante seis horas. Verificou-se também que as soluções de água de coco preservaram a vitalidade tecidual dos órgãos e pele de ratas, mantendo sua função (CÉSAR et al., 2015).

Pesquisas desenvolvidas revelam que a utilização da água de coco como diluidor de sêmen de pequenos ruminantes (caprinos e ovinos), melhora a qualidade *in vivo* e *in vitro* do sêmen, assim como, favorece a fertilidade e prolificidade de fêmeas caprinas e ovinas inseminadas com sêmen diluído em água de coco (NUNES; SALGUEIRO, 1999). No entanto, devido a algumas limitações como, por exemplo, a dificuldade de armazenamento por um longo período de tempo, a indisponibilidade do fruto em determinadas regiões e, principalmente, a variação existente na constituição bioquímica entre os frutos, há um comprometimento significativo nos atributos positivos da água de coco como diluente seminal (CAVALCANTE et al., 2014).

Nesse contexto, por meio de pesquisas e estudos desenvolveu-se um bioproduto, a água de coco em pó (ACP[®], ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil), a qual é obtida a partir da desidratação da água de coco. A ACP[®] tem como relevante característica, a padronização e a estabilização das propriedades bioquímicas da água de coco. Portanto, passou a ter maior longevidade e estabilidade quando comparada à água de coco *in natura*. As características bioquímicas da água de coco foram preservadas na ACP[®], de modo que vem sendo amplamente utilizada como diluidor e conservador de sêmen em diversas espécies de animais doméstico, em peixes e até mesmo em espécies silvestres (CAVALCANTE et al., 2014; SALGUEIRO; NUNES, 2012).

2.7 Congelação clássica (lenta)

Os protocolos de congelação clássica, tradicional ou de equilíbrio ainda são muito difundidos no mundo, visando a criopreservação de embriões e óocitos para formação de bancos de germoplasma animal (BGA). Essa técnica foi criada em 1972 por Whittingham, e desde então tem sido uma ferramenta importante para o crescimento da criotecnologia na reprodução animal (LUCCI; DALCIN, 2010). Apesar de possuir significativos benefícios testados em estudos, a criopreservação lenta, apresenta características desfavoráveis, como, por exemplo, a formação de cristais de gelo no espaço intracelular (PRENTICE; ANZAR, 2011).

A realização do método de criopreservação lenta requer equipamentos programáveis de elevado custo. Essa técnica tem como princípio o equilíbrio progressivo entre os crioprotetores e o compartimento interno líquido. Dessa forma, é necessário inicialmente um pré-equilíbrio e exposição dos embriões a uma solução crioprotetora, para que posteriormente estes sejam submetidos à queda de temperatura em máquina programável, e por fim sejam transferidos para o nitrogênio líquido (LUCCI; DALCIN, 2010; SERAFIM et al., 2012).

O processo de congelação lenta é monitorado por uma curva previamente estabelecida. Nessa técnica, os embriões passam por banhos em meio de congelação contendo concentrações crescentes de EG: 0,5M, 1M e 1,5M, sucessivamente e durante cinco minutos. Em seguida, os mesmos são acondicionados em palhetas de polipropileno de 0,25 mL. Após esta etapa, as palhetas são colocadas em equipamento de congelação programável para início das diferentes fases da congelação, a saber: resfriamento, cristalização (seeding), nova redução de temperatura e, por fim, imersão da palheta em nitrogênio líquido. A fase de resfriamento ocorre a uma velocidade de 3 °C/ minuto até alcançar a temperatura de -7°C, sendo mantida por dez minutos. Dentro desse tempo deve-se realizar a cristalização. Em seguida, novo resfriamento até obter-se a temperatura de -35°C. Finalizadas essas etapas as palhetas podem ser colocadas em nitrogênio líquido (VAJTA; NAGY, 2006; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

2.8 Vitrificação

O método de vitrificação tem sido utilizado nos laboratórios com boas perspectivas por ser prático, fácil e de rápida execução quando comparado ao protocolo da congelação lenta. A vitrificação não necessita do uso de equipamentos de alto custo, e os embriões e óocitos à medida que são colhidos podem ser vitrificados (VAGARO et

al., 2009). Além desses benefícios, dentre as técnicas de criopreservação, a vitrificação é amplamente requerida como método de escolha para criopreservar oócitos de animais e humanos, principalmente, porque gera menos danos aos embriões e oócitos do que o congelamento lento (MOAWAD et al., 2018; SUCCU et al., 2018). Essa técnica, diferentemente da criopreservação lenta, baseia-se no não equilíbrio, evitando ao máximo a formação de cristais de gelo durante a etapa de resfriamento, transformando a fase líquida do citoplasma celular em fase sólida amorfa, denominada também de estado vítreo (BANDEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A fase sólida amorfa, evidenciada na vitrificação, ocorre devido ao uso de crioprotetores em elevadas concentrações (6M, 7,5M, 15M, 16,5M), desse modo, induzindo a uma forte viscosidade do meio, com velocidades rápidas para resfriamento e aquecimento. Apesar da não formação dos cristais de gelo no interior do citoplasma, a vitrificação, apresenta a toxicidade como malefício às células embrionárias e oócitos, em virtude das elevadas concentrações das soluções crioprotetoras utilizadas (MEZALLIRA et al., 2002; LEMOS, 2010; LUNARDI et al., 2016; SANAEI et al., 2018; SUCCU et al., 2018).

Na criopreservação de oócitos de ovelha por vitrificação, os crioprotetores mais utilizados são os penetrantes: etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (SUCCU et al., 2018; SANAEI et al., 2018). Estes são usados em associação visando minimizar a toxicidade que possuem para a célula, quando em elevadas concentrações. Além disso, é importante a utilização de substâncias menos tóxicas para expor previamente às células (oócitos) a concentrações mais baixas de crioprotetores, assim como reduzir o tempo de exposição aos meios de vitrificação (SILVA, 2015).

Dentre os principais danos observados após o processo de vitrificação e pós aquecimento, estão os estruturais e funcionais do ooplasma. Essas alterações são definidas como as causas que justificam a baixa competência observada em oócitos vitrificados, as quais são consequência das altas concentrações de crioprotetores e elevado tempo de exposição aos mesmos. Infere-se que disfunções nas mitocôndrias e alterações na sua distribuição pelo ooplasma, podem ocorrer em oócitos vitrificados, enquadrando-se como importantes alterações funcionais. Esses distúrbios acarretam em níveis reduzidos de ATP intracelular. Além das alterações mitocondriais, podem ocorrer danos ao sistema antioxidante, levando ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Entretanto, estudos recentes demonstram que oócitos vitrificados/descongelados, após algumas horas, têm restauração dos danos induzidos

pela vitrificação, tornando-se aptos para fertilização (YAN et al., 2010; MANIPALVIRATN et al., 2011; SUCCU et al., 2018).

2.9 Efeito da criopreservação na viabilidade oocitária

No decorrer do processo de criopreservação tanto por vitrificação como por congelamento tradicional, inúmeras lesões podem ocorrer no oócito, como, por exemplo, lesões em consequência à formação de cristais de gelo no espaço intracelular e pelo estresse osmótico. Dentre as principais lesões funcionais e morfológicas já observadas na estrutura oocitária estão: a ruptura de zona pelúcida, que compromete significativamente a sobrevivência e o posterior desenvolvimento do oócito; comprometimento da integridade da membrana plasmática; interrupção da comunicação por junções intercomunicantes entre as células do *cumulus* e o oócito; alterações na conformação do citoesqueleto, por despolimerização dos microtúbulos do fuso acromático e perda de microtúbulos; diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias, sobretudo da membrana interna e consequentemente redução da concentração de ATP intracelular (SILVA, 2015; PARNPAI et al., 2016; YURCHUK; PETRUSHKO; FULLER, 2018).

Os oócitos são mais sensíveis a crioinjúrias do que os embriões, uma vez que os vários blastômeros presentes no embrião em estágio inicial de desenvolvimento fornecem flexibilidade para compensar os efeitos deletérios da criopresevação, pois são células totipotentes (HOSSEINI; NASR-ESFAHANI, 2016; YURCHUK; PETRUSHKO; FULLER, 2018).

Uma questão importante na criobiologia do oócito é a necessidade de um tempo de repouso após descongelamento ou desvitrificação com duração de uma a quatro horas para que o mesmo recupere sua integridade e reverta os danos causados pela criopreservação. Isso deve ocorrer imediatamente antes do oócito ser submetido a um novo tratamento. Dessa forma haverá repolimerização de microtúbulos e a recuperação do fuso (HOSSEINI; NASR-ESFAHANI, 2016; SUCCU et al., 2018).

De acordo com estudos a respeito do efeito da criopreservação nas características ultraestruturais dos oócitos, evidencia-se que a estrutura altamente organizada do oócito fresco sofre significativas mudanças em vários níveis celulares, moleculares e na ultraestrutura após a criopreservação, conferindo ao oócito criopreservado características celulares diferentes das de um oócito fresco. Nesse sentido, foi reportado que a causa da baixa competência de oócitos vitrificados se dá

pelas insuficiências citoplasmáticas, sendo relevante a formulação de protocolos adequados para minimizar esses problemas (HOSSEINI; NASR-ESFAHANI, 2016).

Observa-se que as mitocôndrias normais são arredondadas ou de forma oval com cristas periféricas ou transversais, no entanto, mitocôndrias danificadas em virtude do processo de criopreservação perdem sua forma normal e tornam-se edemaciadas e com alterações nas cristas. Já o espaço perivitelínico aumenta de tamanho e as projeções e o número das microvilosidades diminuem após a criopresevação. Os grânulos corticais em oócitos frescos na metáfase II estão dispostos como esferas abundantes alinhadas na periferia do oócito. Porém, após criopreservação, estes dispõem-se no ooplasma de forma descontínua e sua quantidade e densidade são anormalmente reduzidas, devido a exocitose no espaço perivitelínico, gerando o endurecimento da face interna da zona pelúcida. Ressalta-se ainda que oócitos em metáfase II após criopresevação podem apresentar anormalidades no fuso meiótico (HOSSEINI; NASR-ESFAHANI, 2016).

Além dessas alterações, a criopreservação pode influenciar a segregação inadequada dos cromossomos homólogos na meiose I, segregação incorreta das cromátides na meiose II e até mesmo segregação anormal na mitose após formação do zigoto. Essa distribuição incorreta dos cromossomos ou das cromátides que levam ao aumento ou diminuição de um tipo de cromossomo recebe o nome de aneuploidias (YURCHUK; PETRUSHKO; FULLER, 2018).

2.10 Análise da viabilidade de oócitos pelo teste do azul cresil brilhante (ACB)

A avaliação e seleção de complexos *cumulus* oócitos (CCO's) tomando-se como base a morfologia, o diâmetro folicular, aparência do oócito, homogeneidade do ooplasma e número de camadas de células do *cumulus*, constituem-se de parâmetros indispensáveis, entretanto, não são suficientes para determinar a viabilidade da célula e sua competência para maturação. Diante disso, a fim de obter maior confiabilidade na análise e seleção de CCO's, critérios moleculares e bioquímicos têm sido elencados em pesquisas na atualidade (ARROYO, 2008; ALCOBA, 2013). Assim, na busca por métodos não invasivos de avaliação e seleção de CCO's, o teste do azul cresil brilhante (ACB), tem sido o de escolha, direcionando uma seleção mais precisa de CCO's viáveis à maturação *in vitro* (MIV) (ARROYO, 2008; OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017).

Entende-se que durante o crescimento e capacitação do oócito, ocorrem inúmeros eventos intracelulares, como a alteração da atividade de algumas enzimas indispensáveis para o metabolismo oocitário. Uma enzima destaca-se nesses eventos

metabólicos, a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH). Esta enzima apresenta elevada atividade no período de crescimento oocitário. No entanto, ao findar a fase de crescimento, sua atividade diminui consideravelmente (ALCOBA, 2013; AZARI-DOLATABAD et al., 2016; OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017).

Em trabalhos anteriores avaliando oócitos de murinos, demonstraram que há relação linear direta entre o diâmetro do oócito e a atividade da enzima G6PDH, sendo que o aumento da atividade enzimática cessa quando o gameta atinge um diâmetro de aproximadamente 85µm. Além disso, verificou-se que o oócito continua aumentando de diâmetro, enquanto que a atividade da enzima G6PDH alcança um platô. Nesse contexto, sugere-se que gametas incompetentes para a maturação *in vitro*, por estarem em estádios iniciais de crescimento, possuem maior atividade específica da enzima G6PDH, divergindo dos gametas crescidos, uma vez que já concluíram a fase de crescimento e capacitação, apresentando atividade específica da enzima G6PDH diminuída (ALCOBA, 2013; AZARI-DOLATABAD et al., 2016; SANTOS et al., 2016; OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017).

A enzima G6PDH atua no metabolismo da glicose através da via das pentoses fosfato, fornecendo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) e ribose, as quais são importantes para o crescimento celular. A seleção de CCO's pelo azul cresil brilhante (ACB) permite avaliar a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017).

Os CCO's em fases iniciais de crescimento apresentam elevada atividade desta enzima, nos quais evidencia-se durante o teste do azul cresil brilhante (ACB), ooplasma sem alteração de cor, pois a enzima G6PDH tem a capacidade de converter a coloração do ACB de azul para incolor, ou seja, nesses casos há redução do corante. Já em CCO's crescidos, que concluíram a fase de crescimento, apresentam menor atividade da enzima G6PDH, e ao serem submetidos ao teste do ACB o ooplasma apresenta-se corado de azul. Como resultado deste ensaio tem-se: CCO's submetidos ao azul cresil brilhante positivos (ACB+, os que se coram de azul), CCO's submetidos ao azul cresil brilhante negativos (ACB -, os que não se coram) e aqueles em que o ooplasma se corou heterogeneamente, os quais são classificados como ACB intermediários (KARAMI-SHABANKAREH; MIRSHAMSI, 2012; ALCOBA, 2013; AZARI-DOLATABAD et al., 2016; SANTOS et al., 2016; OTERO; COSTA; PEREIRA, 2017).

