



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À
AGROPECUÁRIA - PPGBA

MARCELA OLIVEIRA DAS MERCÊS

VITRIFICAÇÃO EM FLUIDO FOLICULAR DE OÓCITOS BOVINOS

BELÉM
2022

MARCELA OLIVEIRA DAS MERCÊS

VITRIFICAÇÃO EM FLUIDO FOLICULAR DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia Animal sob orientação da Dr. Priscila Di Paula Bessa Santana.

BELÉM
2022

MARCELA OLIVEIRA DAS MERCÊS

VITRIFICAÇÃO EM FLUIDO FOLICULAR DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Data da Aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



PRISCILA DI PAULA BESSA SANTANA
Data: 02/03/2026 22:34:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Priscila Di Paula Bessa Santana-Orientadora / Presidente
Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA

Documento assinado digitalmente



EDNALDO DA SILVA FILHO
Data: 05/03/2026 10:17:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ednaldo da Silva Filho- 1º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA

Documento assinado digitalmente



NATHALIA NOGUEIRA DA COSTA DE ALMEIDA
Data: 05/03/2026 15:37:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nathalia Nogueira Da Costa De Almeida - 2º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia -UFRA

Documento assinado digitalmente



MARCELA DA SILVA CORDEIRO
Data: 06/03/2026 19:53:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcela da Silva Cordeiro - 3º Examinador
Instituto Federal do Pará- IFPA

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Benedito Gilvandro e Maria Neuza, com gratidão, pois deles recebi todo o apoio necessário e forças para continuar.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M553v Mercês, Marcela Oliveira das Mercês
 VITRIFICAÇÃO EM FLUIDO FOLICULAR DE OÓCITOS BOVINOS / Marcela Oliveira das Mercês
 Mercês. - 2026.
 46 f. : il. color.

 Dissertação (Mestrado) - 1, Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da
 Amazônia, Belém, 2026.
 Orientador: Profa. Dra. Priscila Di Paula Bessa Santana Santana

 1. Criopreservação. 2. expressão gênica . 3. crioprotetores. I. Santana , Priscila Di Paula Bessa
 Santana , *orient.* II. Título

CDD 660.6

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, paz, fortaleza. Por toda esperança e fé concedida diante das dificuldades.

A minha orientadora Priscila Santana pelo tempo dedicado aos trabalhos, pela paciência, orientação, empenho, oportunidades e confiança depositadas em mim.

Ao laboratório de fertilização In vitro Prof. Dr.Ohashi da Universidade Federal do Pará – UFPA por proporcionar a execução do trabalho.

A Professora Marcela Cordeiro, por nunca ter me desamparado, agradeço pela orientação, paciência e por todo o tempo dedicado a execução do trabalho.

Agradeço as professoras do laboratório, prof Simone, professora Nathalia, pelas orientações, ensinamentos e por me auxiliar em diversas situações, e principalmente na execução do trabalho.

Aos mestrandos do laboratório, Bruno e Eduardo, por me socorrer, ensinar em diversas situações da rotina do laboratório e apoio durante a pesquisa.

Aos estagiários do laboratório, Paloma, Léo, Camila, Thiago, Matheus e Larissa por todo o incentivo, pela amizade que adquirimos, por terem sido apoio e também pelos momentos de alegria e de descontração.

Aos meus pais, e minha irmã Camila, que sempre me incentivaram, confiaram no meu potencial, pelo discernimento, maior apoio em todas ocasiões da minha vida, e por todo o carinho e amor.

Ao meu parceiro de vida Italo, pela compreensão, paciência, amor e apoio.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação e para o meu crescimento profissional. Minhas considerações e meu muito obrigado.

RESUMO

A vitrificação é um dos métodos utilizados para oócitos imaturos e maturados de bovinos. Porém, necessita ser aprimorado quanto a competência oócitaria após o aquecimento. O uso de Fluido folicular bovino (FFB) é conhecido em sistemas de produção *in vitro*, mas, inexplorado em meio de vitrificação. O objetivo do estudo foi vitrificar oócitos em uma solução suplementada com Fluido Folicular Bovino (FFB) ou Soro Fetal Bovino (SFB) para investigar a sobrevivência pós-aquecimento por meio da maturação nuclear e análise da expressão gênica de HSP70. O estudo foi dividido entre dois experimentos: No experimento 1 os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) imaturos foram distribuídos em três grupos experimentais. No experimento 2, três grupos experimentais para maturados e três grupos experimentais para complexos *cumulus* CCOs imaturos. O grupo Controle de oócitos (sem vitrificação) em oócitos imaturos, foram submetidos direto à maturação *in vitro*. Ambos experimentos utilizaram no grupo 1, (meio TCM 199 + 20% Soro fetal bovino(SFB) + crioprotetores), e o grupo 2, vitrificação em (meio TCM 199 + 20% fluido folicular bovino(FFB) + crioprotetores), em seguida CCOs imaturos foram levados à maturação *in vitro*. No experimento 1, todos os imaturos dos grupos experimentais, após a maturação, foram corados com orceina acética para fins de visualização estrutural. Enquanto que, no experimento 2 oócitos maturados e imaturos, após o aquecimento, foram levados para análise da expressão gênica da proteína de choque térmico HSP70. As taxas de sobrevivência de oócitos que foram levados para a maturação para avaliar o estágio meiótico II (MII) foram expressos em porcentagens e avaliadas por análise da variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni. Para análise estatística foi utilizado o software SigmaPlot® 14.5 com nível de significância em $P < 0,005$. Já a análise estatística da expressão gênica foi realizada por ANOVA dois critérios no programa Sigmaplot com significância de 0,05. Em análise de maturação dos oócitos imaturos, não foi apresentado diferenças significativas entre os grupos vitrificados com SFB ou FFB ($p > 0,001$) ambos e taxa de maturação foi menor ($p > 0,001$) ao grupo controle. Em relação ao experimento 2, oócitos do grupo de maturados vitrificados, a análise de expressão gênica da proteína HP70, não houve diferença entre os grupos vitrificados com SFB e FFB, já as células da granulosa de imaturos, FFB e FBS também diferiram entre si e do controle ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que o fluido folicular pode ser usado para substituir a suplementação com FBS em meios de vitrificação de oócitos bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; expressão gênica; crioprotetores.

ABSTRACT

Vitrification is one of the methods used for immature and mature bovine oocytes. However, it needs improvement regarding hearing competence after warming. The use of bovine follicular fluid (BFF) is known in in vitro production systems, but unexplored in vitrification media. The aim of this study was to vitrify oocytes in a solution supplemented with bovine follicular fluid (BFF) or fetal bovine serum (FBS) to investigate post-warming survival through nuclear maturation and analysis of HSP70 gene expression. The study was divided into two experiments: In experiment 1, immature cumulus oophorus complexes (COCs) were distributed into three experimental groups. In experiment 2, three experimental groups were used for mature oocytes and three experimental groups for immature cumulus oophorus complexes. The control group of oocytes (without vitrification) in immature oocytes were directly subjected to in vitro maturation. Both experiments used, in group 1, (TCM 199 medium + 20% fetal bovine serum (FBS) + cryoprotectants), and in group 2, vitrification in (TCM 199 medium + 20% bovine follicular fluid (BFF) + cryoprotectants), followed by in vitro maturation of immature oocyte complexes (OCCs). In experiment 1, all immature oocytes from the experimental groups, after maturation, were stained with acetic orcein for structural visualization. Meanwhile, in experiment 2, matured and immature oocytes, after warming, were subjected to gene expression analysis of the heat shock protein HSP70. Survival rates of oocytes that were matured to assess meiotic stage II (MII) were expressed as percentages and evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test. For statistical analysis, SigmaPlot® 14.5 software was used with a significance level of $P < 0.005$. The statistical analysis of gene expression was performed using two-way ANOVA in the Sigmaplot program with a significance level of 0.05. In the maturation analysis of immature oocytes, no significant differences were found between the groups vitrified with FBS or FFB ($p > 0.001$), and the maturation rate was lower ($p > 0.001$) than the control group. Regarding experiment 2, oocytes from the vitrified matured group, the gene expression analysis of the HP70 protein showed no difference between the groups vitrified with FBS and FFB, while the granulosa cells of immature oocytes, FFB, and FBS also differed from each other and from the control ($p < 0.05$). These results indicate that follicular fluid can be used to replace FBS supplementation in vitrification media of bovine oocytes.