2.11 Análise da integridade de membrana do oócito

A viabilidade celular pode ser analisada de várias formas, como, por exemplo, através de diferentes tipos de corantes produzidos sinteticamente para esta finalidade. Os corantes são substâncias de natureza química, podendo ser encontrados na natureza ou formulados sinteticamente. Estes se fixam a um substrato a nível molecular e podem ser classificados segundo a classe química a que pertencem, assim como as aplicações a que são destinados. Salienta-se ainda que a utilização dos corantes na citogenética clássica e molecular é de elevada importância, pois coram regiões diferentes na mesma célula e distintos grupos celulares para em seguida serem avaliados em microscópio. Além disso, nas células permitem a observação da integridade e presença de organelas citoplasmáticas, membranas celulares, nucléolos, núcleos, vacúolos e entre outros constituintes celulares (BRAMMER; TONIAZZO; POERSCH, 2015).

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um fluorocromo capaz de identificar enzimas, as esterases ativas nas células. A detecção é notável pela coloração verde claro observada no citoplasma. O FDA tem como principal utilidade a análise de células vivas ou não. Este penetra nas membranas celulares por difusão passiva, devido à presença do grupo acetil na composição química de suas moléculas. Logo ao penetrar as membranas celulares de células viáveis (vivas) e alcançar o citoplasma, as moléculas do FDA sofrem ação das esterases, as quais hidrolisam as ligações éster, libertando os vários grupos acetato, assim, promovendo um notável brilho natural da fluoresceína no citoplasma. Isso ocorre em células viáveis, demonstrando que possuem membrana intacta, assim corando-se de verde o citoplasma e de azul o núcleo. Já em células inviáveis (mortas) com membrana danificada não há hidrólise das moléculas nas ligações éster pelas esterases, conseqüentemente não se evidencia o brilho característico da fluoresceína (SOUZA, 2013; BRAMMER; TONIAZZO; POERSCH, 2015; EVANGELISTA et al., 2016).

Na detecção de células não viáveis (mortas) com membrana lesada comumente utiliza-se, em pesquisas e na prática, o iodeto de propídio (IP) como corante de eleição, o qual caracteriza-se por corar de vermelho ou laranja células inviáveis, uma vez que é impermeável a membranas intactas (SOUZA, 2013). Dessa maneira, sendo uma importante ferramenta para selecionar células não viáveis das viáveis. Em pesquisas geralmente se utiliza como corantes o IP (para detectar células com membrana lesada) o diacetato de fluoresceína (FDA) ou o corante Hoechst 33342, sendo estes últimos para detectar células vivas ou viáveis com membrana intacta. Tais técnicas são amplamente aplicadas em estudos para avaliação da integridade da membrana plasmática de células

espermáticas, bem como para avaliar a integridade das células embrionárias de embriões produzidos *in vitro* após criopreservação (LOPES et al., 2005; PRYOR et al., 2011; GUAITOLINI et al., 2012; EVANGELISTA et al., 2016).

2.12 Maturação *in vitro* (MIV)

O gameta feminino, ovócito ou oócito, encontra-se no interior do folículo, unidade morfofuncional do ovário. As células da granulosa envolvem mais internamente o oócito, formando o complexo *cumulus*-oócito (CCO), e mais próximo à zona pelúcida, em íntimo contato com o oócito devido as junções intercomunicantes, encontra-se a corona radiata (ANDRADE et al., 2013). Estas células do *cumulus*, diferentemente das células do mural do folículo, apresentam características peculiares, uma vez que produzem substâncias importantes para os mecanismos de crescimento e maturação do oócito. As células do *cumulus* são essenciais para a maturação citoplasmática do ovócito, por isso na ausência destas, há comprometimento da maturação do ooplasma (OLIVEIRA, 2013; BERROCAL, 2016).

A maturação oocitária, *in vivo*, ocorre próximo a ovulação, devido ao pico de estradiol e conseqüentemente pico pré-ovulatório de LH (hormônio luteinizante), visto que o LH tem a função de completar a maturação final do ovócito até a fase de metáfase II da segunda divisão meiótica, ou seja, reiniciando a meiose I, antes estacionada na fase de prófase I e subfase de diplóteno, dessa maneira, preparando-o para uma possível fecundação. Já a maturação meiótica (maturação nuclear) *in vitro*, inicia-se imediatamente após a retirada do oócito do interior do folículo (ARAÚJO et al., 2014).

Para que haja maturação adequada dos oócitos, é recomendado que os mesmos sejam aspirados do interior de folículos antes da fase de divergência, apresentando diâmetro entre 2 a 8mm, pois oócitos com diâmetro inferior comumente não apresentam capacidade de reiniciar a meiose, comprometendo, assim, a maturação nuclear *in vitro*. Apesar do desenvolvimento de métodos eficazes para a maturação *in vitro* de oócitos, visando à produção de embriões, ainda verifica-se que estão abaixo dos níveis obtidos *in vivo* (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

O processo de maturação envolve inúmeras transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, relacionadas a mudanças bioquímicas e moleculares (SANCHEZ, 2013). Nesse âmbito, infere-se a relevância do papel de duas proteínas cinases citoplasmáticas, o fator intracelular promotor da fase M (MPF) e a proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK), as quais controlam a maturação meiótica dos

oócitos. Elevados níveis destas proteínas induzem ao início do rompimento da vesícula germinativa (VG). Ademais, também são indispensáveis para a manutenção dos oócitos em estágio de metáfase II da segunda divisão meiótica (MOAWAD et al., 2018). Assim, tornando o oócito apto a fecundação monoespermática e posterior desenvolvimento embrionário (SANCHEZ, 2013).

Tem sido descrito, a ocorrência de modificações no número, tamanho e até mesmo na posição de organelas do ooplasma, durante a fase de maturação, como por exemplo, aumento gradativo da quantidade de lipídeos (provável fonte de energia para o desenvolvimento embrionário inicial), compactação do nucléolo, redução do tamanho do complexo de Golgi, alinhamento dos grânulos corticais nas proximidades ao oolema, mitocôndrias localizadas envolta das gotículas de gordura (SOUZA, 2015; CORREIA, 2014).

Observa-se que há modificações relevantes nas células somáticas que envolvem o oócito. As células do *cumulus*, que estão mais próximas ao ovócito, durante a maturação, ficam suspensas em uma matriz de muco rica em ácido hialurônico, o qual é produzido pelas próprias células do *cumulus*. A produção desse ácido é resultante da estimulação de fatores produzidos pelo oócito e pela ação dos hormônios endógenos (OLIVEIRA, 2013; SANTOS, 2015). Esses fenômenos biológicos, promovem a expansão do *cumulus* no período de maturação. Ressalta-se, a importância da comunicação bidirecional existente entre as células do *cumulus* e o oócito, através das junções intercomunicantes, pois auxiliam na passagem de componentes químicos reguladores da maturação oocitária e proliferação das células do *cumulus*, passagem de nutrientes, íons, nucleotídeos e substâncias de baixo peso molecular (CROCOMO et al., 2012).

A maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas, consiste no desafio de desenvolver, *in vitro*, condições similares às encontradas no interior do ovário para que possibilite a maturação nuclear e citoplasmática necessária tornando o oócito apto a ser fecundado. Para tanto, meios são comumente utilizados visando esta finalidade, como, o meio de cultivo tecidual (TCM199) com bicarbonato de sódio tamponado e sais de Earle, o mesmo contém fontes de energia (glicose, glutamina), aminoácidos, vitaminas, minerais, e é frequentemente enriquecido com piruvato de sódio, L-glutamina, compostos de tiol, fatores de crescimento (EGF), hormônios (FSH de 5 a 10 ug/mL, LH de 5 a 10 ug/mL e 1 ug/mL de 17 beta-estradiol), cisteamina, soro de ovelha em estro (SOE) tratado termicamente e sulfato de gentamicina (FREITAS et al., 2007;

PARAMIO; IZQUIERDO, 2016). O processo de maturação ocorre em incubadora a 38,5°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ em umidade saturada, durante 24 horas (BALDASSARRE, 2012; PARAMIO; IZQUIERDO, 2016).

2.13 Ativação partenogenética

O fenômeno reprodutivo denominado de parthenogenesis, oriundo do grego, que significa “nascimento virgem”, compreende um processo observado comumente entre insetos, sobretudo em abelhas. Esse fenômeno já foi evidenciado em alguns vertebrados como, por exemplo, cobras, anfíbios e pássaros. Já nos mamíferos, a partenogênese pode ser desencadeada *in vitro* por ativação do oócito através de agentes físicos (eletro choques e injeção intracelular de CaCl₂) ou por agentes químicos (ionomicina, etanol, ciclohexamida, estrôncio e 6-dimetilaminopurina). Estes agentes são capazes de provocar, no oócito, uma ativação semelhante à promovida pelo espermatozoide no momento da fertilização, como o aumento intracelular de Ca²⁺ pela liberação de cálcio das reservas citoplasmáticas, aceleração da formação pronuclear, corroboração com a inativação do fator intracelular promotor da fase M (MPF) e da proteína cinase ativada por mitogênio (MAPK) (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; BEM, 2009; CHAYA, 2016).

Além do uso de agentes químicos e físicos na ativação partenogenética, pesquisas recentes demonstraram que o acréscimo de fatores parácrinos, como, por exemplo, o fator neurotrófico derivado de células gliais, fator de crescimento semelhante à insulina 1(IGF1), fator de crescimento de fibroblasto 2 e leptina, em meios de cultura, melhoram a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos humanos, assim como, a partenogênese e o desenvolvimento embrionário. A suplementação de meios de maturação *in vitro*, para maturação de oócitos de ovelha, com CTGF, SDF1, NGF e HGF, promove boas taxas de oócitos com extrusão do primeiro corpúsculo polar, expansão das células do *cumulus*, clivagem e desenvolvimento embrionário precoce por partenogênese. Além disso, a combinação desses quatro fatores resulta em maior número de células embrionárias em blastocistos partenogenéticos (WANG et al., 2018).

Os fatores parácrinos acrescidos a meios durante o processo de reprodução assistida otimizam a partenogênese. Entretanto, para que ocorra a ativação do oócito é indispensável o uso de substâncias capazes de desencadear uma cascata de eventos intracitoplasmáticos para o início das clivagens. Nesse sentido, o agente químico de eleição nos protocolos de partenogênese na atualidade é a ionomicina, um ionóforo com

uma importante propriedade biológica, a elevação dos níveis intracelulares de cálcio. Além da ionomicina utiliza-se comumente a proteína 6-DMAP (BEBBERE et al., 2010; CHAYA, 2016; NADRI et al., 2016; GUO et al., 2017; WANG et al., 2018).

Embriões oriundos de partenogênese *in vitro* (partenotos) já foram produzidos de uma variedade de espécies de mamíferos como, por exemplo, camundongos, ovinos, bovinos, suínos, coelhos e macacos. Contudo, ao realizar a transferência de partenotos para fêmeas receptoras verificou-se que o desenvolvimento embrionário não progride, sendo interrompido em determinados estádios de acordo com a espécie. Isso advém de mecanismos inibidores do desenvolvimento de partenotos. Em primatas, o desenvolvimento é censurado na fase de implantação. Esse bloqueio ocorre devido a ausência de genoma paterno, o qual possui genes cruciais para o desenvolvimento de tecidos extra-embrionários, produzindo uma diferenciação anormal e suporte pobre para o crescimento embrionário (PAFFONI et al., 2008; BEBBERE et al., 2010).

Apesar das limitações enfrentadas no desenvolvimento embrionário de embriões partenogenéticos após transferência para fêmeas receptoras, ressalta-se que a ativação partenogenética é uma valiosa ferramenta de estudo, pois permite a obtenção de conhecimentos relevantes quanto a função do genoma paterno e materno no controle inicial do desenvolvimento embrionário. Assim, como proporciona maior entendimento quanto aos mecanismos que ocorrem durante a fertilização e ativação para início das clivagens, permitindo compreender as bases do sistema de sinalização das células (BEM, 2009; CHAYA, 2016).

2.14 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo é a última etapa do processo de produção *in vitro* de embriões. Nessa etapa, diversos eventos devem ocorrer adequadamente para o sucesso da mesma, como, por exemplo, início das segmentações ou clivagens, ativação do genoma embrionário, compactação da mórula até a fase de blastocisto. Vale ressaltar, que embriões em estágios iniciais oriundos da PIV de pequenos ruminantes, não conseguem se desenvolver após a formação de 8 a 16 células em meios de cultura tradicionais (BERNARDI, 2005; FREITAS et al., 2017). O bloqueio do progresso do desenvolvimento embrionário ocorre próximo ao tempo de ativação do genoma embrionário. Devido a isso, suplementam-se os meios de cultivo, principalmente, com soro inativado pelo calor e diferentes tipos celulares (células da granulosa, células epiteliais do oviduto de ovelha) (BERNARDI, 2005; PARAMIO, 2010).

Os sistemas para a etapa de cultivo *in vitro* de embriões, podem ser: sistema com cocultivo de embriões e células somáticas de acordo com o descrito anteriormente, sistema definido ou sistema semi-definido desenvolvido em meio com propósito de suprir as exigências embrionárias. Atualmente, o sistema mais utilizado ainda é o semi-definido, em meio contendo fluído sintético de oviduto (SOF) suplementado com albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos essenciais e não essenciais. O cultivo *in vitro* ocorre em incubadora com temperatura de 38,5°C, atmosfera umidificada de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, durante sete dias. Nessa etapa, os embriões ficam em gotas de 1uL de meio de cultivo sob óleo mineral (LIMA VERDE; RONDINA; FREITAS, 2003; ROCHA et al., 2014; BEZERRA et al., 2014; FREITAS et al., 2017).

2.15 Avaliação da viabilidade embrionária após cultivo *in vitro*

Embriões oriundos de oócitos maturados e fertilizados *in vitro*, geralmente, apresentam desenvolvimento embrionário inferior aos embriões produzidos *in vivo*, independentemente do sistema de cultivo empregado para essa finalidade. Devido a isso, há a necessidade de submeter os oócitos e embriões, no decorrer de cada etapa do processo de produção *in vitro*, à técnicas que possam avaliar a viabilidade do material genético, pois, assim, será possível obter embriões saudáveis e aptos a serem criopreservados e posteriormente inovulados (BERNARDI, 2005).

Existem métodos para avaliação da viabilidade de embriões, como, a avaliação morfológica (presença de blastômeros, cinética de desenvolvimento, formação da blastocele, diâmetro do embrião), avaliação da expressão de genes essenciais, coloração com Giemsa para contagem de células, coloração com o corante Hoechst (33342) para observação em microscopia de fluorescência invertida, avaliação da glutathiona (GSH) intracelular de oócitos, por meio de marcador de fluorescência Cell Tracker Blue - CMF2HC (NICACIO, 2008; COSTA et al., 2010; GUEMRA et al., 2013).