KEYWORDS: Cryopreservation; gene expression; cryoprotectants.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Estudos sobre vitrificação de oócitos bovinos e parâmetros investigados.....	15
Tabela 2- Estudos sobre o uso de fluido folicular em substituição ao SFB	18
Figura 1- Fases do crescimento folicular no ovário. Fonte: HALL. (2017)	20
Tabela 2- Maturação nuclear de oócitos bovinos vitrificados em diferentes meios	34
Figura 2- Complexos cumulus-oócito imaturos após vitrificação com solução à base de fluido folicular (BFF) comparados ao controle não vitrificado.....	35
Figura 3- Expressão relativa do gene HSP70 em oócitos maturados in vitro (A) e em células da granulosa obtidas por biópsia de oócitos imaturos após vitrificação (B)	36

SUMÁRIO

1 Introdução	9
2 Objetivo geral:.....	10
2.1 Objetivos específicos:	10
3.1 Importância da criopreservação	11
3.2 Princípios da vitrificação.....	12
3.2.1 Fatores que influenciam a vitrificação de oócitos	12
3.2.2 Vitrificação em oócitos bovinos.....	13
3.3 O uso de fluido folicular em substituição ao SFB.....	17
3.3.1 Composição do fluido folicular	20
4 Referências.....	22
CAPÍTULO II- Vitrificação com fluido folicular em oócitos bovinos	27
5. Introdução	29
6. Materiais e métodos	29
6.1 Obtenção de Complexos Cumulus-Oócito (CCOs) e Fluido Folicular.....	29
6.2 Experimento 1: Efeito da vitrificação com BFF na maturação nuclear	30
6.3 Vitrificação e aquecimento de oócitos imaturos.....	30
6.4. Maturação In Vitro	30
6.4.1 Maturação nuclear de oócitos imaturos vitrificados	31
6.5 Experimento 2: Efeito da vitrificação com BFF na expressão do gene HSP70	31
6.5.1 Vitrificação de oócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i>	31
6.5.2 Armazenamento de oócitos e células da granulosa para análise de expressão gênica	32
6.5.3 Isolamento de RNA e PCR quantitativa em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR)	32
6.5.4 Análise estatística.....	33
7. Resultados.....	34
7.1Experimento 1: A vitrificação com fluido folicular não difere da vitrificação com soro fetal bovino	34
7.2 Experimento 2: Expressão gênica após a vitrificação em solução de fluido folicular 	35
8. Discussão.....	37
9. Conclusão.....	38
ANEXO 1	43

CAPÍTULO I

1 Introdução

A criopreservação, realiza a conservação de células e tecidos, preservando-as por tempo indeterminado ao reduzir o metabolismo celular basal (YOUNGS *et al.*, 2019). Sua aplicação tem abrangência na medicina regenerativa (LI *et al.*, 2020), medicina reprodutiva humana (RIENZI *et al.*, 2017) e animal (SOUZA *et al.*, 2018), através da criopreservação de embriões e células germinativas masculinas ou femininas.

A criopreservação tem vantagens por permitir a comercialização e transferência de embriões quando necessário (DOCHI, 2019), possibilidade de formar bancos de germoplasma em animais de produção ou em risco de extinção (MORREL; MAYER, 2017) e até a comercialização de sêmen criopreservado (YÁNEZ *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a técnica de vitrificação se destaca para a criopreservação de oócitos pois realiza o resfriamento ultra-rápido da amostra, proporcionando a passagem do estado líquido para o sólido (VAJTA, 2013.) As soluções mais comuns na vitrificação são compostas por meio base TCM199-HEPES com 10-20% de soro fetal, etilenoglicol e DMSO, ocorrendo variações de acordo com o protocolo (DUJÍČKOVÁ *et al.*, 2021).

Por sua vez, o soro fetal é um componente essencial das soluções de vitrificação e de grande parte dos meios de cultivo celular, por apresentar componentes como fatores de crescimento, e componentes energéticos (ABE *et al.*, 2002)

Há evidência, contudo, que o soro fetal pode ser substituído pelo fluido folicular durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos (AZARI *et al.*, 2021; CHOI *et al.*, 1998; COLLINS; WRIGHT, 1995; KIM *et al.*, 1996; LONERGAN *et al.*, 1994; LOPES *et al.*, 2019; MUTARY *et al.*, 2019; ROMERO; SEIDEL, 1994). devido a sua composição rica em glicoproteínas, fatores de crescimento, eletrólitos, hormônios esteroides (CHOU; CHEN, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2015; HUNG *et al.*, 2015). Por outro lado, é desconhecido se o fluido folicular teria a mesma utilidade de substituição ao soro fetal em protocolos de vitrificação de oócitos.

Dessa forma, o presente trabalho sugere um protocolo de vitrificação baixo custo para oócitos imaturos e maturados de bovinos, utilizando fluido folicular em meio de vitrificação e substituindo o soro fetal bovino (SFB). Será usado o método OPS de vitrificação (VAJTA *et al.*, 1998) com adaptações, as quais serão: 1) substituição de SFB por fluido folicular na solução de vitrificação e, 2) novo criodispositivo de hematócrito de vidro para armazenamento dos Complexos Cumulus Oophorus (CCOs).

2 Objetivo geral:

- Padronização de protocolo de vitrificação de complexos *cumulus oophorus* (CCOs) imaturos e maturados de bovinos utilizando solução de vitrificação contendo fluido folicular ou Soro Fetal Bovino (SFB).

2.1 Objetivos específicos:

- Vitrificar CCOs imaturos em solução padrão contendo SFB com crioprotetores *versus* solução contendo fluido folicular com crioprotetores.
- Comparar a sobrevivência e qualidade oócitaria pós-aquecimento através das análises de maturação nuclear.
- Analisar a expressão da proteína *HSP70* em oócitos maturados e nas células do *cumulus* em diferentes soluções e crioprotetores.

3 Revisão da literatura

3.1 Importância da criopreservação

A criopreservação é uma biotécnica da reprodução utilizada para manter a integridade de células ou tecidos, de forma que o metabolismo fique em repouso preservando-as por longos períodos, em temperaturas baixas (CHINEN *et al.*, 2019).

A criopreservação tem sido aplicada para a conservação de células (LIRA *et al.*, 2021), tecidos (SILVA *et al.*, 2019), embriões (CAAMAÑO *et al.*, 2015), oócitos (RIENZI *et al.*, 2017) ou sêmen (PRIETO *et al.*, 2014) de diferentes espécies. Desde animais silvestres (NOWAK *et al.*, 2019; PRIETO *et al.*, 2014), mamíferos (LIRA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2019), humanos (ALMODIN *et al.*, 2010; RIENZI *et al.*, 2017) e bovinos (ARAV *et al.*, 2018; BRUYERE *et al.*, 2012; CAAMAÑO *et al.*, 2015).

Em humanos a criopreservação de gametas e embriões é largamente aplicada com fins de reprodução assistida e resulta em taxas de sobrevivência celular consideradas satisfatórias (SARANDY *et al.*, 2016). Já em outras espécies de animais é aplicada para a formação de bancos de germoplasmas, para armazenar o material genético de elevado valor zootécnico (DO *et al.*, 2019) ou mesmo em risco de extinção (MORREL; MAYER, 2017).

No contexto da produção animal, a criopreservação facilita o armazenamento de células, gametas e embriões por longos períodos, proporcionando embriões congelados de animais geneticamente valiosos, ou mesmo a possibilidade ao produtor de escolher os períodos mais favoráveis para transferência de embriões, possibilidade de formar bancos de germoplasma, e até a comercialização de sêmen criopreservado (FERRÉ *et al.*, 2020).

Logo, a criopreservação é uma biotécnica relevante podendo ser aplicada em conjunto com a Produção *In vitro* de embriões (PIVE), a superovulação com transferência de embriões, e a punção folicular guiada por ultrassom (GONÇALVES *et al.*, 2008). Para exemplificar, somente no ano de 2020, segundo dados do IETS- 2020, a proporção de embriões produzidos *in vivo*, congelados, aquecidos e transferidos, foi de 40,5%, enquanto de embriões *in vitro* congelados e aquecidos foi de 43,9% (VIANA, 2021). Demonstrando a importância da criopreservação no contexto e prática comercial das biotecnologias reprodutivas.

3.2 Princípios da vitrificação

A criopreservação pode ser feita por congelamento lento e por vitrificação. Esses métodos diferem em relação à quantidade de crioprotetores e o tempo de resfriamento (CASTRO *et al.*, 2011). O congelamento lento utiliza baixas concentrações de crioprotetores e tempo de resfriamento prolongado pois o decréscimo de temperatura é gradual, o que por um lado possibilita a interação do soluto com água no meio intracelular e por outro lado pode ocasionar a formação de cristais de gelo, choque osmótico, e alterações irreversíveis à membrana plasmática. A vitrificação utiliza maior concentração de crioprotetores pois submete as amostras a resfriamento ultrarrápido.

Como vantagem a vitrificação facilita a rápida desidratação das células, passando do estado líquido para sólido em poucos segundos, e deixando-as facilmente permeáveis aos crioprotetores (RAJAN; MATSUMURA, 2018). Os crioprotetores agem no meio formando uma solução viscosa que se mistura à água da célula, impedindo que estas se transformem em cristais de gelos durante o resfriamento. Por outro lado, essas altas concentrações de crioprotetores também pode ser tóxica para a célula (LIU *et al.*, 2021).