O corante Hoechst 33342 (HO) caracteriza-se por ser permeável às membranas celulares e por emitir fluorescência quando se liga ao DNA das células, mais precisamente nas ligações adenina-timina. Assim, é utilizado para determinar a concentração de DNA, corar núcleos e na avaliação do ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis (SOUZA et al., 2018).

**CAPÍTULO I - CRIOPRESERVAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO DE
OÓCITOS OVINOS IMATUROS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES**

Elaborado de acordo com as normas da Revista *Theriogenology*

(<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>)

1 Criopreservação lenta e vitrificação de oócitos ovinos imaturos na produção *in vitro* de
2 embriões

3 Leticia Soares Araújo Teixeira^a, Misael das Virgens Santana^a, Marlene Sipaúba de
4 Oliveira^a, Leonardo Lopes Furtado^a, Francisco Felipe Ferreira Soares^a, Pedro Henrique
5 Fonseca Silva^a, Kenney de Paiva Porfirio^a, Clarissa de Castor e Braga^a, Raul Andrei de
6 Assis Dantas^b, Matheus Soares Alves^b, Leonardo Tondello Martins^c, Janaína de Fátima
7 Saraiva Cardoso^d, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro^d, Ney Rômulo de Oliveira Paula^{d*}

8 ^aUniversidade Federal do Piauí, *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portella,
9 64049-550, Teresina, PI, Brasil. leticiasoaateixeira@gmail.com,
10 misaelsantana2100@gmail.com, pessoasipauba@yahoo.com.br,
11 kenneymv@hotmail.com, cla_1995@hotmail.com, leofurtado2017@outlook.com,
12 vetfelipeferreira@gmail.com, pedrosilvamedvet@gmail.com

13 ^bUniversidade Estadual do Ceará, *Campus* do Itaperi, 60741-000, Fortaleza, CE, Brasil
14 raul.dantas@aluno.uece.br, matheusalvesdm@gmail.com

15 ^cUniversidade de Fortaleza, Departamento do Núcleo de Biologia Experimental, 60811-
16 905, Fortaleza, CE, Brasil.
17 itm@unifor.br

18 ^dUniversidade Federal do Piauí, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária,
19 *Campus* Universitário Ministro Petrônio Portella, 64049-550, Teresina, PI, Brasil
20 janainadefatima@ufpi.edu.br, lysbarradas@ufpi.edu.br

21 *Autor para correspondência: neyromulo@ufpi.edu.br

22 Resumo

23 A criopreservação de gametas e embriões no processo de produção *in vitro* são
24 ferramentas relevantes na reprodução animal. Desta forma, objetivou-se avaliar a
25 viabilidade de oócitos ovinos imaturos submetidos à congelação lenta e vitrificação na
26 produção *in vitro* de embriões partenogênicos. Para tanto, foram colhidos 394
27 ovários de ovelhas oriundas de abatedouros locais. Os ovários foram aspirados para
28 obtenção dos Complexos *Cumulus* Oócitos (CCO's). Os CCO's foram recuperados,
29 classificados, selecionados (graus 1 e 2), desnudados e, então criopreservados por
30 congelação lenta e vitrificação. Após descongelação, parte dos oócitos da congelação
31 lenta foi avaliada pelo teste do Azul Cresil Brilhante (ACB). 10% dos oócitos oriundos

32 da congelação lenta e vitrificação foram submetidos à análise de viabilidade através da
33 associação de sondas fluorescentes. Posteriormente, os oócitos da congelação lenta e
34 vitrificação, inclusive os avaliados pelo teste do ACB foram submetidos à maturação *in*
35 *vitro* (MIV), ativação partenogenética e cultivo *in vitro*. Observou-se que o grupo
36 controle (oócitos frescos) apresentou melhor desempenho nas etapas de produção *in*
37 *vitro* de embriões, uma vez que um relevante número de oócitos ovinos maturou *in*
38 *vitro* (47,5%), clivando no D2 e apresentando desenvolvimento embrionário até a fase
39 de mórula, a qual foi evidenciada no D7 e D8 do cultivo *in vitro* (P=0,008). Entretanto,
40 os oócitos oriundos dos grupos congelação lenta e vitrificação, não apresentaram
41 competência de desenvolvimento embrionário *in vitro* após descongelação (P=0,008).
42 Na análise de sondas fluorescentes o grupo de oócitos da congelação lenta
43 demonstrou integridade de membrana, enquanto que no grupo de vitrificados houve
44 oócitos com membrana íntegra e lesionada (P = 0,280). No teste do ACB houve
45 correlação positiva dos oócitos oriundos da congelação lenta em relação à taxa de
46 maturação *in vitro* (P = 0,001). Portanto, os oócitos ovinos imaturos submetidos à
47 congelação lenta e vitrificação completaram a etapa de maturação *in vitro*, todavia não
48 evoluíram no desenvolvimento embrionário posterior.

49 Palavras-chave:

50 Vitrificação, Congelação lenta, oócito ovino imaturo, produção *in vitro* de embriões,
51 partenogênese.

52 1. Introdução

53 A criopreservação de gametas e embriões é um recurso potencialmente valioso,
54 pois favorece a preservação de material genético de animais superiores, possibilitando o
55 melhoramento genético, além de ser uma importante alternativa na preservação do DNA
56 de animais com mortes precoces ou com risco de extinção. Desse modo, a
57 criopreservação de gametas e embriões tornou-se parte integrante das biotecnologias de
58 reprodução assistida. Dentre estas, destaca-se a criopreservação de espermatozoides, por
59 ser amplamente utilizada com taxas de sucesso em humanos, assim como em várias
60 espécies de animais [1, 2].

61 Atualmente, existem duas técnicas aplicadas à criopreservação de gametas e
62 embriões: a congelação lenta e a congelação ultra-rápida por vitrificação. Esta tem sido
63 reportada como a técnica mais utilizada e de eleição nos protocolos de criopreservação,

64 uma vez que produz menos danos às células, quando em comparação a técnica de
65 congelamento lenta [3, 2].

66 Observa-se que há influência do estágio meiótico do oócito na capacidade de
67 sobrevivência e desenvolvimento após criopreservação. Estudos demonstram que
68 oócitos de bovinos, suínos, equinos e de humanos em fase meiótica de metáfase II
69 (MII), apresentam maior capacidade de recuperação dos danos oriundos da
70 criopreservação, ao passo que oócitos em meiose I, fase de prófase I e subfase diplóteno
71 (vesícula germinativa-VG) apresentam menor capacidade. Todavia, a criopreservação
72 de oócitos em fase de metáfase II, pode resultar em alteração no fuso meiótico [1, 2].
73 Devido a isso, oócitos em estágio de GV constituem-se de uma alternativa para a
74 vitrificação, uma vez que não possuem fuso meiótico organizado [4].

75 Dentre as biotecnologias da reprodução destaca-se a produção *in vitro* de
76 embriões (PIV), a qual é formada por diferentes etapas conhecidas, como: obtenção de
77 complexos *cumulus* oócitos (CCO's), maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro*
78 (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos até o estágio de blastocisto. Vale ressaltar que
79 a PIV associada à criopreservação de embriões e gametas, têm viabilizado as transações
80 comerciais de bancos de germoplasma, bem como seu transporte livre de contaminações
81 [5,6]. Além disso, a PIV permite um aperfeiçoamento maior nos conhecimentos
82 relativos aos mecanismos bioquímicos, fisiológicos, moleculares e metabólicos
83 envolvidos no desenvolvimento dos oócitos, na fertilização e posterior desenvolvimento
84 embrionário [7, 8, 9].

85 A criopreservação de oócitos maturados é comumente realizada em pesquisas
86 científicas nas várias espécies animais, visando a posterior produção *in vitro* de
87 embriões [10, 11, 12]. Entretanto, trabalhos científicos realizando a criopreservação de
88 oócitos imaturos, a fim de uso futuro na produção *in vitro* de embriões, são produzidos
89 em menor número. Nesse sentido, objetivou-se avaliar a viabilidade de oócitos ovinos
90 imaturos submetidos à congelamento lenta e vitrificação no processo de produção *in vitro*
91 de embriões partenogênicos.

92 2. Material e métodos

93 2.1 Local de realização do estudo

94 A pesquisa foi desenvolvida no Setor de Reprodução Animal, localizado no
95 Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, *Campus* da Socopo,

96 Teresina, Piauí, Brasil, e no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento
97 pertencente ao Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza. Inferi-se
98 ainda que a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
99 Universidade Federal do Piauí sob o protocolo de nº 436/18.

100 2.2 *Produtos químicos e reagentes*

101 Todos os meios e reagentes químicos utilizados foram obtidos da Sigma Aldrich
102 Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA), Thermo Fisher Scientific (Gibco, Grand
103 Island, NY, EUA), Vitrolife (Västra Frölunda, Gotemburgo, Suécia), Cryotech (Ortho
104 Way, Fort Madison, EUA) e IMV Technologies (L'Aigle, Normandia, França).

105 2.3 *Colheita de ovários, obtenção e classificação dos complexos cumulus oócitos* 106 *(CCO's)*

107 Os ovários de ovelhas foram colhidos em abatedouros localizados no município
108 de Teresina, PI. Obteve-se um total de 394 ovários oriundos de 197 ovelhas púberes
109 sem padrão racial definido.

110 Logo após a colheita, realizou-se o transporte dos ovários em solução salina
111 (NaCl a 0,9%) pré-aquecida a 37°C suplementada com 40 mg/mL de sulfato de
112 gentamicina, durante o período de uma hora até o laboratório. Os ovários foram lavados
113 em solução salina (NaCl a 0,9%) e matidos a 37°C. Realizou-se a aspiração dos ovários
114 utilizando um aspirador cirúrgico portátil (Aspiramax[®], Vila Velha, Espírito Santo,
115 Brasil) adaptado, contendo uma agulha de calibre 21 G (0,8 x 25 mm), sob pressão de
116 50 mmHg [13]. Os complexos *cumulus* oócitos (CCO's) foram obtidos a partir de
117 folículos com diâmetro entre 2 mm e 6 mm [14, 13]. Foram aspirados 2 mL de meio
118 (DMPBS, suplementado com BSA a 0,4%), antes da aspiração dos CCO's e fluído
119 folicular, em tubo tipo Falcon.

120 Em seguida, iniciou-se a busca pelas estruturas oocitárias, seleção e classificação
121 em estereomicroscópio sob aumento de 45x, seguindo os critérios morfológicos de
122 avaliação [15]. A qualidade dos CCO's variou de I a IV, sendo os CCO's selecionados
123 aqueles que apresentavam qualidade I e II [15].

124 Foram selecionados 365 CCO's, os quais foram divididos aleatoriamente em três
125 grupos experimentais, sendo 180 CCO's submetidos à congelação lenta, 63 submetidos
126 à vitrificação e 122 CCO's frescos, os quais não foram submetidos à criopreservação,
127 constituindo o grupo controle.

128 2.4 Congelação lenta dos oócitos e descongelação

129 Antes da congelação lenta, os CCO's foram submetidos ao processo de
130 desnudamento das células do *Cumulus* em agitador tipo Vortex (Phoenix Lufenco®
131 AP56, Araraquara, São Paulo, Brasil), durante dois minutos, visando o maior contato do
132 oócito ao meio de criopreservação. Em seguida, os oócitos foram estabilizados em três
133 gotas de 200 µL de etilenoglicol (EG) a 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M, por cinco minutos,
134 respectivamente.

135 Posteriormente ao equilíbrio os oócitos foram envasados em palhetas francesas
136 (IMV Technologies) de 0,25 mL, reunidos em grupos de cinco a dez por palheta, e
137 alocados em uma coluna central, contendo o crioprotetor Etilenoglicol a 1,5 M.

138 A criopreservação dos oócitos foi realizada pelo método de congelação lenta,
139 utilizando máquina de congelação programável (TK 3000®, TK Tec. Congel. LTDA,
140 Uberaba, MG, Brasil), com curva de criopreservação iniciando no primeiro patamar a -
141 6°C, após 2 minutos realizou-se a etapa de cristalização, em seguida iniciou-se a rampa
142 de congelação por 10 minutos com queda de temperatura de 0,5°C por minuto.
143 Posteriormente, o segundo patamar a -32°C foi atingido em torno de 60 minutos. Por
144 fim, as palhetas foram armazenadas em botijão criogênico (-196°C), durante o período
145 mínimo de 30 dias.

146 Na descongelação procedeu-se a sequência inversa ao equilíbrio da congelação.
147 Os oócitos foram avaliados em estereomicroscópio no aumento de 45x, para análise
148 morfológica. Aqueles oócitos com forma esférica e simétrica contendo citoplasma
149 homogêneo e não contraído, foram considerados viáveis, enquanto que oócitos exibindo
150 lesão de oolema, zona pelúcida rompida e/ou citoplasma degenerado foram
151 considerados como não viáveis e descartados para os procedimentos posteriores.

152 2.5 Vitrificação dos oócitos e desvitrificação

153 Os oócitos já desnudos foram vitrificados utilizando-se um kit para vitrificação
154 de oócitos humanos (Cryotech®), seguindo as recomendações do laboratório fornecedor.
155 O kit continha como crioprotetores, etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO) e
156 trealose. Os oócitos submetidos à vitrificação foram alocados em grupos de cinco a dez
157 em soluções de: equilíbrio (ES) por 15 minutos, vitrificação um (VS1) por 30-40
158 segundos e vitrificação dois (VS2) por 10-20 segundos, a temperatura ambiente (25-
159 27°C). Por fim, os oócitos foram transferidos em grupos de cinco a dez por palhetas
160 específicas do kit (Cryotech®) ou envasados em palhetas francesas de 0,25 mL (IMV

161 Technologies), as quais foram submersas em nitrogênio líquido para armazenamento em
162 botijão criogênico, durante o período mínimo de 30 dias.

163 Na desvitrificação (aquecimento), as soluções do kit continham Hepes
164 modificado, hidroxipropilcelulose e trealose. Para execução desta etapa a extremidade
165 das palhetas, contendo os oócitos, foi imersa em soluções de: aquecimento (TS) por um
166 minuto, diluição (DS) por três minutos, lavagem um (WS1) por cinco minutos e
167 lavagem dois (WS2) por um minuto, sequencialmente, a temperatura ambiente.