A eficácia da vitrificação varia entre os protocolos e tem relação com as formas de manuseio da técnica como, a viscosidade do meio, a quantidade de crioprotetores, o tempo de exposição aos crioprotetores, o volume, a taxa de resfriamento e por fim, o aquecimento, evitando ao máximo o nível de estresse da célula (GUPTA *et al.*, 2021).

Os protocolos habituais de vitrificação de embriões e oócitos consiste em iniciar com uma solução de equilíbrio contendo baixas concentrações de crioprotetores, expor gradativamente a concentrações maiores, e finalizar com o rápido resfriamento (BOLDT, 2011). De certa forma, a vitrificação objetiva evitar a formação de cristais de gelo intracelular e cristalização extracelular, que são os causadores de lesão durante o resfriamento dos oócitos (YANG *et al.*, 2017; MANDAWALA *et al.*, 2016).

3.2.1 Fatores que influenciam a vitrificação de oócitos

Um fator que influencia na eficiência da vitrificação é a qualidade dos oócitos ou blastocistos, esta qualidade se relaciona a capacidade do oócito ou embrião, em resistir as crioinjúrias decorrentes do resfriamento e do aquecimento. Por sua vez, as crioinjúrias acarretam alterações nas organelas, diminuição das junções intercelulares, alterações na atividade das mitocôndrias, mudanças em níveis da expressão de genes e fissuras no citoesqueleto (DALCIN *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

Células com acúmulo de lipídios na membrana também é um dos fatores limitantes que diminuem o sucesso da técnica, de modo que a integridade da membrana celular pode ser afetada durante o resfriamento (ABE *et al.*, 2002; IDRISSE *et al.*, 2021; MENEGHEL *et al.*, 2017), pois as células recebem um volume significativo de água e crioprotetores, no qual, membranas precisam ser mais permeáveis e flexíveis para auxiliar na movimentação intracelular, assim, evitando o estresse osmótico e a alteração da integridade da membrana (SEIDEL, 2006). Além disso, o citoplasma oócitos e embriões bovinos comumente apresenta grandes quantidades de gotículas lipídicas (LDs) que podem dificultar o processo de criopreservação, o resfriamento- aquecimento, altera as propriedades físicas, químicas dos lipídios intracelulares, causando crioinjúrias na célula (AMSTISLAVSKY *et al.*, 2019).

Outro fator que influencia a sobrevivência pós aquecimento dos oócitos é o estágio de maturação. Não há um consenso na literatura sobre qual o estágio mais adequado para congelamento, pois alguns estudos sugerem que os mais adequados são os oócitos imaturos (FAGUNDES *et al.*, 2004; SERRA *et al.*, 2020), enquanto outros estudos sugerem que são os oócitos maturados (CHAVES *et al.*, 2017; CHINEN *et al.*, 2020).

Fagundes *et al.* (2004) ao criopreservar oócitos imaturos e maturados, observaram apenas 0,4% de clivagem em oócitos imaturos e não observaram clivagem em oócitos maturados. Enquanto Chaves *et al.* (2017) observaram que CCOs maturados não apresentaram anormalidades do fuso meiótico e a taxa de clivagem foi maior comparado aos imaturos (19% vs. 8%, respectivamente). Contudo, tanto CCOs imaturos e maturados formaram menos embriões comparados ao controle sem vitrificação.

Os oócitos imaturos e maturados diferem no aspecto nuclear o que pode estar relacionado a estes resultados, o imaturo apresenta ausência do fuso meiótico que por sua vez, é uma estrutura susceptível aos danos do congelamento (SERRA *et al.*, 2020). Em contrapartida, oócitos maturados, em metáfase II, já apresentam as estruturas do fuso e, logo, quando sofrem o congelamento pode ocorrer a instabilidade dos fusos meióticos prejudicando a meiose e consequentemente a fertilização (SHAW *et al.*, 2000).

3.2.2 Vitrificação em oócitos bovinos

Um dos métodos mais conhecidos para vitrificação de oócitos bovinos é o método OPS - *Open Puller Straw* (VAJTA *et al.*, 1998). Em seguida, o método Cryotop que foi originalmente proposto para oócitos humanos (KUWAYAMA *et al.*, 2005) e que tem sido empregado em bovinos também. Além desses métodos clássicos há diversos trabalhos buscando otimizar a vitrificação (revisado por DUJÍČKOVÁ *et al.*, 2021).

Independente dos protocolos citados a seguir, um ponto em comum que deve ser ressaltado é que o meio de vitrificação mais utilizado é o TCM 199 suplementado com 10 a 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), chamado de Meio Base. Por sua vez, os crioprotetores mais citados são o etilenoglicol (EG) e o Dimetilsulfóxido, DMSO (CHAVES *et al.*, 2017; DINNYÉS *et al.*, 2000; FAHEEM *et al.*, 2015; OLEXIKOVÁ *et al.*, 2020; PAPIS *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 2018; TASHIMA *et al.*, 2017).

A tabela 1 sumariza alguns estudos que serão discutidos a seguir.

Tabela 1- Estudos sobre vitrificação de oócitos bovinos e parâmetros investigados.

Autor (ano)	Estádio celular	Experimento
Vajta <i>et al.</i> (1998)	Oócitos maturados	Propor método de vitrificação OPS (<i>Open Pulled Straw</i>)
Papis <i>et al.</i> (2000)	Oócitos maturados	Testar concentrações (0, 1, 2, 4 e 6% EG) e tempo de exposição aos crioprotetores (2, 12 e 15min pré-equilíbrio)
Dinnyés <i>et al.</i> (2000)	Oócitos maturados	Testar novo método de vitrificação que usa uma superfície de metal pré-congelada.
Kuwayama <i>et al.</i> (2005)	Oócitos maturados	Propor método de vitrificação Cryotop®
Faheem <i>et al.</i> (2015)	Oócitos imaturos	Testar combinações de crioprotetores (EG, DMSO e PROH)
Chaves <i>et al.</i> (2017)	Oócitos imaturos e maturados	Comparar vitrificação de oócitos em diferentes estádios do ciclo celular (imaturos <i>versus</i> maturados)
Tashima <i>et al.</i> (2017)	Oócitos imaturos	Testar redução ou remoção total do tamanho das camadas de células dos CCOs para vitrificação
Paul <i>et al.</i> (2018)	Oócitos maturados	Comparar novo método que utiliza criodispositivo de papel ao método Cryotop®
Olexiková <i>et al.</i> (2020)	Oócitos maturados	Testar novo método de vitrificação que usa grade de microscopia eletrônica feita de níquel.
Chinen <i>et al.</i> (2020)	Oócitos maturados	Comparar novo método que utiliza malhas de náilon com diferentes tamanhos (37, 57 e 77µM) ao método Cryotop®

Fonte: A autora

Muitos estudos procuram otimizar a vitrificação de oócitos bovinos ao modificar a concentração e/ou o tempo de exposição aos crioprotetores. Papis *et al.* (2000) vitrificaram oócitos maturados em TCM 199 com 20% de SFB, EG 5,5 M e sacarose 1,0 M e testaram vários tempos de pré-equilíbrio dos oócitos em soluções de crioprotetor. Faheem *et al.* (2015) ao vitrificarem oócitos imaturos utilizaram combinações de crioprotetores EG, DMSO e 1,2 propanodiol (PROH) e como resultado não observaram diferença entre as taxas de blastocisto, após o aquecimento, em comparação ao controle.

Outros estudos até mesmo propõem novos protocolos com uso de diferentes criodispositivos para depositar os oócitos vitrificados (CHINEN *et al.*, 2020; DINNYÉS *et al.*, 2000; OLEXIKOVÁ *et al.*, 2020; PAUL *et al.*, 2018), ou até mesmo ao propor mudanças no preparo das amostras (CHAVES *et al.*, 2017; TASHIMA *et al.*, 2017;).

Quanto aos estudos propondo inovações na vitrificação podemos citar o uso de novos criodispositivos de papel (PAUL *et al.*, 2018), de malha de náilon (CHINEN *et al.*, 2020), superfície de metal pré-congelada (DINNYÉS *et al.*, 2000) e até grade de microscopia eletrônica feita de níquel (OLEXIKOVÁ *et al.*, 2020). Como aspecto em comum, todos utilizaram meio base TCM199 e 20% SFB e diferentes concentrações de EG variando de 7,5 a 35% combinado a DMSO, sucrose, polivinil-pirrolidona ou trealose. Quanto aos resultados, todos relataram taxas de clivagem ou blastocisto inferiores ao grupo controle sem vitrificação (CHINEN *et al.*, 2020; DINNYÉS *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 2018) ou no máximo taxas similares ao controle (OLEXIKOVÁ *et al.*, 2020). Alguns estudos ainda incluíram um grupo controle Cryotop por ser um método de vitrificação reconhecido que serviu como outro parâmetro de comparação (CHINEN *et al.*, 2020; PAUL *et al.*, 2018). Esses estudos demonstram que a vitrificação embora esteja em constante aprimoramento ainda precisa melhorar o aspecto da qualidade oocitária pós-aquecimento, já que em todos os estudos ainda fica aquém do controle *á fresco*.

Uma das propostas mais diferentes foi a de Tashima *et al.* (2017) que propuseram a remoção completa ou redução do tamanho das camadas de células dos cúmulos de oócitos imaturos, pois segundo os autores, ajudaria a penetração dos crioprotetores de forma mais uniforme. Então empregaram o método Cryotop em meio TCM199 com 20% de SFB, com exposição gradual aos crioprotetores EG 7,5% e DMSO 7,5%, seguido de outra etapa em EG 15%, DMSO 15% e sacarose 0,5 M. Como resultado observaram taxa de blastocistos maior em oócitos com redução de células do cumulus (30,5-31,2%) comparado aos com remoção total (13,4-23,7%).

Outra proposta diferente foi Chaves *et al.* (2017) que compararam a vitrificação de oócitos maturados e imaturos em meio base (TCM199-HEPES e SFB 20%) empregando o método OPS e exposição gradual aos crioprotetores, primeiramente DMSO e EG a 7,5%, seguido de DMSO e EG a 16% EG mais sacarose 1M. Como resultado, oócitos imaturos e maturados vitrificados em seguida aquecidos e fertilizados, formaram menos embriões blastocistos comparados ao grupo controle sem vitrificação (29% e 20% *versus* 51%, respectivamente).

Resumidamente, os protocolos para vitrificar oócitos bovinos proporcionam menor formação de embriões após aquecimento quando comparados ao controle *à fresco*. Dessa forma, há uma busca por adaptações e/ ou novos protocolos para otimizar a técnica.

3.3 O uso de fluido folicular em substituição ao SFB

Como podemos observar no item anterior (3.2.2) o uso de meio base TCM199 suplementado com 10 a 20% de SFB é um aspecto comum aos protocolos de vitrificação de oócitos. O SFB por sua vez é um componente bastante utilizado nos meios de cultivo pois proporciona grande variedade de nutrientes como glicoproteínas, fatores proteicos, fatores de crescimento, eletrólitos (GONÇALVES *et al.*, 2015), vesículas extracelulares (HUNG *et al.*, 2015) e hormônios esteróides (CHOU;CHEN, 2018).

Os primeiros estudos a reportar o uso de fluido folicular em adição ou em substituição ao SFB foram publicados na década de 1990 (LONERGAN *et al.* 1994; ROMERO; SEIDEL, 1994; COLLINS; WRIGHT, 1995; KIM *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 1998) suplementado ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Desde então, o fluido folicular vem sendo estudado inclusive em trabalhos mais recentes (LOPES *et al.*, 2019; MUTARY *et al.*, 2019; AZARI *et al.*, 2021).

A tabela 2 sumariza os principais estudos que utilizaram o fluido folicular em substituição ao SFB para maturação *in vitro* de oócitos.

Tabela 2- Estudos sobre o uso de fluido folicular em substituição ao SFB.

Autor (ano)	Espécie	Objetivo do Estudo
Lonergan <i>et al.</i> (1994)	Bovinos	Testar uso de fluido folicular de folículos pequenos (2–6 mm) e grandes (>6 mm) na maturação <i>in vitro</i>
Romero; Seidel (1994)	Bovinos	Testar o uso de fluido folicular obtido de folículos pré- e pós-ovulatórios na maturação <i>in vitro</i>
Collins ; Wright (1995)	Bovinos	Testar o uso de fluido folicular tratado por aquecimento para esterilização na maturação <i>in vitro</i>
Kim <i>et al.</i> (1996)	Bovinos	Testar concentrações (10, 30 e 60%) de fluido folicular ao meio de maturação oocitária <i>in vitro</i>
Choi <i>et al.</i> (1998)	Bovinos	Testar a maturação <i>in vitro</i> de oócitos em fluido folicular não diluído derivado de folículos com diferentes tamanhos
Avery <i>et al.</i> (2003)	Bovinos	Testar o uso de fluido folicular não diluído derivado de folículos com diferentes tamanhos <i>versus</i> TCM + 5%SFB
Gruppen; Armstrong (2010)	Suínos	Testar o uso de 25% de fluido folicular ao meio de maturação oocitária <i>in vitro</i>
Somfai <i>et al.</i> (2012)	Bovinos	Testar a adição de 5% de polivinilpirrolidona, albumina sérica, SFB e fluido folicular ao meio de maturação
Cruz <i>et al.</i> (2014)	Bovinos	Testar o uso de 25, 40, 75 e 100% de fluido folicular adicionado a meio de maturação com 10% SFB
Lopes <i>et al.</i> (2019)	Bovinos	Testar concentração de 10% de fluido folicular ao meio de maturação oocitária <i>in vitro</i>
Mutary <i>et al.</i> (2019)	Ovelhas	Testar o uso de 10, 20 e 40% de fluido folicular em substituição ao SFB na maturação oocitária <i>in vitro</i>
Azari <i>et al.</i> (2021)	Bovinos	Testar 5% de fluido folicular suplementado ao meio de maturação oocitária <i>in vitro</i>

Fonte: A autora

Em bovinos, Kim *et al.* (1996) testaram 10, 30 e 60% de fluido folicular adicionadas ao meio de maturação *in vitro*, tendo melhores respostas na proporção de 10%, visto que as demais diminuíram a taxa de blastocisto sugerindo efeito inibitório da meiose. Posteriormente, proporção equivalente à 10% foi testada por Lopes *et al.* (2019) que obtiveram taxa de embriões eclodidos equivalente ao grupo controle. Da mesma forma, a proporção de 5% de fluido folicular em meio de maturação, melhorou a expansão do cúmulo da célula, e a qualidade do blastocisto (AZARI *et al.*, 2021).

Em suínos, Grupen; Armstrong (2010) reportaram que a suplementação de meio de maturação com 25% de fluido folicular foi capaz de promover a maturação oocitária e oferecer proteção contra o estresse oxidativo. De forma similar, em ovelhas, a suplementação com 10% de fluido folicular induziu maior concentração citoplasmática de glutathione, um agente antioxidante importante, o que indica provável proteção oxidativa para os oócitos (MUTARY *et al.*, 2019). Os autores também relataram que 10% e 20% de fluido folicular apresentaram taxas de maturação semelhantes ao controle, porém com 40% de suplementação esta taxa diminuiu (37% vs. 61%, respectivamente).

Os trabalhos mencionados acima destacam a utilidade do fluido folicular para promover a maturação oocitária de forma similar ao SFB ao ser adicionado ao meio de cultivo. Isto se deve a composição do fluido folicular rico em proteínas, fatores de crescimento, glicose, lactato, entre outros nutrientes que proporcionam um ambiente propício para o cultivo celular (HUNG *et al.*, 2015; READ *et al.*, 2021).

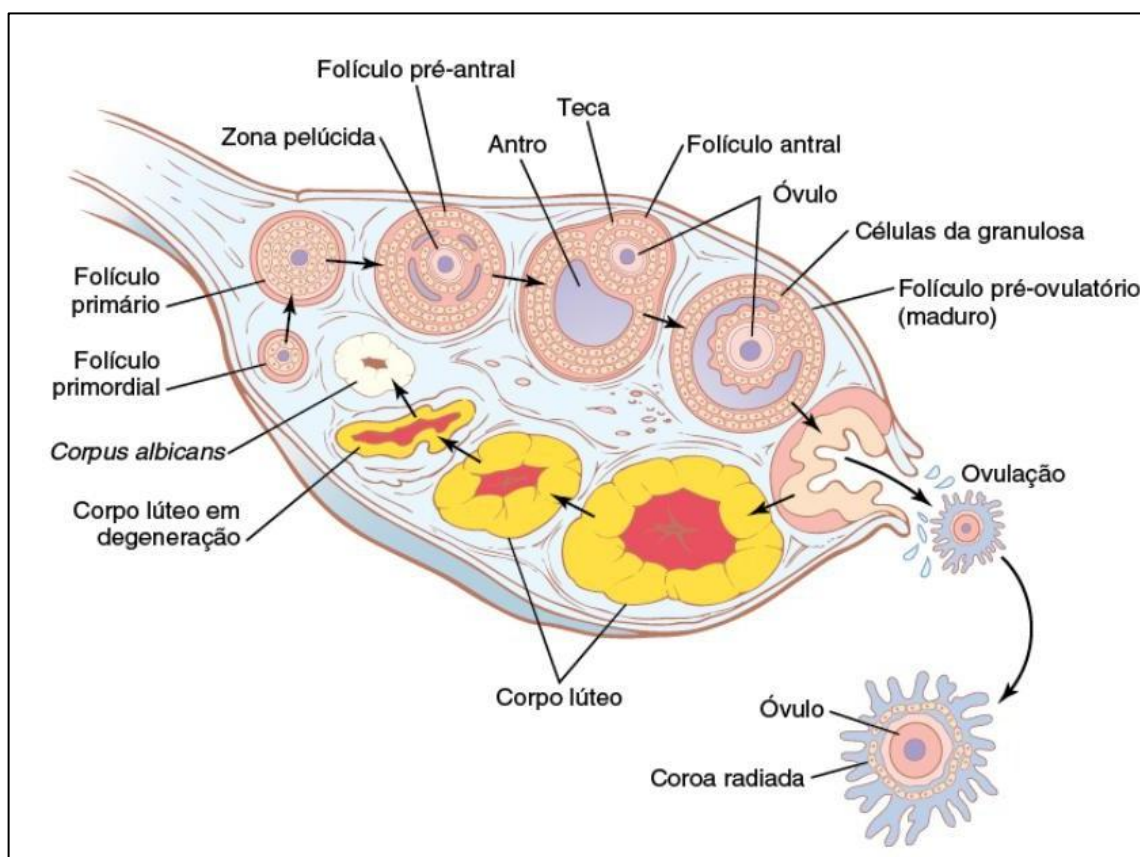
Todas essas evidências na literatura demonstram a utilidade do fluido folicular como um componente capaz de substituir as funções do SFB no meio de cultivo, pelo menos no tocante a maturação oocitária *in vitro*. Seu uso em substituição ao SFB para outra finalidade além da maturação *in vitro*, contudo, nunca foi testado.