168 Ao término da desvitrificação, os oócitos foram avaliados em esteriomicroscópio
169 no aumento de 45x. A partir dessa avaliação, os oócitos que apresentavam forma
170 esférica, simétrica e citoplasma uniforme e não contraído, foram considerados viáveis,
171 enquanto que os oócitos exibindo lesão de oolema, zona pelúcida rompida e/ou
172 citoplasma degenerado foram considerados como não viáveis para as etapas posteriores.

173 *2.6 Análise da viabilidade oocitária através de sondas fluorescentes*

174 Os oócitos foram submetidos a um teste para análise da viabilidade [16]. 10%
175 dos oócitos vitrificados e da congelação lenta foram incubados em gota de 30 µL
176 contendo solução de DMPBS com BSA a 0,4%, adicionada de 125 µg/mL da sonda
177 fluorescente iodeto de propídio (IP, Sigma Aldrich) e 0,01 mL da sonda fluorescente
178 diacetato de carboxifluoresceína (FDA, Sigma Aldrich), durante 30 segundos.

179 Posteriormente, os oócitos foram depositados entre lâmina e lamínula
180 previamente aquecidas a 37°C e avaliados em microscópio de epifluorescência (Série
181 BX, *Olympus Latin America inc.*). Os oócitos com ooplasma fluorescente em tom
182 verde-claro com região nuclear azul foram considerados viáveis (membrana plasmática
183 intacta), ao passo que aqueles com ooplasma fluorescente em tom laranja e região
184 nuclear vermelha, foram considerados como inviáveis (membrana plasmática
185 lesionada).

186 *2.7 Teste do azul cresil brilhante (ACB)*

187 Realizou-se o teste do azul cresil brilhante (ACB, Prodlab, Congonhas, São
188 Paulo, Brasil) em amostra de 61 oócitos oriundos da congelação lenta e em amostra de
189 42 oócitos pertencentes ao grupo controle. Para tanto, os oócitos foram incubados em
190 gotas de 26 µM de ACB diluído em DMPBS com BSA a 0,4%, sob 3,5 mL de óleo
191 mineral em estufa (Sanyo, Air-Jacketed CO₂ Incubator Mco-17aic) a 38,5°C, com
192 atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂ por 45 minutos [17].

193 Em estereomicroscópio no aumento de 45x, os oócitos foram avaliados e
194 classificados de acordo com a coloração evidenciada no ooplasma, sendo considerados
195 positivos no teste do ACB aqueles que apresentavam ooplasma de cor azul (ACB+) e
196 negativos no teste ACB aqueles com ooplasma incolor (ACB-). Ulteriormente ao teste,
197 os oócitos ACB+ e os ACB- foram encaminhados à maturação *in vitro*.

198 2.8 Maturação *in vitro* dos oócitos

199 Os oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em grupos de 20 a 25
200 por gota de 100 µL de meio de MIV, contendo TCM 199 suplementado com 10% de
201 soro de ovelha em estro, tratado pelo calor, sais de Earle, L-glutamina e 25 mM de
202 Hepes em placas de cultivo de 35 mm. Os grupos de oócitos foram incubados a 38,5°C
203 em estufa (Sanyo, Air-Jacketed CO2 Incubator Mco-17aic) com atmosfera e umidade
204 controlada, contendo 5% de CO₂, sob 3,5 mL de óleo mineral, durante 24 horas.

205 2.9 Avaliação da maturação nuclear oocitária

206 Os oócitos passaram por avaliação da maturação nuclear (presença ou ausência
207 de extrusão do primeiro corpúsculo polar). Estes foram avaliados em
208 estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão) sob aumento de 45x. Aqueles que
209 apresentavam extrusão do primeiro corpúsculo polar foram considerados como oócitos
210 maturados, e os que não possuíam esta extrusão foram designados como imaturos.

211 2.10 Ativação partenogenética dos oócitos

212 Com o propósito de evitar as variáveis ainda existentes no processo de
213 fecundação *in vitro* da espécie ovina, foi realizada a ativação partenogenética dos
214 oócitos maturados. A ativação química dos oócitos foi realizada após 28 horas da MIV.
215 Para tanto, utilizou-se como substâncias ativadoras: 5 µM de ionomicina, 2 mM de 6-
216 dimetilaminopurina (6-DMAP) e 10 µM de ciclohexamida (Sigma Aldrich), visando a
217 ativação dos oócitos para o início das clivagens. Primeiramente, após 28 horas da MIV,
218 realizaram-se lavagens dos oócitos em cinco gotas de 50 µL de ionomicina a 38,5°C,
219 durante 5 minutos. Em seguida, os oócitos passaram por lavagens em três gotas
220 contendo 6-DMAP, ciclohexamida em meio de cultivo G-1 (Vitrolife) suplementado
221 com 5 mg/mL de BSA (Sigma Aldrich). Imediatamente após, os oócitos foram
222 incubados em meio de cultivo G-1 suplementado com 5 mg/mL de BSA adicionado de

223 6-DMAP e ciclohexamida, a 38,5°C em atmosfera e umidade controlada com 5% de
224 CO₂, sob 3,5 mL de óleo mineral, durante quatro horas.

225 2.11 Cultivo *in vitro* dos oócitos ativados

226 O meio de cultivo *in vitro* utilizado, neste estudo, foi específico para o cultivo *in*
227 *vitro* de oócitos humanos (Vitrolife). Após 32 horas de início da MIV, os oócitos
228 ativados foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em grupos de 20 oócitos por gota
229 de 100 µL de meio de cultivo G-1 (Vitrolife), contendo bicarbonato, albumina de soro
230 humano, ácido hialurônico e gentamicina, acrescido de 5mg/mL de BSA e incubados a
231 38,5°C em estufa (Sanyo, Air-Jacketed CO₂ Incubator Mco-17aic) com atmosfera e
232 umidade controlada, contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob 3,5mL de óleo
233 mineral, durante três dias. Posteriormente, foi realizada a avaliação das clivagens em
234 meio de cultivo G-1 no D2 (48h).

235 No terceiro dia (D3, 72h) as estruturas foram transferidas para gotas de 100 µL
236 de meio de cultivo G-2 (Vitrolife) suplementado com 5 mg/mL de BSA, incubados a
237 38,5°C em estufa (Sanyo, Air-Jacketed CO₂ Incubator Mco-17aic) com atmosfera e
238 umidade controlada, contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob 3,5 mL de óleo
239 mineral, durante cinco dias. No D7 e D8, os oócitos foram avaliados quanto ao
240 desenvolvimento embrionário.

241 2.12 Avaliação das clivagens após cultivo *in vitro*

242 No oitavo dia (D8) de cultivo *in vitro* as estruturas foram submetidas à avaliação
243 em estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão) no aumento de 45x e em microscópio de
244 epifluorescência no aumento de 100x (Nikon, Tóquio, Japão), objetivando a visualização
245 dos estágios embrionários alcançados. Foi utilizada uma solução de 5 µg/mL de
246 Hoechst 3342 (Sigma Aldrich) para coloração e avaliação das estruturas. Estas foram
247 incubadas a 38°C em gotas de 50 µL contendo solução de 5 µg/mL de Hoechst 3342
248 (Sigma Aldrich), sob 3,5 mL de óleo mineral, durante 10 minutos. Posteriormente, as
249 estruturas foram observadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 100x.

250 2.13 Análise estatística

251 Todas as análises foram realizadas através do processador de dados SPSS versão
252 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Os resultados foram avaliados através

253 de testes não paramétricos Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fisher. Foram
254 consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

255 3. Resultados

256 3.1 Taxa de recuperação de complexos *cumulus oócit*

257 Foi recuperado, através da utilização de aspirador cirúrgico portátil
258 (Aspiramax[®]), um total de 616 complexos *cumulus oócit*, obtendo-se uma taxa de
259 recuperação de 3,13 CCO's por par de ovário, bem como 59,3% de taxa de recuperação
260 de CCO's de graus um e dois. Deste total de 616, 365 CCO's foram classificados em
261 graus um e dois. Dos 365 CCO's selecionados na recuperação, 243 foram selecionados
262 e submetidos a duas técnicas de criopreservação, congelação lenta e vitrificação e o
263 restante de 122 CCO's frescos constituíram o grupo controle, como demonstrado na
264 Tabela 1. Vale ressaltar que o escore de condição corporal (ECC) das fêmeas foi em
265 média 2,5.

266 3.2 Avaliação do desempenho de oócit ovinos criopreservados na produção *in vitro* 267 *de embriões*

268 Quanto ao número de oócit viáveis para maturação *in vitro*, o grupo controle
269 (93,5%) destacou-se por apresentar maior número de oócit viáveis ($P < 0,001$).
270 Enquanto que os oócit oriundos da congelação lenta (77,2%) e vitrificação (81%)
271 apresentaram número inferior de oócit viáveis a serem submetidos a MIV (Tabela 2).
272 Além disso, o número de oócit degenerados e/ou com zona pelúcida rompida, durante
273 as etapas da produção *in vitro* de embriões, foi maior nos grupos de oócit
274 criopreservados por congelação lenta e vitrificação, quando comparados ao grupo
275 controle (Tabela 2).

276 A taxa de maturação *in vitro* (MIV) dos oócit submetidos à congelação lenta
277 (5,8%) foi inferior à taxa de MIV do grupo de vitrificação (15,7%) e ambas inferiores à
278 taxa de maturação do grupo controle (47,5%) ($P < 0,001$) (Tabela 2).

279 Todos os oócit maturados foram submetidos e ativados no processo de
280 ativação partenogenética ($P < 0,001$) (Tabela 2).

281 No dia 2 (48h) do cultivo *in vitro*, não houveram clivagens de oócit oriundos
282 dos grupos de congelação lenta e vitrificação, assim como não houve desenvolvimento
283 de blastocistos posteriormente, no D7 e D8, como demonstrado na Fig. 2. Contudo, no

284 grupo controle, houveram 38 (65,5%) oócitos clivados no D2 (48h) (Tabela 2)
285 ($P < 0,001$). Dos oócitos clivados do grupo controle no D2 (48h), oito alcançaram o
286 estágio de mórula (21,05%), não havendo desenvolvimento embrionário até a fase de
287 blastocisto no D7 e D8, de acordo a Fig. 2 (Tabela 2).

288 *3.3 Análise da competência oocitária na maturação in vitro pelo teste azul cresil* 289 *brilhante*

290 Todos os oócitos oriundos da congelação lenta e submetidos ao teste do azul
291 cresil brilhante (ACB) foram considerados negativo (ACB-), apresentando ooplasma
292 incolor (Tabela 3) ($P = 0,001$). Ademais, nenhum dos oócitos ACB- maturaram,
293 corroborando com o resultado do teste. Resultado diferente foi verificado nos oócitos
294 frescos (grupo controle), dos quais 20 foram positivos no teste ACB (ACB+), e cinco
295 maturaram (Tabela 4) ($P = 0,090$). Vale ressaltar ainda que apenas um oócito maturou
296 dentre os 22 oócitos negativos no teste ACB referente ao grupo controle (Tabela 4).

297 *3.4 Avaliação oocitária por sondas fluorescentes*

298 Quanto à análise de viabilidade dos oócitos através da utilização de sondas
299 fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio), como demonstrado
300 na Tabela 5, os oócitos oriundos da congelação lenta apresentaram integridade de
301 membrana plasmática (100%), corando-se de verde-claro (Fig. 3). Ao passo que houve
302 oócitos oriundos da vitrificação apresentando membrana plasmática lesionada (14,3%)
303 corando-se de laranja, e membrana íntegra (85,7%) corando-se de verde-claro, como
304 mostram as Fig. 4 e 5, respectivamente.

305 4. Discussão

306 A taxa de recuperação de CCO's de ovários de ovelhas oriundas de abatedouros
307 é geralmente baixa, sendo na faixa de 2 a 3 CCO's por par de ovários, assim como a
308 qualidade dos mesmos [18].

309 Em estudo objetivando determinar o tipo de sistema e pressão ideal para a
310 recuperação de CCO's ovinos oriundos de ovários de abatedouro, a fim de produzir
311 embriões *in vitro*, identificaram que a pressão durante a aspiração afeta tanto a taxa de
312 recuperação quanto o desenvolvimento embrionário posterior. Ademais, a aspiração
313 utilizando pressão de 25 mmHg e 50 mmHg através de bomba a vácuo ou seringa
314 acoplada com agulha, resultou em elevadas taxas de recuperação de CCO's, enquanto

315 que na produção *in vitro* de embriões a pressão de aspiração de 50 mmHg, assim como
316 a aspiração por seringa e agulha foram igualmente eficazes [13]. Diferindo deste estudo
317 quanto aos grupos de oócitos criopreservados, uma vez que não houve relação
318 satisfatória entre a pressão de aspiração e o desenvolvimento embrionário. No entanto,
319 corroborando com os resultados obtidos no grupo controle.

320 O escore de condição corporal (ECC) das fêmeas do grupo controle seguiu o
321 limite mínimo aceitável para a reprodução, podendo ter refletido negativamente na
322 competência de desenvolvimento embrionário *in vitro* dos oócitos. Tendo em vista que
323 não houve progressão do estágio embrionário de mórula para blastocisto, assim como
324 houve um baixo percentual de oócitos ativados que alcançaram o estágio de mórula. A
325 influência negativa do escore de condição corporal pode ser confirmado, uma vez que a
326 nutrição reflete diretamente na fertilidade dos animais, como, por exemplo, através da
327 disponibilização de nutrientes específicos, os quais são importantes para o crescimento
328 dos folículos ovarianos, maturação oocitária, ovulação, formação do corpo lúteo,
329 fertilização, capacidade de desenvolvimento e sobrevivência embrionária, culminando
330 com o estabelecimento da gestação [19, 20, 21].

331 O baixo número de oócitos maturados e a ausência de desenvolvimento
332 embrionário dos oócitos do grupo congelamento lento pode advir, pelo fato de que a
333 congelamento lento é um método de criopreservação mais bem sucedido e aplicável a
334 embriões de várias espécies animais do que a oócitos, tendo em vista que provoca nestes
335 a formação de cristais de gelo no espaço intracelular [22]. Além disso, a curva de
336 congelamento utilizada, neste estudo, foi específica para criopreservar embriões ovinos,
337 uma vez que ainda não há curva específica para oócitos, podendo ter ocasionado algum
338 dano a estes.