Dado o exposto, este trabalho propõe um protocolo de vitrificação que adicione fluido folicular ao meio de vitrificação, em substituição ao uso do SFB. Hipotetizamos que o uso de fluido folicular no meio de vitrificação seja benéfico para o desenvolvimento pós-aquecimento dos oócitos vitrificados.

3.3.1 Composição do fluido folicular

Na foliculogênese os folículos são classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e de Graaf) conforme ilustra a Figura 1. Os folículos primordiais são formados na fase embrionária de vida e os oócitos em seu interior ficam estacionados na primeira divisão meiótica (oócitos vesícula germinativa, VG) até a fase reprodutiva do indivíduo, quando os folículos primordiais se tornam folículos primários (MELLO *et al.*, 2013; MOORE, 2016). Então, sob ação do hormônio folículo estimulante (FSH) o folículo primário torna-se secundário (BETTERIDGE *et al.*, 1989), e observa-se o aumento no diâmetro folicular, formação do antro e acúmulo do fluido folicular que fornece a nutrição aos CCOs (GUTIERREZ *et al.*, 2000).

Figura 1- Fases do crescimento folicular no ovário.



Fonte: HALL., 2017.

Quanto a composição, o fluido folicular contém uma diversidade de proteínas como proteínas de ligação a IGF, metaloproteases, proteínas antiapoptóticas, relacionadas à inflamação, ao metabolismo lipídico, fatores de coagulação, de crescimento da insulina (IGF) e fatores antioxidantes como reportado por estudos proteômicos feitos em bovinos (FERRAZA *et al.*, 2017) e humanos (ZAMAH *et al.*, 2015; ZAKERKIS *et al.*, 2020).

Além disso, o fluido folicular contém diversos outros metabólitos como glicose, colesterol triglicerídeos, lactato, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase, aminoácidos, derivados de glicose, intermediários ou derivados do ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), ácidos graxos, éster de esteróide e uridina de nucleosídeo, conforme relatado em estudos de análise bioquímica em ovelhas (NANDI *et al.*, 2007) e vacas (READ *et al.*, 2021).

O fluido folicular também contém vesículas extracelulares as quais têm sido relacionadas a maturação oocitária (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013) e ao desenvolvimento embrionário (ASAADI *et al.*, 2021), pois carregam moléculas bioativas como RNA, lipídios, proteínas e microRNAs.

A concentração desses componentes no fluido folicular, contudo, podem mudar em resposta a situações fisiológicas. Por exemplo, de acordo com estudo feito em humanos (ZAKERKIS *et al.*, 2020) ocorrem diferenças nos níveis de proteína do fluido folicular nas fases pré-ovulatória e ovulatória do ciclo ovariano, onde as proteínas relacionadas à inflamação, ao metabolismo lipídico e fatores de coagulação e antioxidantes apresentaram níveis mais elevados durante a ovulação. Outro exemplo é a mudança de cerca de 38 metabólitos no fluido folicular de folículos pré-ovulatórios e em estágio final de maturação oocitária expostos a um pico de gonadotrofina (GnRH2) conforme o estudo em vacas de idade entre 4 a 8 anos (READ *et al.*, 2021).

Outro exemplo, é o aumento dos níveis de glicose e colesterol, e concomitante diminuição de triglicerídeos, lactato, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase conforme o crescimento do folículo (NANDI *et al.*, 2007). Ou seja, em folículos grandes onde existe pouco consumo de glicose, ocorre, portanto, a diminuição de lactato, em comparação com os folículos menores em que os triglicerídeos e lactato estão em concentração maior pois são fontes de energia para as células em proliferação (LEROY *et al.*, 2004).

4 Referências

- ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.
- ALMODIN, C. G. et al. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p. 1192-1198, 2010.
- AMSTISLAVSKY, S. et al. Influence of cellular lipids on cryopreservation of mammalian oocytes and preimplantation embryos: a review. **Biopreservation and biobanking**, v. 17, n. 1, p. 76-83, 2019.
- ARAV, A. et al. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. **J Assist Reprod Gen**, v. 35, n.7, p.1161-1168, 2018.
- ASAADI, A. et al. Extracellular Vesicles from Follicular and Ampullary Fluid Isolated by Density Gradient Ultracentrifugation Improve Bovine Embryo Development and Quality. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 578, 2021.
- AVERY, B. et al. In vitro maturation of bovine cumulus–oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 987-999, 2003.
- AZARI, D. N. et al. Follicular fluid during individual oocyte maturation enhances cumulus expansion and improves embryo development and quality in a dose-specific manner. **Theriogenology**, v. 166, p. 38-45, 2021.
- BETTERIDGE, K. J. et al. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.
- BOLDT, J. Current results with slow freezing and vitrification of the human oocyte. **Reproductive biomedicine online**, v. 23, n. 3, p. 314-322, 2011.
- BRUYERE, P. et al. Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1294-1302, 2012.
- CAAMAÑO, J. N. et al. Survival of vitrified *in vitro*–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 881-890, 2015.
- CASTRO, S V. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.
- CHAVES, D. F. et al. Vitrification of immature and *in vitro* matured bovine cumulus-oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development. **Livestock Science**, v. 199, p. 50-56, 2017.

CHEN, H. et al. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 868-878, 2016.

CHINEN, S. et al. Nylon mesh cryodevice for bovine mature oocytes, easily removable excess vitrification solution. **Cryobiology**, v. 90, p. 96-99, 2019.

CHINEN, S. et al. Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol. **Cryobiology**, v. 97, p. 185-190, 2020.

CHOI, Y. H. et al. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 50, n. 1-2, p. 27-33, 1998.

CHOU, C.H; CHEN, M. J. The effect of steroid hormones on ovarian follicle development. **Vitamins and hormones**, v. 107, p. 155-175, 2018.

CRUZ, M. H. C. et al. Effect of follicular fluid supplementation during in vitro maturation on total cell number in bovine blastocysts produced in vitro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 120-126, 2014.

DALCIN, L. et al. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v. 67, p. 137-145, 2013.

DINNYÉS, A. et al. High rates of vitrified bovine oocyte development after parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol of Reprod**, v. 63, n. 2, p. 513-518, 2000.

DO, V. H. et al. Vitrification of *in vitro*-derived bovine embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardising procedures. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 5, p. 837-846, 2019.

DUJÍCKOVÁ, L. et al. Methodological approaches for vitrification of bovine oocytes. **Zygote**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2021.

FAGUNDES, L. M .et al. Congelação de ovócitos desnudados ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o Etileno Glicol pelo método convencional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 2026-2036, 2004.

FAHEEM, M. S et al. The effect of vitrification of immature bovine oocytes to the subsequent *in vitro* development and gene expression. **Zygote**, v. 23, n. 6, p. 933-942, 2015.

FERRAZZA, R. A et al. Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. **Biology of reproduction**, v. 97, n. 6, p. 835-849, 2017.

FERRÉ, L. B et al. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, n. 55, p.659-676, 2020.

GONÇALVES, M.C et al. Criotolerância de oócitos e embriões bovinos maturados com líquido folicular e/ou β -mercaptoetanol. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 205-216, 2015.

GONÇALVES, P. B. D. et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução**. 2. ed. Roca, 2008. p.261-291.

GRUPEN, C. G; ARMSTRONG, D.T. Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effects of follicular fluid during IVM. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 7, p. 1100-1109, 2010.

GUPTA, P. S. P. et al. Effect of different vitrification protocols on post thaw viability and gene expression of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.178, P.1-7, Jan, 2021.

GUTIERREZ, C. G. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biol Reprod**, v.62, p.1322-1328, 2000.

HALL, J. E. **Guyton & Hall, Tratado de Fisiologia Médica**. 13ª Edição. Editora Elsevier, 2017.

HUNG, W.T et al. Extracellular vesicles from bovine follicular fluid support cumulus expansion. **Biology of reproduction**, v. 93, n. 5, p. 117, 1-9, 2015.

IDRISSI, S. J. et al. Lipid profile of bovine grade-1 blastocysts produced either *in vivo* or *in vitro* before and after slow freezing process. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p.1-16, 2021.

KIM, K. S. et al. The effects of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 787-799, 1996.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, p.300-308, 2005.

LEROY, J. L. M. R. et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 3-4, p. 201-211, 2004.

LIRA, O. G.P. et al. Effects of somatic tissue cryopreservation on puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) tissue integrity and cell preservation after *in vitro* culture. **Cryobiology**, v.101, p.52-60, 2021.

LIU, J. et al. Low cryoprotectant concentration rapid vitrification of mouse oocytes and embryos. **Cryobiology**, v. 98, p. 233-238, 2021.

LONERGAN, P. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

LOPES, J. S. et al. Supplementation of bovine follicular fluid during *in vitro* maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. **Theriogenology**, v. 126, p. 222-229, 2019.

MANDAWALA, A. A. et al. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637-1644, 2016.

MELLO, R. R. C. et al. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 4, p. 328-333, 2013.

MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of *in vitro*-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 395-400, 2017.

MOORE, K. I. **Embriologia básica. 9a edição**. Elsevier. Brasil, 2016.

MORRELL, J. M; MAYER, I. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. **Zygote**, v. 25, n. 5, p. 545-557, 2017.

MUTARY, M. A. et al. Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on *in vitro* maturation and gene expression of sheep oocytes. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1216-1222, 2019.

NANDI, S. et al. Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. **Development, growth & differentiation**, v. 49, n. 1, p. 61-66, 2007.

NOWAK, A. et al. The Viability of Serval (*Leptailurus Serval*) and Pallas Cat (*Felis Manul*) Oocytes After Cryopreservation Using the Rapid-I Method. **CryoLetters**, v. 40, n.4, p.226-230, 2019.

OLEXIKOVÁ, L. et al. Development and ultrastructure of bovine matured oocytes vitrified using electron microscopy grids. **Theriogenology**, v. 158, p. 258-266, 2020.

PAPIS, K. et al. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-658, 2000.

PAUL, A. K. et al. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 2, p. 307-315, 2018.

PRIETO, M. T. et al. Sperm cryopreservation in wild animals. **European journal of wildlife research**, v. 60, n. 6, p. 851-864, 2014.

RAJAN, R.; MATSUMURA, K. Development and application of cryoprotectants. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, Singapore, p. 339 – 354, 2018.

RAPOSO, G; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013.

READ, C. C. et al. Correlation between Pre-Ovulatory Follicle Diameter and Follicular Fluid Metabolome Profiles in Lactating Beef Cows. **Metabolites**, v. 11, n. 9, p. 623, 2021.

RIENZI, L. et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. **Human reproduction update**, v. 23, n. 2, p. 139-155, 2017.

ROMERO, A. A.; SEIDEL, J.R. G. E. Effects of bovine follicular fluid on maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, n. 2, p. 383-394, 1994.

- SARANDI, S. et al. A prospective study to compare the efficiency of oocyte vitrification using closed or open devices. **Gynecologie, Obstetrique & Fertilité**, v. 44, n. 5, p. 280-284, 2016.
- SEIDEL J.G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.
- SERRA, E. et al. Morphological features and microtubular changes in vitrified ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 148, p. 216-224, 2020.
- SHAW, J. M.; et al. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SILVA, A. M. et al. Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n. 2, p. 229-234, 2019.
- SOMFAI, T. et al. Follicular fluid supplementation during in vitro maturation promotes sperm penetration in bovine oocytes by enhancing cumulus expansion and increasing mitochondrial activity in oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 5, p. 743-752, 2012.
- TASHIMA, K. et al. Downsizing cumulus cell layers to improve cryotolerance of germinal vesicle-stage bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 95, p. 1-7, 2017.
- VAJTA, G et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev**, v.51, p.53-58, 1998.
- VIANA, J.C. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 39, n. 4, p. 17, 2021.
- YANG, J. et al. Exploring the potential of biocompatible osmoprotectants as highly efficient cryoprotectants. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 49, p. 42516-42524, 2017.
- ZAKERKISH, F. et al. Proteomic analysis of follicular fluid during human ovulation. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 99, n. 7, p. 917-924, 2020.
- ZAMAH, A. M. et al. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. **Clinical proteomics**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2015.

CAPÍTULO II- Vitrificação com fluido folicular em oócitos bovinos

O artigo será submetido a *Ciência Animal Brasileira*, Qualis B2 (Veterinary Science area)

Brazilian Animal Science

**Vitrificação com fluido folicular em oócitos bovinos
Vitrification with follicular fluid in bovine oocytes**

Resumo: Este estudo teve como objetivo vitrificar oócitos em uma solução suplementada com Fluido Folicular Bovino (FFB) ou Soro Fetal Bovino (FBS) para investigar a sobrevivência pós-aquecimento por meio da maturação nuclear e análise da expressão gênica de HSP70. Oócitos imaturos ou maturados in vitro foram vitrificados em solução com 20% de FFB ou 20% de FBS e comparados ao controle negativo (sem vitrificação). A vitrificação foi realizada utilizando o método OPS, com duas etapas de equilíbrio e etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose. Como resultado, os grupos FFB e FBS não diferiram ($p > 0,001$) e ambos apresentaram taxas de MII (mielopatia in situ) menores ($p > 0,001$) do que o controle (8,2% e 0,0% versus 73,9%, respectivamente). Além disso, a expressão do gene HSP70 nos grupos FFB e FBS não diferiu ($p > 0,05$) em oócitos maduros, embora ambos fossem maiores que o controle ($p < 0,05$). Nas células da granulosa, FFB e FBS também diferiram entre si e do controle ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que o fluido folicular pode ser usado para substituir a suplementação com FBS em meios de vitrificação de oócitos bovinos. Embora o protocolo de vitrificação precise de melhorias para reduzir as taxas de degeneração, houve sobrevivência dos oócitos e maturação nuclear adicional após o aquecimento. O aumento da expressão do gene HSP70 tanto em oócitos maduros quanto em células da granulosa provavelmente é uma resposta ao estresse induzido pela vitrificação.

Palavras-chave: crioprotetores; estresse; expressão gênica; maturação.

Abstract: This study aimed to vitrify oocytes in a solution supplemented with Bovine Follicular Fluid (FFB) or Fetal Bovine Serum (FBS) to investigate survival post-heating by nuclear maturation and gene expression analysis of *HSP70*. Immature oocytes or in vitro matured oocytes were vitrify in solution with 20% FFB or 20% FBS and compared to the negative control (without vitrification). Vitrification was performed using OPS method, with two equilibration steps and ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), and sucrose. As results, FFB and FBS groups did not differ ($p > 0.001$), and both showed lower MII rates ($p > 0.001$) than control (8.2% and 0.0% versus 73.9%, respectively). Moreover, *HSP70* gene expression in FFB and FBS groups did not differ ($p > 0.05$) in matured oocytes, although both were higher than control ($p < 0.05$). In granulosa cells, FFB and FBS were different from each other and from the control too ($p < 0.05$). These results indicate that follicular fluid can be used to replace FBS supplementation in bovine oocyte vitrification media. Although the vitrification protocol needs improvements to reduce degeneration rates, there was oocyte survival and additional nuclear maturation after warming. The increased expression of the *HSP70* gene in both mature oocytes and granulosa cells is likely a response to vitrification-induced stress.

Keywords: cryoprotectants; stress; gene expression; maturation.

5. Introdução

A vitrificação é um método de criopreservação no qual a solução contendo as células sofre uma transição rápida do estado líquido para o sólido, formando uma estrutura semelhante ao vidro em segundos ⁽¹⁾. A eficiência do protocolo de vitrificação é avaliada com base na sobrevivência e viabilidade dos oócitos após o aquecimento, podendo ser influenciada pela concentração do crioprotetor ⁽²⁾, tempo de exposição, fase de equilíbrio ⁽³⁾ e tipo de criodispositivo, ^(4,5,6,7) sendo a qualidade do oócito um fator determinante ^(8,1). Assim como qualquer outro meio de cultura in vitro, os meios de vitrificação também são suplementados com soro fetal bovino (SFB). Recentemente, o SFB tem sido substituído por fluido folicular em meios de maturação de oócitos, resultando em taxas de blastocistos semelhantes ^(9,10,11,12). O fluido folicular contém proteínas, metabólitos, fatores de crescimento ⁽¹³⁾, metabólitos como glicose, colesterol, triglicerídeos, lactato e aminoácidos ⁽¹⁴⁾, além de vesículas extracelulares que mediam interações entre o cúmulo e o oócito, favorecendo assim a maturação ^(15,16).