339 Em pesquisa realizando a criopreservação de oócitos bovinos imaturos e
340 maduros, utilizando o etilenoglicol como crioprotetor, concluíram que a congelamento
341 lento não apresentou resultados satisfatórios, assim como, os oócitos não atingiram a
342 maturação *in vitro* mesmo apresentando expansão das células do *cumulus* [23]. Outro
343 estudo relatou a não eficiência da congelamento lento, utilizando o crioprotetor 1,2
344 propanodiol na criopreservação de oócitos bovinos imaturos [24]. Vale ressaltar que
345 este crioprotetor é mais indicado para criopreservação de tecido ovariano, podendo ter
346 influenciado nos resultados [25].

347 Os resultados obtidos no grupo de oócitos vitrificados sugerem que o protocolo
348 de vitrificação utilizado pode ter prejudicado a viabilidade de oócitos ovinos imaturos

349 na produção *in vitro* de embriões, assim como pode ter ocorrido lesões a nível
350 citoplasmático, resultando em comprometimento do desenvolvimento embrionário.
351 Ressalta-se ainda que a exposição de oócitos a elevadas concentrações de crioprotetores,
352 o rápido resfriamento e aquecimento associados ao estresse osmótico durante a
353 vitrificação, contribuem para a expressão alterada de genes, os quais são importantes
354 para a maturação e desenvolvimento dos oócitos [22].

355 Foi demonstrado que CCO's ovinos criopreservados pelo método de vitrificação
356 convencional apresentam grandes vacuolizações distribuídas pelo ooplasma, alterações
357 severas nas junções comunicantes entre as células do *cumulus* e oócito, redução na
358 densidade da matriz mitocondrial, edema mitocondrial, lesões nas membranas
359 mitocondriais e desorganização do ooplasma [26].

360 Não menos relevante, verifica-se que após criopreservação de oócitos podem
361 ocorrer alterações estruturais, lesões no citoesqueleto, danos e disfunções mitocondriais,
362 depleção de ATP, perda da integridade de membrana, lesão de zona pelúcida,
363 distribuição anormal dos grânulos corticais e enrijecimento da zona pelúcida por
364 exocitose prematura dos grânulos corticais [27, 28, 29]. Salienta-se que o
365 desenvolvimento embrionário apoia-se tanto na maturação nuclear quanto na maturação
366 citoplasmática. Dessa forma, os danos causados pela criopreservação podem justificar
367 os resultados encontrados nesta pesquisa, quanto aos oócitos que maturaram, mas não
368 evoluíram para o desenvolvimento embrionário.

369 A fim de investigar o efeito da vitrificação com hélio líquido (LHe) na
370 integridade do citoesqueleto de oócitos bovinos imaturos, [30] observaram que a
371 maioria dos oócitos vitrificados com LHe apresentaram configuração normal do fuso
372 meiótico (estágio de metáfase II), alinhamento normal dos cromossomos e distribuição
373 normal de microfilamentos. Demonstrando que a vitrificação com LHe pode reduzir a
374 ocorrência de crio-lesão no citoesqueleto, viabilizando a competência de
375 desenvolvimento *in vitro* após desvitrificação [30]. Diferindo da vitrificação de oócitos
376 imaturos em nitrogênio líquido (NL), os quais ficam mais susceptíveis a lesões no
377 citoesqueleto [30].

378 Tendo em vista que a síntese proteica é importante para o reinício e continuação
379 da meiose, ressalta-se que lesões em organelas, como, por exemplo, no retículo
380 endoplasmático, ribossomos e no Complexo de Golgi durante a criopreservação, podem
381 prejudicar a síntese proteica ou reduzir o aproveitamento das proteínas pela célula, uma
382 vez que desempenham relevante função no acúmulo e processamento de proteínas [24].

383 Fato este que pode ter ocorrido durante a criopreservação nos grupos de oócitos
384 vitrificados e da congelação lenta, justificando os resultados obtidos.

385 Inferi-se que o estágio nuclear dos oócitos (estágio de vesícula germinativa –
386 VG), neste estudo, pode ter contribuído significativamente para os resultados
387 alcançados. Visto que, há relatos em outros estudos que o estágio meiótico influencia a
388 capacidade de sobrevivência dos oócitos, bem como a fertilização e desenvolvimento
389 embrionário após criopreservação por vitrificação, sendo os oócitos em estágio de
390 metáfase II (MII), os tradicionalmente elencados para procedimentos de criopreservação
391 [4].

392 Os oócitos em fase de metáfase II apresentam maior capacidade de recuperação
393 dos danos causados pela criopreservação do que os oócitos em fase de VG, uma vez que
394 apresentam maior flexibilidade do citoesqueleto, gerando menores lesões de membrana.
395 Os oócitos em fase de VG possuem menor permeabilidade aos crioprotetores do que os
396 oócitos maturados, o que pode refletir em baixas taxas de desenvolvimento [1, 4].
397 Pesquisas indicam que oócitos de búfalo maturados e submetidos à vitrificação
398 apresentam melhores resultados que oócitos imaturos [22]. Fatos estes que corroboram
399 com os resultados obtidos neste estudo.

400 Todavia, alguns trabalhos têm relatado que a vitrificação de oócitos em metáfase
401 II, apresenta como uma desvantagem o desencadeamento de perturbações no fuso
402 meiótico. Por outro lado, oócitos imaturos ou em estágio de vesícula germinativa (VG),
403 por não possuírem um fuso meiótico organizado, seriam uma alternativa para
404 vitrificação, visando evitar lesões no fuso meiótico [31, 4]. Contudo, estes oócitos são
405 sensíveis às baixas temperaturas de congelação, demonstrando que o processo de
406 criopreservação pode prejudicar o potencial de desenvolvimento do oócito,
407 independente da fase nuclear [28].

408 Em pesquisa realizando vitrificação de oócitos ovinos em estágio de vesícula
409 germinativa (VG), [2] obtiveram taxa de clivagem significativamente menor nos grupos
410 de oócitos (VG) vitrificados (2,8% e 30,3% tratados com cafeína em MIV e 4,3% e
411 32,2% sem cafeína em MIV) do que nos grupos controle e toxicidade. O
412 desenvolvimento de mórula no D5 do cultivo *in vitro* foi consideravelmente menor nos
413 grupos vitrificados (24,0% - 24,5%) do que nos grupos toxicidade (45,1%) e controle
414 (41,6%), assim como a taxa de blastocistos obtidos. Dessa forma, concluíram que a
415 vitrificação de oócitos ovinos imaturos (VG) afeta negativamente a qualidade e o
416 desenvolvimento do oócito na maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*

417 de embriões. Essa conclusão colabora com os resultados obtidos neste estudo, uma vez
418 que não houve desenvolvimento embrionário dos oócitos ovinos em estágio de VG
419 oriundos da vitrificação, sugerindo que a vitrificação de oócitos imaturos de ovinos
420 pode prejudicar o desenvolvimento do oócito *in vitro*.

421 Relata-se ainda que ao vitrificarem oócitos ovinos imaturos, [2] obtiveram
422 desenvolvimento embrionário *in vitro*. Resultado diferente foi obtido neste estudo, não
423 havendo desenvolvimento embrionário dos oócitos oriundos da congelação lenta e
424 vitrificação. Isso provavelmente pode ter ocorrido devido aos protocolos aplicados na
425 execução de ambas às técnicas de criopreservação, tendo em vista que na vitrificação
426 utilizou-se um kit para vitrificação de oócitos humanos, e na congelação lenta por não
427 haver uma curva padronizada para oócitos ovinos, fez-se necessário adaptar a curva de
428 criopreservação.

429 Na pesquisa desenvolvida por [32], realizaram a vitrificação de oócitos ovinos
430 após maturação *in vitro* (MIV), acrescentando ao meio de vitrificação ácido
431 etilenoglicol tetraacético. A maior parte dos oócitos vitrificados/aquecidos foi viável,
432 sendo inferior apenas ao grupo controle (100%). Houve presença de clivagem, de
433 mórula e desenvolvimento até a fase de blastocisto, sendo inferior ao grupo controle.
434 Entretanto, não houve diferença significativa quanto à qualidade dos blastocistos
435 resultantes de oócitos vitrificados e oócitos frescos. Diferindo deste estudo, uma vez
436 que não foi evidenciada a presença de desenvolvimento embrionário até o estágio de
437 blastocisto, nos oócitos ovinos imaturos após vitrificação, assim como no grupo
438 controle, no qual houve desenvolvimento até o estágio de mórula.

439 Ao realizarem vitrificação de superfície sólida em oócitos de alpaca após
440 maturação *in vitro*, [33], evidenciaram nos grupos de vitrificados e expostos a soluções
441 crioprotetoras, 58,4% e 68,7%, de oócitos viáveis após vitrificação e exposição a
442 crioprotetores, respectivamente. Resultado superior foi alcançado neste trabalho, ao
443 submeter oócitos imaturos de ovinos a vitrificação, resultando em 81% de oócitos
444 viáveis após vitrificação. Relataram ainda que 39,9% dos oócitos vitrificados e
445 submetidos a ativação por partenogênese, clivaram no segundo dia de cultivo *in vitro*,
446 assim como os oócitos expostos a crioprotetores, os quais foram ativados e
447 apresentaram 49,5% de clivagem no D2. Entretanto, diverge deste estudo quanto as
448 clivagens de oócitos vitrificados e ativados por partenogênese, pois não houve oócitos
449 clivados no D2 do cultivo *in vitro*.

450 Apesar das clivagens no D2 dos oócitos ativados por partenogênese, [33], não
451 obtiveram blastocistos no D8 do cultivo *in vitro* dos oócitos oriundos da vitrificação e
452 expostos a soluções crioprotetoras. Resultado que se assemelha ao deste trabalho, uma
453 vez que não houve desenvolvimento de blastocistos no D8 dos oócitos vitrificados e
454 ativados por partenogênese.

455 A fim de avaliar o efeito da vitrificação na viabilidade de oócitos bovinos
456 ativados quimicamente para a produção *in vitro* de embriões [34], obtiveram 55,1% de
457 oócitos viáveis após vitrificação, 55,3 % de oócitos clivados no D2 e 7,1% de
458 blastocistos no D8 do cultivo *in vitro*. Vale ressaltar que primeiramente os oócitos
459 foram maturados *in vitro* e depois vitrificados. Esses resultados discordam deste estudo,
460 pois um número superior de oócitos vitrificados foi viável (81%) após vitrificação, não
461 evidenciando no D2 clivagem dos oócitos vitrificados e ativados, bem como no D8, no
462 qual não houve presença de blastocistos.

463 No trabalho desenvolvido por [35], realizaram a produção *in vitro* de embriões
464 ovinos, contudo, não submetem os CCO's a criopreservação, e obtiveram blastocistos
465 de grau I, II e III no oitavo dia do cultivo *in vitro*. Posteriormente, os embriões de
466 melhor qualidade foram vitrificados. Diferindo deste estudo, no qual não houve
467 clivagem de oócitos e desenvolvimento de blastocistos no D7 e D8. Assim, demonstra
468 que possivelmente os métodos de criopreservação utilizados em oócitos imaturos de
469 ovinos para uso posterior na produção *in vitro* de embriões, pode ter influenciado nos
470 resultados obtidos.

471 Na produção *in vitro* de embriões ovinos [36], obtiveram 240 embriões
472 produzidos *in vitro*, sem submeter anteriormente os CCO's à criopreservação. Os
473 embriões obtidos foram criopreservados pelo método de congelação convencional e por
474 dois métodos de vitrificação. Diferindo deste estudo, no qual os CCO's foram
475 criopreservados por congelação lenta ou convencional e vitrificação, não obtendo após
476 descongelação e desvitrificação desenvolvimento embrionário *in vitro*.

477 Ao avaliar os embriões após descongelação, aquecimento e transferência, [36],
478 verificaram que a taxa de sobrevivência embrionária da congelação convencional
479 (7,3%) foi significativamente inferior à taxa alcançada nos dois métodos de vitrificação,
480 38,7% e 11,4%. Sugerindo que a congelação lenta que outrora era o método de eleição
481 para embriões, atualmente, tem demonstrado resultados inferiores à vitrificação. Sendo
482 um resultado semelhante ao deste estudo, quanto à eficiência da congelação lenta como
483 método de criopreservação, no entanto, diferindo quanto ao tipo de amostra

484 criopreservada, pois neste trabalho foram criopreservados oócitos imaturos de ovinos,
485 obtendo como resultado ausência de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

486 Pesquisas realizadas em pequenos ruminantes e em bovinos revelaram que
487 oócitos corados com azul cresil brilhante (ACB+) comumente são maiores e mais
488 competentes na maturação *in vitro*, assim como no desenvolvimento embrionário,
489 apresentando baixa atividade de G6PDH, em contrapartida, aqueles não corados (ACB-)
490 são menores, menos competentes na MIV e no desenvolvimento embrionário,
491 apresentando alta atividade de G6PDH [14, 37, 38]. Os resultados dessas pesquisas
492 corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, pois o grupo de oócitos oriundos
493 da congelação lenta submetidos ao teste do ACB, foi negativo (100%), não havendo
494 maturação *in vitro* e conseqüentemente não houve desenvolvimento embrionário,
495 divergindo quanto aos resultados encontrados no grupo controle. Isso indica que os
496 oócitos ainda estavam em fase de crescimento, além dos possíveis danos causados pela
497 criopreservação.

498 Neste trabalho, a análise da viabilidade de oócitos após congelação lenta através
499 do uso da associação de sondas fluorescentes (iodeto de propídio e diacetato de
500 carboxifluoresceína) foi satisfatória, apresentando 100% de oócitos viáveis oriundos da
501 congelação lenta, revelando que a viabilidade e integridade de membrana dos oócitos
502 foi preservada após descongelação. Contudo, discordando dos resultados alcançados
503 após congelação lenta na produção *in vitro* de embriões, visto que apenas 5,8% dos
504 oócitos maturaram, não havendo desenvolvimento embrionário no cultivo *in vitro*. Isso
505 pode ter ocorrido em virtude de alterações ultraestruturais a nível citoplasmático [4, 28,
506 29]. Além disso, houve perdas após descongelação por lesões de zona pelúcida e oócitos
507 com aspecto degenerado, indicando alterações resultantes de crioinjúrias.

508 Oócitos podem ser avaliados não apenas por características morfológicas, mas
509 também através do uso de sondas fluorescentes como, por exemplo, diacetato de
510 carboxifluoresceína e iodeto de propídio, os quais coram células viáveis (vivas) e células
511 não viáveis (mortas), respectivamente [39]. Nesse sentido, 10% dos oócitos oriundos da
512 vitrificação foi submetido à análise através da associação das sondas fluorescentes,
513 iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína, revelando oócitos com membrana
514 lesionada, corados de laranja (IP), e oócitos com membrana íntegra, corados de verde-
515 claro (FDA). Nesse grupo de oócitos, houve relação quanto aos resultados verificados
516 no decorrer da produção *in vitro* de embriões, pois assim como na congelação lenta, um
517 reduzido número de oócitos chegou a maturar, não havendo desenvolvimento

518 embrionário no cultivo *in vitro*. Houve também perdas relativas a lesões de zona
519 pelúcida, lesões de membrana e degeneração de oócitos após descongelação.

520 Objetivando examinar os efeitos de crioprotetores em oócitos de corais
521 (*Echinopora spp.*), [16], utilizaram um ensaio de adenosina trifosfato e coloração
522 simultânea com diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (IP) para avaliar a
523 viabilidade dos oócitos de corais, bem como a integridade de membrana dos mesmos.
524 Relataram os benefícios obtidos com o uso associado das sondas fluorescentes na
525 análise da viabilidade de oócitos, uma vez que o diacetato de fluoresceína marcou células
526 viáveis de verde-claro e o iodeto de propídio marcou células não viáveis (lesão de
527 membrana) de vermelho. Assim como neste estudo, pois o uso associado das sondas
528 fluorescentes permitiu a identificação de oócitos ovinos viáveis após descongelação
529 (100%) e de oócitos viáveis e não viáveis após desvitrificação, 85,7% e 14,3%,
530 respectivamente.

531 Agradecimentos

532 Ao grupo de pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal do
533 Piauí. Ao CNPq pelo auxílio financeiro. A equipe do Laboratório de Biologia Molecular
534 e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza, Ceará.

535 5. Conclusão

536 Os oócitos ovinos imaturos submetidos à congelação lenta e vitrificação
537 completaram a etapa de maturação *in vitro*, porém não evoluíram no desenvolvimento
538 embrionário posterior. Devido a isso, mais estudos são necessários a fim de identificar
539 protocolos de criopreservação mais eficazes, que não comprometam a taxa de
540 maturação *in vitro* de oócitos em estágio de VG, bem como a taxa de desenvolvimento
541 de blastocistos.

542 Referências

543 [1] Fernández-Reyez F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M.
544 Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine
545 oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology* 2012; 64: 261-269.
546 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.02.009>.

- 547 [2] Moawad AR, Choi I, Zhu J, El-Wishy ABA, Amarnath D, Chen W, Campbell KHS.
548 Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model. *Inter J Vet Sci Med* 2018;
549 6: s41-s48. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.01.004>
- 550 [3] Carvalho A A, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.
551 Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de
552 fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet Bras* 2011; 5: 236-248.
553 <https://doi.org/10.21708/avb.2011.5.3.2321>
- 554 [4] Nohalez A, Martinez CA, Gil MA, Almiñana C, Roca J, Martinez EA, Cuello C.
555 Effects of two combinations of cryoprotectants on the in vitro developmental capacity
556 of vitrified immature porcine oocytes. *Theriogenology* 2015; 84: 545-52. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.004)
557 [10.1016/j.theriogenology.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.004)
- 558 [5] Freitas VJF, Souza-Fabjan JMG, Mermillod P, Melo LM, Teixeira DIA. Estado da
559 arte e perspectivas da produção in vitro de embriões em caprinos. *Revist Bras Reprod*
560 *Anim* 2017; 41: 201-207. [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-reproducao-animal/41-(2017)-1)
561 [brasileira-de-reproducao-animal/41-\(2017\)-1](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-reproducao-animal/41-(2017)-1)
- 562 [6] Sanchez DJD, Melo CHS, Souza-Fabjan J MG, Sousa FC, Rocha AA, Campelo IS,
563 Teixeira DIA, Pereira AF, Melo LM, Freitas VJF. Repeated hormonal treatment and
564 laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production in goats raised in
565 the tropics. *Livest Sci* 2014; 165: 217-222. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.012>
- 566 [7] Bernardi ML. Produção in vitro de embriões ovinos. *Acta Sci Vet* 2005; 33: 1-16.
567 <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/download/14418/8348>
- 568 [8] Lima –Verde JB, Rondina D, Freitas VJF. Produção in vitro de embriões ovinos.
569 *Revist Ciênc Anim* 2003; 13: 79-87.
570 <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo3.2003.2.pdf>
- 571 [9] Rocha-Frigoni NAS, Leão BCS, Feliciano MAR, Vicente WRR, Oliveira MEF.
572 Produção in vitro de embriões ovinos: avanços e desafios. *Revist Bras Reprod Anim*
573 2014; 38: 103-109. <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n2/pag103-109>
- 574 [10] Sprícigo JF, Morató R, Arcarons N, Yeste M, Dode MA, López-Bejar M, Mogas T.
575 Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium

- 576 before vitrification on in vitro-matured calf oocytes. *Theriogenology* 2017; 89: 47-57.
577 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035>
- 578 [11] Hosseini SM, Asgari V, Ostadhosseini S, Hajian M, Ghanaei HR, Nasr-Esfahani
579 MH. Developmental competence of ovine oocytes after vitrification: Differential effects
580 of vitrification steps, embryo production methods, and parental origin of pronuclei.
581 *Theriogenology* 2015; 83: 366-376.
582 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.031>
- 583 [12] Ortiz-Escribano N, Smits K, Piepers S, Van den Abbeel E, Woelders H, Van Soom
584 A. Role of cumulus cells during vitrification and fertilization of mature bovine oocytes:
585 Effects on survival, fertilization, and blastocyst development. *Theriogenology* 2016; 86:
586 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.015>
- 587 [13] Morton KM, Maxwell WMC, Evans G. Effect of aspiration pressure during oocyte
588 harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. *Reprod Dom*
589 *Anim* 2008; 43: 106-110. <https://doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00866.x>
- 590 [14] Karami-Shabankareh H, Mirshamsi SM. Selection of developmentally competent
591 sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and
592 oocyte diameter. *Small Rumin Res* 2012; 105: 244-249.
593 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.017>
- 594 [15] Stringfellow DA, Givens MD. *Manual of the International Embryo Transfer*
595 *Society (IETS)*. 4 ed. Illinois: Champaign; 2010.
- 596 [16] Tsai S, Spinikgs E, Kuo FW, Lin NC, Lin C. Use of adenosine triphosphate assay,
597 and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the
598 effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes. *Theriogenology*
599 2010; 73: 605-611. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.016>.
- 600 [17] Azari-Dolatabad N, Rahman HR, Hajian M, Ostadhosseini S, Hosseini SM, Nasr-
601 Esfahani MH. Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and
602 development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue
603 staining. *Theriogenology* 2016; 85: 1483-1490. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.008>.

- 605 [18] Nunes JF. Biotécnicas aplicadas a reprodução de pequenos ruminantes. 1 ed.
606 Fortaleza: Ceará, Brasil; 2010.
- 607 [19] Grazul-Bilskaa AT, Bassa CS, Kaminskia SL, Ebela KK, Lekea E, Thammasirib J,
608 Kraisonb A, Navanukrawb C, Holsta M, Sheltona M, Dorsama ST, Redmera DA.
609 Effects of plane of nutrition and arginine on ovarian follicles in nonpregnant sheep: Cell
610 proliferation, and expression of endothelial nitric oxide and its receptor. *Acta Histochem*
611 2019; 121:189-197. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.12.009>
- 612 [20] D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. Influence of nutrition, body condition,
613 and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*
614 2019; 125: 277-284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.010>.
- 615 [21] Ferreira MCN, Miranda R, Figueiredo MA, Costa OM, Palhano HB. Impact of
616 body condition on pregnancy rate of cows nellore under pasture in fixed time artificial
617 insemination (tai) program. *Sem Ciên Agr* 2013; 34: 1861-1868.
618 <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n4p1861>
- 619 [22] Mahesh YU, Gibence HRW, Shivaji S, Rao BS. Effect of different cryo-devices on
620 in vitro maturation and development of vitrified-warmed immature buffalo oocytes.
621 *Cryobiology* 2017; 75: 106-116. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.01.004>.
- 622 [23] Fagundes LM, Costa EP, Torres CAA, Amaral Filha WS, Guimarães JD.
623 Congelação de ovócitos desnudados ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando
624 o etileno glicol pelo método convencional. *Ver Bras Zootec* 2004; 33: 2026-2036.
625 <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v33n6s2/23307.pdf>
- 626 [24] Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Albuquerque FT, Costa EP, Viana JHM.
627 Criopreservação de ovócitos bovinos imaturos com 1,2 propanediol. *Pesq Agropec Bras*
628 1997; 32: 1325-1331.
629 <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/viewFile/4781/7261>
- 630 [25] Gonçalves RFB, Lunardi FO, Alves AMCV, Araújo VR, Figueiredo JR, Campello
631 CC, Rodrigues APR. Congelação lenta de tecido ovariano ovino utilizando 1,2
632 propanodiol (proh) seguida de incubação de curta duração. *Ciênc Anim* 2012; 22: 03-
633 16. http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo1_2012.3b.pdf

- 634 [26] Ebrahimi B, Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Baharvand H. Ultrastructural
635 changes of sheep cumulus–oocyte complexes following different methods of
636 vitrification. *Zygote* 2010; 20: 103–115. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000638>
- 637 [27] Cao X, Li J, Xue H, Wang S, Zhao W, Du Z, Yang Y, Yue Z. Effect of vitrification
638 on meiotic maturation, mitochondrial distribution and glutathione synthesis in immature
639 silver fox *cumulus* oocyte complexes. *Theriogenology* 2017; 15: 104-111.
640 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.037>.
- 641 [28] Li JJ, Fu XW, Mo XH, Yue MX, Jia BY, Zhu SE. Vitrification alters acH4K12 and
642 acH4K16 levels in sheep oocytes at various developmental stages. *Small Rumin Res*
643 2013; 112: 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.12.005>
- 644 [29] Parnpai R, Liang Y, Ketudat-Cairns M, Somfai T, Nagai T. Vitrification of buffalo
645 oocytes and embryos. *Theriogenology* 2016; 86: 214-220.
646 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.034>
- 647 [30] Guo XF, Yu XL, Zhang F, Wu H, Pei XZ, Li XX, Li YH. Effect of liquid helium
648 vitrification on cytoskeleton of immature cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2017; 187:
649 91-99. <http://doi:10.1016/j.anireprosci.2017.10.010>.
- 650 [31] El-Shalofy AS, Moawad AR, Darwish GM, Ismail ST, Badawy ABA, Badr MR.
651 Effect of different vitrification solutions and cryodevices on viability and subsequent
652 development of buffalo oocytes vitrified at the germinal vesicle (GV) stage.
653 *Cryobiology* 2017; 74: 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.010>
- 654 [32] Sanaei B, Movaghar B, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Bazrgar M, Jafarpour F, Nasr-
655 Esfahani MH. An improved method for vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes;
656 beneficial effects of Ethylene Glycol Tetraacetic acid, an intracellular calcium chelator.
657 *Cryobiology* 2018; 84: 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.001>
- 658 [33] Ruiz JB, Landeo LJ, Artica MF, Ratto MF, Correa JS. Activación química de
659 ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración *in vitro*. *Revist Invest Vet*
660 *Perú* 2011; 22: 206-212. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v22i3.258>
- 661 [34] Ruiz J, Correa JE, Martínez M. Vitrificación de ovocitos bovinos y su uso en el
662 desarrollo partenogénico de embriones. *Arch med vet* 2010; 24: 79-83.
663 <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100011>

- 664 [35] Romão R, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Barbas JP, Horta AEM,
665 Carolino N, Bettencourt E, Plancha C, Rodrigues P, Pereira RM. Evaluation of two
666 methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved sêmen.
667 Small Rumin Res 2013; 110: 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.029>
- 668 [36] Santos-Neto PC, Cuadro F, Barrera N, Crispo M, Menchaca A. Embryo survival
669 and birth after minimum volume vitrification or slow freezing of *in vivo* and *in vitro*
670 produced ovine embryos. Cryobiology 2017; 78: 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.08.002>.
- 672 [37] Otero RA, Costa EP, Pereira EM. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos
673 selecionados pelo método azul cresil brilhante. Revist Colomb Ciênc Anim 2017; 9:
674 345-354. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.617>
- 675 [38] Wang L, Lin J, Huang J, Wang J, Zhao Y, Chen T. Selection of ovine oocytes by
676 Brilliant Cresyl Blue staining. J Biom Biotech 2012; 72: 13-16. <https://doi.org/10.1155/2012/161372>
- 678 [39] Guaitolini CR, Taffarel MO, Teixeira NS, Sudano MJ, Freitas PM, Lopes MD,
679 Landin-Alvarenga FC, Oliveira CA, Luz MR. Post-thaw viability of *in vivo*-produced
680 canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. Theriogenology 2012; 78: 576-582.
681 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.003>.
- 682
- 683
- 684
- 685
- 686
- 687
- 688
- 689
- 690
- 691

692 Tabela 1
693 Análise descritiva com o quantitativo de oócitos ovinos estudados

Grupo	N	%
Controle	122	33,4
Congelação lenta	180	49,3
Vitrificação	63	17,3
Total	365	100,0

694 N: número de amostras. %: porcentagem.

695 Tabela 2
696 Análise de oócitos frescos, oócitos submetidos à congelação lenta e vitrificação nas
697 etapas de produção *in vitro* de embriões ovinos partenogênicos

Parâmetros	Fresco - controle	Congelação lenta	Vitrificação	P-valor
	n (%)	n (%)	n (%)	
Viáveis para MIV				<0,001*
Viável	122 (93,5) ^a	139 (77,2) ^b	51 (81,0) ^b	
Não viável	0 (0,0)	41 (22,8)	12 (19,0)	
Maturados (1° CP)				<0,001*
Maturado	58 (47,5) ^a	8 (5,8) ^b	8 (15,7) ^c	
Não maturado	64 (52,5)	131 (94,2)	43 (84,3)	
Ativados (partenogênese)				<0,001*
Ativados	58 (47,5) ^a	8 (5,8) ^b	8 (15,7) ^c	
Não ativados	64 (52,5)	131 (94,2)	43 (84,3)	
Viáveis em CIV				
Em CIV	58 (100,0)	8 (100,0)	8 (100,0)	
Clivados D2				<0,001*
4-8 blastômeros	38 (65,5) ^a	0 (0,0) ^b	0 (0,0) ^b	
Não clivados	20 (34,5)	8 (100,0)	8 (100,0)	
Clivados D7/D8				0,008*
Mórula	8 (13,8) ^a	0 (0,0) ^b	0 (0,0) ^b	
Não mórula	50 (86,2)	8 (100,0)	8 (100,0)	

*Teste Qui-quadrado de Pearson com 5% (0,05) de significância.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa a $P < 0,05$.