Portanto, este estudo visa avaliar a eficiência de um meio de vitrificação de oócitos contendo fluido folicular bovino (FFB) como substituto do FBS. A sobrevivência pós-descongelamento foi avaliada por meio da taxa de maturação nuclear e da quantificação relativa dos transcritos de HSP70 em oócitos e células do cúmulo.

6. Materiais e métodos

6.1 Obtenção de Complexos Cumulus-Oócito (CCOs) e Fluido Folicular

Todos os procedimentos empregados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 3734070322. Os ovários foram obtidos de um matadouro comercial e transportados para o laboratório em solução de cloreto de sódio a 0,9% à temperatura ambiente por um período máximo de 2 horas. Folículos antrais com diâmetro de 2 a 10 mm foram aspirados utilizando uma seringa com agulha de calibre 18 para obtenção do fluido folicular. Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram recuperados do sedimento e apenas aqueles que apresentavam células do cumulus compactas e aspecto refringente ⁽¹⁷⁾ foram selecionados. O sobrenadante do fluido folicular foi centrifugado duas vezes a 3000 rpm durante 20 minutos para remover as células foliculares residuais, posteriormente filtrado através de um filtro HEPA de 0,2 µm e armazenado a -20 °C até ser adicionado ao meio de vitrificação.

6.2 Experimento 1: Efeito da vitrificação com BFF na maturação nuclear

O Experimento 1 foi realizado utilizando complexos cumulus-oócito (COCs) bovinos imaturos, alocados em três grupos para vitrificação, da seguinte forma: (1) Grupo FBS: COCs vitrificados em meio padrão composto por TCM-199 suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e crioprotetores; (2) Grupo BFF: COCs vitrificados em meio alternativo composto por TCM-199 suplementado com 20% de fluido folicular bovino (BFF) e crioprotetores; e (3) Controle negativo: COCs imaturos não vitrificados, imediatamente após a maturação in vitro. Os grupos FBS e BFF foram aquecidos após 48 horas e submetidos à maturação in vitro.

6.3 Vitrificação e aquecimento de oócitos imaturos

O protocolo de vitrificação descrito por Vajta et al. (1998), ⁽¹⁸⁾ com modificações, foi realizado, consistindo em duas etapas de equilíbrio utilizando soluções de vitrificação suplementadas com 20% de FBS ou 20% de BFF, em combinação com os seguintes crioprotetores: etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose. A solução de vitrificação 1 (VS1) consistia em TCM-199 suplementado com 10% de DMSO, 10% de EG e 20% de FBS ou BFF, de acordo com o grupo experimental. Os COCs foram equilibrados em VS1 por 3 minutos à temperatura ambiente. A solução de vitrificação 2 (VS2) consistia em TCM-199 suplementado com 20% de DMSO, 20% de EG, 0,5 M de sacarose e 20% de FBS ou BFF, de acordo com o grupo experimental, com um tempo máximo de exposição de 20 segundos. Em seguida, os complexos cumulus-oócito (COCs) foram carregados em capilares de microhematócrito de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 200 µm, cada um contendo cinco COCs, e imediatamente imersos em nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram até o aquecimento. Para o aquecimento, os capilares foram retirados do nitrogênio líquido e seu conteúdo foi imediatamente transferido para a solução de aquecimento. O procedimento de aquecimento consistiu em duas etapas de equilíbrio idênticas. Na primeira etapa, utilizou-se a solução SV2 com 20% de BFF ou FBS por 20 segundos. Na segunda etapa, utilizou-se a solução SV1 com 20% de BFF ou FBS por 5 minutos. Dessa forma, os COCs passaram por maturação in vitro.

6.4. Maturação In Vitro

Grupos de 10 complexos cumulus-oócito imaturos (COCs) foram cultivados em gotas de 100 µL de meio TCM-199 suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro

fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA), 11 mg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo-estimulante (FSH) (Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá) e 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH) (Lutropin®, Bioniche Animal Health). As gotas foram cobertas com óleo mineral estéril e incubadas a 38,5 °C por 22 horas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

6.4.1 Maturação nuclear de oócitos imaturos vitrificados

A presença do primeiro corpúsculo polar foi avaliada utilizando um estereomicroscópio e confirmada pela coloração com orceína acética. Primeiramente, as células do cumulus foram removidas utilizando hialuronidase pré-aquecida a 38 °C, seguida de pipetagem sucessiva até a remoção completa das células. Os oócitos desnudos foram delicadamente comprimidos entre lâminas histológicas e lamínulas, previamente preparadas com dois filamentos finos de parafina posicionados em ambas as extremidades da lâmina para auxiliar na contenção das células. Após a montagem, ambas as extremidades foram seladas com adesivo para permitir a fixação em uma solução de ácido acético:metanol (3:1). Após 48 horas, a coloração foi realizada adicionando-se 100 µL de orceína acética através das bordas soltas da lamínula e visualizada em microscópio óptico.

6.5 Experimento 2: Efeito da vitrificação com BFF na expressão do gene HSP70

No Experimento 2, a expressão gênica relativa foi quantificada em oócitos que foram primeiramente maturados *in vitro* e posteriormente vitrificados em meios contendo FBS ou BFF. A expressão gênica relativa também foi quantificada em células do cumulus oócitos obtidas de oócitos imaturos que foram vitrificados em soluções contendo FBS ou BFF antes da maturação *in vitro*. Além disso, um grupo controle negativo, constituído por complexos cumulus-oócito (COCs) não vitrificados, foi incluído. Todos os grupos foram analisados quanto à expressão relativa do gene HSP70, utilizando GAPDH como gene de controle endógeno.

6.5.1 Vitrificação de oócitos imaturos e maturados *in vitro*

Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram obtidos e maturados *in vitro* conforme descrito no Experimento 1. Após 22 horas de maturação *in vitro*, os COCs foram vitrificados conforme descrito anteriormente.

6.5.2 Armazenamento de oócitos e células da granulosa para análise de expressão gênica

Após o aquecimento, os complexos cumulus-oócito (COCs) maturados *in vitro* foram armazenados para análise da expressão gênica. Primeiramente, a remoção das células do cumulus foi realizada por pipetagem sucessiva em uma solução contendo 0,5% de hialuronidase. Os oócitos desnudos foram transferidos para outra placa de Petri, enquanto as células do cumulus remanescentes foram lavadas em PBS suplementado com 0,1% de PVA, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e armazenadas em RNAlater® (Applied Biosystems) a -20 °C até a extração de RNA. Os oócitos desnudos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar, indicativo da metáfase II (MII). Apenas os oócitos em MII foram selecionados após a remoção da zona pelúcida utilizando uma solução de protease a 1,5 mg/mL por 5 minutos a 38,5 °C e armazenados em RNAlater® a -20 °C.

6.5.3 Isolamento de RNA e PCR quantitativa em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR)

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Macherey-Nagel™ NucleoZOL (Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada experimento, pools de oócitos (n = 30) ou pools de células da granulosa foram preparados de acordo com o tratamento, correspondendo ao número de células obtidas da denudação ou biópsia de 14 COCs. Quatro réplicas biológicas foram utilizadas para cada tratamento.

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foi realizada utilizando um sistema Thermo 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) com o Power SYBR® Green One-Step PCR Master Mix (Applied Biosystems, Woolston Warrington, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante, em um volume final de reação de 10 µL. Os primers para o gene HSP70 (direto: GAACGCGCTGGAGTCGTAC; reverso: ATGGGGTTACACACCTGCTC) e para o gene de controle endógeno GAPDH (direto: CTCAACGGGAAGCTCACTG; reverso: CTCTGATGCCTGCTTCACCA) foram projetados usando a plataforma Primer3, com a espécie bovina como referência (números de acesso NM_174550.1 e NM_174550.1, respectivamente). Para a normalização dos dados de expressão gênica relativa, o grupo de controle negativo não vitrificado foi usado como calibrador. Todas as reações foram realizadas em triplicata e as eficiências das reações foram analisadas usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak e Schmittgen, 2001⁽¹⁹⁾, sendo consideradas aceitáveis apenas as eficiências entre 1,9 e 2,0. Inicialmente, os valores de CT para cada gene foram corrigidos de acordo com os valores de inclinação e intercepto obtidos da curva padrão, após o que os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ foram

calculados. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de duas vias no software SigmaPlot, com um nível de significância definido em 0,05.