698 Tabela 3

699 Taxa de coloração de oócitos ovinos expostos ao corante ACB por 45 min após
700 avaliação morfológica

Grupo	ACB +	ACB -	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Fresco – controle	20 (47,6) ^a	22 (52,4) ^a	42 (100,0)
Congelação lenta	0 (0,0) ^b	61 (100,0) ^b	61 (100,0)

Teste Exato de Fisher apresentou diferença estatisticamente significativa, P-valor = 0,001. Significância 5%. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a $P < 0,05$.

701 Tabela 4

702 Análise da associação entre o teste ACB e os oócitos maturados e imaturos do grupo
703 controle

Fresco-controle	Maturado	Imaturo	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
ACB +	5 (25,0) ^a	15 (75,0) ^a	20 (100,0)
ACB -	1 (4,5) ^a	21 (95,5) ^a	22 (100,0)

Teste Exato de Fisher apresentou igualdade estatística com P-valor = 0,090. Significância de 5%. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a $P < 0,05$.

704 Tabela 5

705 Análise da viabilidade de membrana de oócitos ovinos através da associação de sondas
706 fluorescentes (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio)

Grupo	Íntegra (FDA)	Lesionada (IP)	Total
	n (%)	n (%)	n (%)
Congelação lenta	18 (100,0) ^a	0 (0,0) ^a	18 (100,0)
Vitrificação	6 (85,7) ^a	1 (14,3) ^a	7 (100,0)

707 Teste Exato de Fisher apresentou igualdade estatística com p-valor = 0,280. Nível
708 significância 5%. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a
709 $P < 0,05$.

710

711

712

713

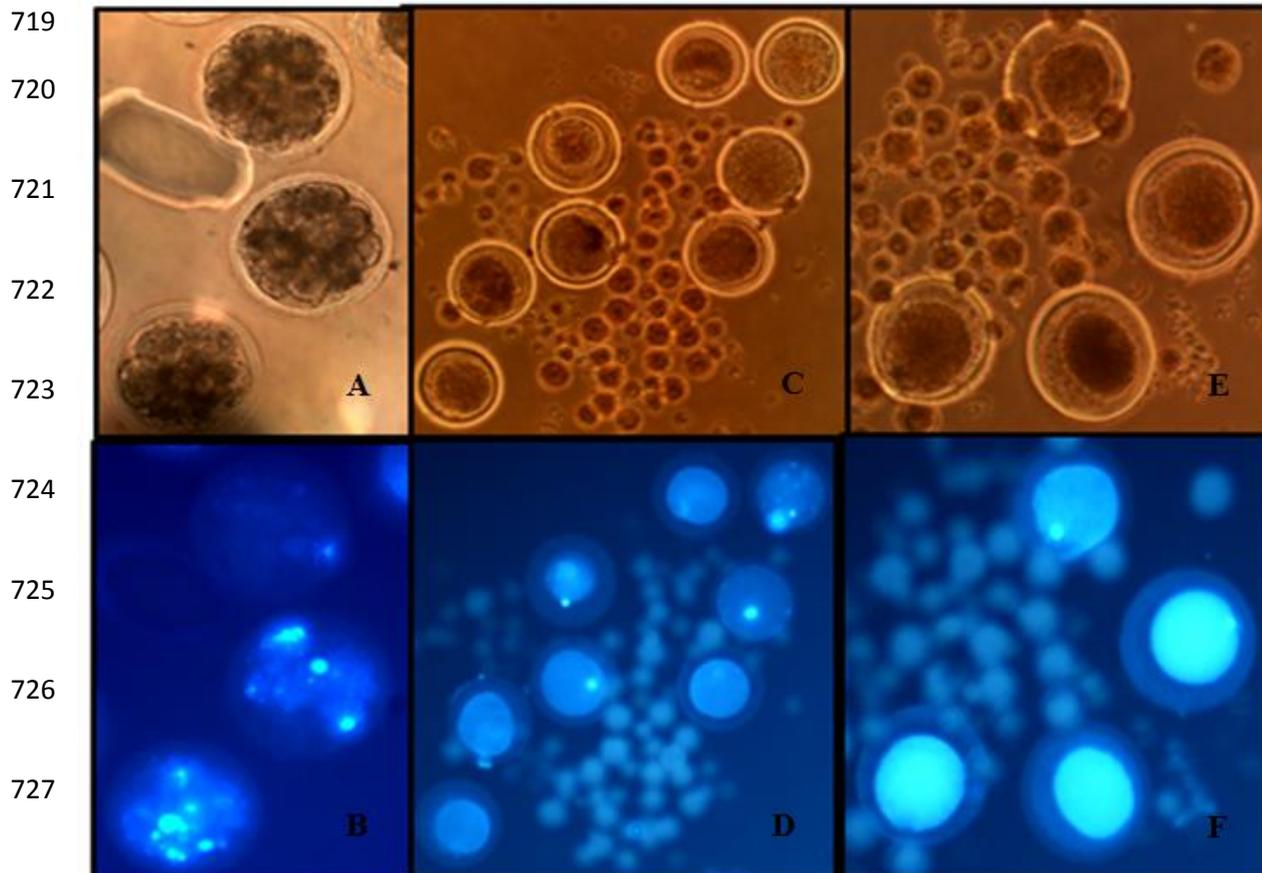
714

715

716

717

718



728 **Fig. 2.** Oócitos ovinos submetidos à produção *in vitro* de embriões. Grupo controle, oócitos da vitrificação e congelação lenta no oitavo dia (D8) de cultivo *in vitro*. (A) Mórulas do grupo controle em campo claro. (B) Mórulas em Hoechst do grupo controle. 729 (C) Oócitos oriundos da vitrificação em campo claro, mostrando ausência de clivagem e blastocisto no D8. (D) Oócitos oriundos da vitrificação em Hoechst, mostrando ausência de clivagem e blastocisto no D8. (E) Oócitos oriundos da congelação lenta em campo 730 claro, mostrando ausência de clivagem e blastocisto no D8. (F) Oócitos oriundos da congelação lenta em Hoechst, mostrando ausência de clivagem e blastocisto no D8. Fonte: 731 arquivo pessoal.

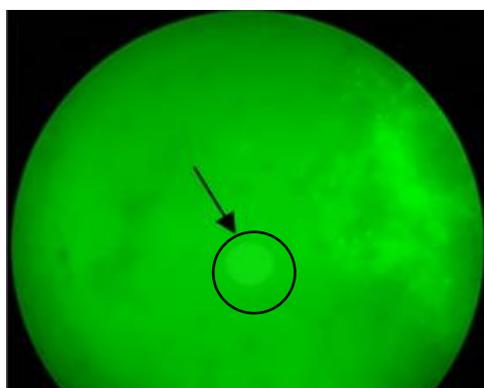
732

733

734

735

736



737 **Fig. 3.** Oócito viável oriundo da congelação lenta avaliado pela sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína. Fonte: arquivo pessoal

738

739

740

741

742



Fig. 4. Oócito não viável oriundo da vitrificação avaliado pela sonda fluorescente iodeto de propídio.

743

744

Fonte: arquivo pessoal

745

746

747

748

749



Fig. 5. Oócito viável oriundo da vitrificação avaliado pela sonda fluorescente diacetato de carboxifluoresceína.

750

751

752

753

754

755

Fonte: arquivo pessoal

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões, assim como a criopreservação de gametas e embriões, são importantes ferramentas da reprodução animal, uma vez que apresentam como principais vantagens a maximização do potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores e a formação de bancos de germoplasma animal, respectivamente. Ambas as biotecnologias podem ser utilizadas com sucesso em casos de distúrbios reprodutivos em animais de alto mérito genético e em casos de animais com risco de extinção.

Nessa perspectiva, evidencia-se a necessidade de mais pesquisas relacionadas à otimização das biotecnologias de reprodução assistida, sobretudo quanto aos métodos de criopreservação, congelamento lento e vitrificação para oócitos da espécie ovina, a fim de produzir embriões *in vitro*. Uma vez que ainda não há uma curva específica para criopreservação lenta de oócitos ovinos, bem como para criopreservação lenta de oócitos de outras espécies animais. Assim como se faz necessário o desenvolvimento de kits específicos para vitrificação de oócitos ovinos. Ressalta-se ainda que devido às exigências durante o cultivo embrionário, salientando, a espécie ovina, é de relevante importância a formulação e o aperfeiçoamento de meios específicos para esta etapa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOBA, D. D. **Utilização do corante azul cresil brilhante como método de seleção de oócitos humanos destinados à maturação *in vitro***. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

ANDRADE, P. M. **Efeito dos meios de cultivo de base alfa- MEM e TCM-199 e do fator de crescimento epidermal (EGF) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano**. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

ARAUJO, M. S.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R.; LANDIM, F. C. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 2373-2388, 2014.

ARROYO, R. J. O. **Classificação de ovócitos imaturos de bovinos pela utilização do azul cresil brilhante**. 2008. 31f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

AZARI-DOLATABAD, N.; RAHMAN, H. R.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; HOSSEINI, S. M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Effects of cilostamide and/or forskolin on the meiotic resumption and development competence of growing ovine oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Theriogenology**, v. 85, p. 1483-1490, 2016.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 82, n. 83, p. 255-266, 2004.

BALDASSARRE, H.; KOEMAN, J.; KEEFER, C. L.; DOWNEY, B. R. Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. **Cloning Stem Cells**, Philadelphia, v. 5, p. 279-285, 2003.

BALDASSARRE, H.; MENCHACA, A.; ANEGON, I.; WHITELAW, B.; CRISPO, M. New insights and current tools for genetically engineered (GE) sheep and goats. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, n. 1, p. 160-169, 2016.

BALDASSARRE, H. Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production and cloning programs in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, Dublin, v. 9, n. 3, p. 188-194, 2012.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C. L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 275-284, 2002.

- BANDEIRA, F. T.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; LIMA, L. F.; VIANA, D. A.; EVANGELISTA, J. S.; PEREIRA, M. J.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 177-185, 2015.
- BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G. G.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; LEDDA, S. Different temporal gene expression patterns for ovine pre-implantation embryos produced by parthenogenesis or in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 74, p. 712-723, 2010.
- BEM, T. H. C. **Efeito da pré-maturação sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos submetidos à ativação partenogenética e transferência de núcleo**. 2009. 95f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- BERNADI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.
- BERROCAL, D. J. D. **Efeito da proteína morfogenética óssea 15 (BMP15), do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) na presença de baixa ou alta concentração de insulina sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano**. 2016. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.
- BEZERRA, F. Q. G.; SILVA, J. C. F.; SILVA, P. G. C.; CANTANHÊDE, L. F.; BASTO, S. R. L.; FREITAS NETO, L. M.; MOURA, M. T.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e chuvoso. **Revista de Medicina Veterinária**, Recife, v. 8, n. 3, p. 17-23, 2014.
- BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; ROSATI, I.; ZEDDA, M.T.; LEONI, G.; SUCCU, S.; PAU, S.; LEDDA, S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without *cumulus* cells. **Theriogenology**, v. 68, n.8, p.1138-1149, 2007.
- BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-8, 2015.
- CARRILHO, J. D. **Comparação entre congelamento lento e a vitrificação na criopreservação de tecido ovariano de suínos**. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P. R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e

material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 957, 2011.

CAVALCANTES, J. M. M.; BRASIL, O. O.; SALGUEIRO, C. C. M.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; NUNES, J. F. Criopreservação do sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó (ACP -102c). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 3, p. 344-353, 2014.

CÉSAR, J. M. S.; PETROIANU, A.; VASCONCELOS, L. S.; CARDOSO, V. N.; MOTA, L. G.; BARBOSA, A. J. A.; SOARES, C. D. V.; OLIVEIRA, A. L. Estudo preliminar da água de coco para preservação de enxertos teciduais em transplante. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.42, p. 043-048, 2015.

CHAYA, A. Y. **Produção *in vitro* de embriões caprinos pré-púberes: efeito da melatonina nos meios de maturação *in vitro* e cultivo *in vitro* embrionário**. 2016. 80f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

CHIAN, R. C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **J Reprod Dev**, v. 50, n. 6, p. 685-696, 2004.

CORREIA, H. H. V. **Cilostamida afeta de forma dependente de concentração e tempo de exposição a viabilidade e a cinética de maturação *in vitro* de oócitos caprinos e bovinos**. 2014. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

COSTA, E. P.; LOPES, F. G.; PEREIRA, E. C. M.; QUEIROZ, V. L. D.; MACEDO, G. G.; ALMEIDA NETO, J. R. M.; COSTA, A. H. A. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p.1507-1510, 2010.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Particularidades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2012.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470-479, 2012.

DADASHPOUR, D. N.; KOHRAM, H.; ZAINOALDINI, S. *Cumulus* cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. **Small ruminant research**, v. 102, n. 1, p. 37-42, 2012.

DAMASCENO, T. C. M. **Qualidade de óocitos ovinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP-408®**. 2017. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

EVANGELISTA, L. S. M.; CARVALHO, Y. N. T.; CASTELO BRANCO, M. A.; MOTA, L. H. C. M.; BARÇANTE, F. P. S.; SOUZA, I. O. T.; CÂMARA, T. S.; SOUZA, J. A. T. Avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 651-657, 2016.

FERRAZ, M. S.; MORAIS JÚNIOR, F. J.; FEITOSA, M. L. T.; ALMEIDA, H. M.; BEZERRA, D. O.; PESSOA, G. T.; ALBUQUERQUE, D. M. N.; CARVALHO, M. C. M. Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de óocitos em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.3, p. 204-208, 2016.

FREITAS, V. J. F.; ANDRADE, M. L. L.; CAJAZEIRAS, J. B.; LUZ, J. V. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no Nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 781-786, 2007.

FREITAS, V. J. F.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; MERMILLOD, P.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A. Estado da arte e perspectivas da produção *in vitro* de embriões em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.201-207, 2017.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008. 408p.

GOODARZI, A.; SHAHNEH, A. Z.; KOHRAM, H.; SADEGHI, M.; MOAZENIZADEH, M. H.; FOULADI-NASHTA, A.; DAVACHI, N. D. Effect of melatonin supplementation in the long-term preservation of the sheep ovaries at different temperatures and subsequent *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 106, p. 265-270, 2018.

GUAITOLINI, C. R. F.; TAFFAREL, M. O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, M. J. ; FREITAS, P. M. C.; LOPES, M. D.; LANDIN-ALVARENGA, F. C.; OLIVEIRA, C. A.; LUZ, M. R. Post-thaw viability of *in vivo*-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. **Theriogenology**, v. 78, p. 576-582, 2012.

GUEMRA, S.; MOZANI, P. S.; SANTOS, E. S.; ZANIN, R.; OASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de óocitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GUO, B. Q.; YUAN, M.; YI, N. N.; GUO, Q. W.; CHUN, R. L.; QIONG, H. H. Effects of synthetic polymers on in vitro maturation of sheep oocytes and subsequent developmental capacity after parthenogenetic activation or fertilization. **Small Ruminant Research**, v. 153, p. 153-157, 2017.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HOSSEINI, S. M.; NASR-ESFAHANI, M. H. What does the cryopreserved oocyte look like? A fresh look at the characteristic oocyte features following cryopreservation. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, p. 377-387, 2016.

IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. [2017]. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 19 jun. 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KARAMI-SHABANKAREH, H.; MIRSHAMSI, S. M. Selection of developmentally competent sheep oocytes using the brilliant cresyl blue test and the relationship to follicle size and oocyte diameter. **Small Ruminant Research**, v. 105, p. 244-249, 2012.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. **Obstetrícia veterinária**. 2. ed. Botucatu, SP, 2017. 236 p.

LEMO, P. F. B. A. **Viabilidade de embriões caprinos e ovinos produzidos in vivo após criopreservação utilizando etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

LETHAM, D. S. Regulators of all division in plant tissue. XX: The cytokines of coconut milk. *Physiol.* **Plant London**, v. 32, p. 66-70, 1974.

LIMA VERDE, J. B.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Produção in vitro de embriões ovinos. **Revista de Ciência Animal**, Fortaleza, v. 13, n. 2, p. 79-87, 2003.

LOPES, B. V.; CUNHA, I. C. N.; PAPA, F. O.; DETMANN, E. Estudo da viabilidade de um novo diluidor para a refrigeração do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3/4, p.174-178, 2005.

LUCCI, C. M.; DALCIN, L. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista brasileira de reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 149-159, 2010.

LUNARDI, F. O.; AGUIAR, F. L. N.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; LIMA, L. F.; SÁ, N. A. R.; CORREIA, H. H. V.; DOMINGUES, S. F. S.; CAMPELLO, C. C.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop *in vitro* better than those vitrified into the ovarian fragments. **Theriogenology**, v. 85, p. 1203-1210, 2016.

MANIPALVIRATN, S. M. D.; TONG, Z. B. M. D.; STEGMANN, B. M. D.; WIDRA, E. M. D.; CARTER, J. B. A.; DECHERNEY, A. M. D. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. **Fertil Steril**, v. 95, n. 5, p. 1839-1841, 2011.

MEZALLIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERE, D. P.; MACHADO, M. F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Vitricificação de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* e expostos à citocalasina B. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 260-265, 2002.

MOAWAD, A. R.; CHOI, I.; ZHU, J.; EL-WISHY, A. B. A.; AMARNATH, D.; CHEN, W.; CAMPBELL, K. H. S. Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. s41-s48, 2018.

NADRI, P.; ANSARI-MAHYARI, S.; ZAHMATKESH, A.; RIASI, A.; ZARVANDI, S.; SALEHI, M. Effects of a Sonic Hedgehog agonist on ovine oocyte maturation, epigenetic changes and development of parthenogenetic embryos. **Small Ruminant Research**, v.141, p. 84-90, 2016.

NICACIO, A. C. **Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2008. 109f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 17-26, 1999.

OLIVEIRA, E. G.; POLISSENI, J.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na ovogênese. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p. 29 - 33, 2009.

OLIVEIRA, F. T. B. **Análise do desenvolvimento de folículos pré-antrais e da matriz extracelular ovariana após vitricificação de tecido ovariano ovino**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

OTERO, R. A.; COSTA, E. P.; PEREIRA, E. M. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. **Revista Colombiana de Ciência Animal**, v. 9, p. 345-354, 2017.

PAFFONI, A.; BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F.; RAGNI, G. Parthenogenetic Activation: Biology and Applications in the ART Laboratory. **Placenta**, v. 29, p. 121-125, 2008.

PARAMIO, M. T. In vivo and in vitro embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, Newark, v. 89, p. 144-148, 2010.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, Stoneham, v. 86, p. 152-159, 2016.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p. 21-35, 2008.

PARNPAI, R.; LIANG, Y.; KETUDAT-CAIRNS, M.; SOMFAI, T.; NAGAI, T. Vitriification of buffalo oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 86, n. , p. 214-220, 2016.

PENITENTE FILHO, J. M.; TORRES, C. A. A.; OLIVEIRA, F. A. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 61, n. 3, p. 73-82, 2014.

PESSOA, A. F. C. **Influência da integridade morfológica folicular, do sistema e da duração do cultivo sobre o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais caprinos isolados**. 2013. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PINTO, A. C. L.; VIEIRA, M. R.; LIMA, D. L. F.; ALVES, F. A. F.; SANTOS, R. L. Água de coco em pó como suplemento hidroeletrólítico e energético para atletas. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.21, p.12-18, 2015.

PONTES, J. T. **Efeito do cortisol sobre o desenvolvimento in vitro de folículos ovarianos pré-antrais caprinos**. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

PRENTICE, J. R.; ANZAR, M. Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. **Lumen**, Canadá, v. 11, p. 37-43, 2011.

PRYOR, J. H.; LOONEYA, C. R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D. C.; LONGC, C. R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post - thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.

RAKHA, B. A.; ANSARI, M. S.; AKHTER, S.; ZAFAR, Z.; NASEER, A.; HUSSAIN, I.; BLESBOIS, E.; SANTIAGO-MORENO, J. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*). **Theriogenology**, v. 122, p. 61-67, 2018.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; OLIVEIRA, M. E. F. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 103-109, 2014.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; BRASIL, A. F.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de oócitos mamíferos: importância, estado atual, limitações e perspectivas. **Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 101-112, 2001.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 20-32, 2012.

SANAEI, B.; MOVAGHAR, B.; VALOJERDI, M. R.; EBRAHIMI, B.; BAZRGAR, M.; JAFARPOUR, F.; NASR-ESFAHANI, M. H. An improved method for vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes; beneficial effects of Ethylene Glycol Tetraacetic acid, an intracellular calcium chelator. **Cryobiology**, v. 84, p. 82-90, 2018.

SANCHEZ, D. J. D. **Viabilidade da sucessiva estimulação hormonal para colheita oocitária por laparoscopia (COL) na produção *in vitro* de embriões em caprinos**. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

SANTOS, J. D. R. **Expressão de ácido hialurônico sintase-2, receptores gonadotróficos e conexina 43 em células do cumulus de oócitos caprinos**. 2015. 89f. Dissertação (Mestrado acadêmico) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

SANTOS, M. V. O.; BORGES, A. A.; QUEIROZ NETA, L. B.; PEREIRA, A. F. Influência do método de recuperação oocitária sobre os parâmetros quanti-qualitativos de oócitos bovinos. **Ars Veterinária**, v. 32, n. 2, p. 105-109, 2016.

SERAFIM, M. K. B.; SILVA, G. M.; LIMA, A. K. F.; SILVA, T. F. P.; PADILHA, D. M. M.; SILVA, L. D. M.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos caninos. **Ciência animal**, Goiás, v. 22, n. 3, p. 30-46, 2012.

SILVA, A. M. S.; BRUNO, J. B.; LIMA, L. F.; SÁ, N. A. R.; LUNARDI, F. O.; FERREIRA, A. C. A.; CORREIA, H. H. V.; AGUIAR, F. L. N.; ARAÚJO, V. R.; LOBO, C. H.; MOURA, A. A. A.; CAMPELLO, C.C.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Connexin 37 and 43 gene and protein expression and

developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultured *in vitro* after vitrification of ovarian tissue. **Theriogenology**, Stoneham, v. 85, p. 1457-1467, 2016.

SILVA, A. M. S. **Expressão das conexinas 37e 43 em folículos ovarianos ovinos, frescos, vitrificados ou cultivados *in vitro***. 2015. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

SILVA, M. C. M. S. **Criopreservação de oócitos: efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação**. 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2015.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, T. F. **Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST) no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de bovinos**. 2014. 34f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

SOUSA, M. S. **Sincronização do estro e inseminação artificial de ovelhas utilizando água de coco em pó**. 2016. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

SOUZA-FABJAN, J. M.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; LOCATELLI, Y.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1149-1162, 2014.

SOUZA, F. O. **Atividade citotóxica, pró-apoptótica, genotóxica e mutagênica de nitensidina B em células tumorais cervicais humanas**. 2013. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, 2013.

SOUZA, F. O.; SORBO, J. M.; REGASINI, L. O.; ROSA, J. C.; SILVA, C. E.; VALENTE, V.; MOREIRA, T. F.; NAVEGANTE, G.; FERNANDES, B. C.; SOARES, C. P. Nitensidine B affects proteins of the glycolytic pathway and induces apoptosis in cervical carcinoma cells immortalized by HPV16. **Phytomedicine**, v. 48, p. 179-186, 2018.

SOUZA, T. T. S. **Produção *in vitro* de embriões ovinos na presença de cafeína e vitamina E**. 2015. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. **Manual of the international Embryo Trasfer Society**. Internacional Embryo Transfer Society, p.200, 2010.

SUCCU, S.; GADAU, S. D.; SERRA, E.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; PORCU, C.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F.; LEONI, G. G. A recovery time after warming restores mitochondrial function and improves developmental competence of vitrified ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 110, p. 18-26, 2018.

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

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; LAGARES, M. A.; HENRY, M. R. J. M. Biotécnicas da reprodução aplicadas a pequenos ruminantes. **Ciência Animal Brasileira (UFG. Impresso)**, Goiás, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2009.

WANG, D. H.; REN, J.; ZHOU, C. J.; HAN, Z.; WANG, L.; LIANG, C. G. Supplementation with CTGF, SDF1, NGF, and HGF promotes ovine in vitro oocyte maturation and early embryo development. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 65, p. 38-48, 2018.

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

YAN, C. L.; FU, X. W.; ZHOU, G. B.; ZHAO, X. M.; SUO, L.; ZHU, S. E. Mitochondrial behaviors in the vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: effect of Taxol pretreatment and relationship to competence. **Fertil Steril**, v. 93, n. 3, p. 959-966, 2010.

YURCHUK, T.; PETRUSHKO, M.; FULLER, B. Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. **Early Human Development**, v. 126, p. 6-9, 2018.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética e Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Utilização de meios alternativos para a otimização da produção in vitro de embriões ovinos provenientes de oócitos criopreservados*", registrada nº 436/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. NEY RÔMULO DE OLIVEIRA PAULA do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **28/02/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	15/05/2018 à 28/02/2019
Espécie/Linhagem/raça	Ovinos
Nº de Animais	240
Peso/ Idade	
Sexo	Fêmeas
Origem	Abatedouros locais, Teresina-PI.

Teresina, 28 de Fevereiro de 2018.

Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura

 Profa. Dra. Waldilenny Ribeiro de Araújo Moura
 Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI

ANEXO B – Ficha de controle da criopreservação de óocitos ovinos

Discente/ Projeto:	/
Data:	/ /
Espécie:	
Nome do abatedouro:	
Horário de início da punção:	
Horário de última punção:	
Horário de início da classificação e seleção/ término:	/
Horário de início da criopreservação/ término:	/
Método de criopreservação utilizado:	
Meio de criopreservação utilizado:	

N° da Palheta	N° de colunas/ palheta	N° de Oócitos/ palheta

OBS:

**ANEXO C – Ficha de avaliação da integridade de membrana de oócitos ovinos
através de sondas fluorescentes**

Grupo: _____

Data: ____/____/____

Classificação	FDA + IP	
	Membrana integra	Membrana Lesionada

Classificação	FDA + IP	
	Membrana integra	Membrana Lesionada

Classificação	FDA + IP	
	Membrana integra	Membrana Lesionada

OBS: _____

**ANEXO D – Ficha de avaliação dos oócitos submetidos ao teste do Azul Cresil
Brilhante (ACB)**

Grupo: _____

Data: ____/____/____

N° de oócitos testados	Resultado no teste do ACB	
	ACB +	ACB -

N° de oócitos testados	Resultado no teste do ACB	
	ACB +	ACB -

N° de oócitos testados	Resultado no teste do ACB	
	ACB +	ACB -

OBS: _____

ANEXO E – Instruções para autores da revista *Theriogenology*

Introduction

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

Aims and Scope

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

Types of Articles

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

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

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

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other

funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Contributors

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

Authorship

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

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

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

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is USD 2650, excluding taxes.

Learn more about Elsevier's pricing policy:
<https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

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

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are

required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/therio/default.asp>.

Referees

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

Use of word processing software

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

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

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to

'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration.

Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

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

Keywords

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

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

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number

consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

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

Electronic artwork

General points

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

- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

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

Figure captions

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

Text graphics

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished

results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

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

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you

use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

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

Journal Abbreviation Source

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

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard

icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link

articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Additional Style Notes

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

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

Use the following expressions

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

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body

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

Abbreviations

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

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

chart

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram

ga - gauge of hypodermic needle

h - hour

kg - kilogram

L - liter

mL - milliliter

μ L - microliter

m - meter

min - minute

mo - month

s - second

v:v - volume ratio

wk - week

wt/vol - weight per volume

y - year

Routes of treatment

id - intradermal

im - intramuscular

iu - intrauterine

iv - intravenous

sc - subcutaneous

po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance

CV - coefficient of variation

df - degrees of freedom

F - variance ratio

NS - not significant

P - probability

SD - standard deviation

SEM - standard error of the mean

r - correlation coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

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

Online proof correction

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

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

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

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.