6.5.4 Análise estatística

Os tratamentos em cada experimento foram aplicados no mesmo dia para cada grupo de oócitos, e cada rodada experimental foi repetida pelo menos quatro vezes. Os dados de sobrevivência após o aquecimento e de clivagem foram analisados por ANOVA, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni quando diferenças significativas foram identificadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot® 14.5, com nível de significância definido em $P < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Experimento 1: A vitrificação com fluido folicular não difere da vitrificação com soro fetal bovino

Um total de 373 complexos cumulus-oócito (COCs) foram vitrificados em meio suplementado com soro fetal bovino (FBS) ou soro fetal bovino (BFF), seguidos de aquecimento e maturação in vitro. Os grupos não diferiram entre si ($p > 0,001$); no entanto, apresentaram uma taxa de maturação nuclear menor em comparação com o grupo não vitrificado ($p < 0,001$), conforme mostrado na Tabela 2. Além disso, a taxa de degeneração foi maior nos grupos vitrificados em comparação com o controle ($p < 0,001$).

Table 2. Nuclear maturation of bovine oocytes vitrified with different medium.

Groups	Oocytes (n)	Cell cycle stage (% $\pm$ SD) *					
		Metaphase II			Degenerated		
Negative Control	80	73,9 ^{aA}	$\pm$	16,9	21,1 ^{bA}	$\pm$	15,0
FBS	143	0,0 ^{aB}	$\pm$	0,0	79,2 ^{bB}	$\pm$	29,4
FFB	150	8,2 ^{aB}	$\pm$	7,7	84,2 ^{bB}	$\pm$	13,7

*Rates are based on the number of oocytes vitrified.

Superscript capital letters denote differences within columns ($p < 0,001$).

Lowercase superscripts denote differences within lines ($p < 0,001$).

Em relação à morfologia, os complexos cumulus-oócito (COCs) apresentaram expansão das células do cumulus após o aquecimento e a maturação in vitro, indicando sobrevivência e viabilidade após a vitrificação em solução BFF. No entanto, após a coloração, o material genético do oócito apresentou-se fragmentado, uma característica consistente com morte celular. Em contraste, no grupo controle, observou-se expansão do cumulus juntamente com a presença de material genético intacto, caracterizando o estágio de metáfase II (Figura 2).

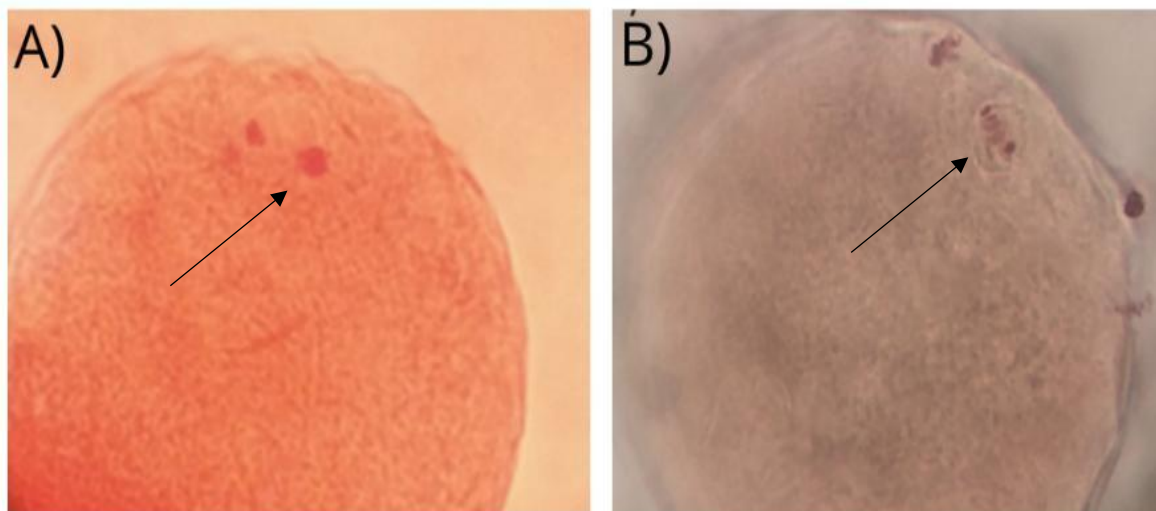


Figura 2. Complexos cumulus-oócito imaturos após vitrificação com solução à base de fluido folicular (BFF) comparados ao controle não vitrificado. **(A)** Oócito corado com orceína acética ilustrando a degeneração do material genético (seta). **(B)** Oócito corado do grupo controle, mostrando o estágio de metáfase II (seta).

7.2 Experimento 2: Expressão gênica após a vitrificação em solução de fluido folicular

Em relação à expressão do gene HSP70, os oócitos maturados in vitro e vitrificados em meio contendo FBS ou BFF não diferiram entre si ($p > 0,05$); no entanto, ambos diferiram do grupo controle ($p < 0,05$). Em contraste, as células do cumulus obtidas de biópsias de complexos cumulus-oócito imaturos, após vitrificação em meio contendo FBS ou BFF, diferiram entre si ($p < 0,05$) e também do controle ($p < 0,05$) (Figura 3). As células da granulosa do grupo FFB apresentaram uma leve diminuição na expressão do gene HSP70 em comparação ao controle ($p < 0,05$). Nos oócitos maturados, observou-se uma leve diminuição na expressão do gene HSP70 no grupo FFB em comparação ao grupo SFB, embora não significativa ($p > 0,05$).

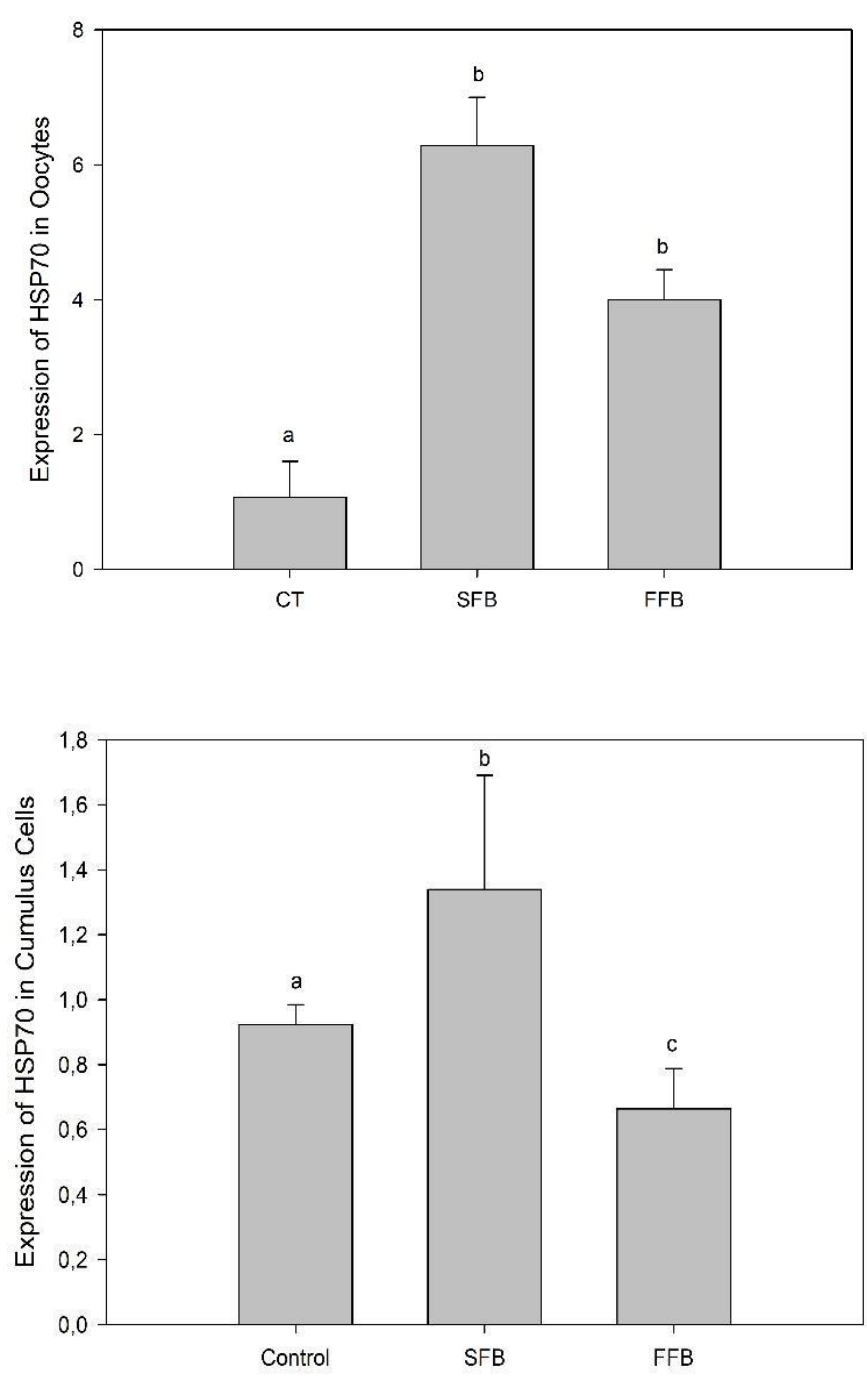


Figura 3. Expressão relativa do gene HSP70 em oócitos maturados in vitro (A) e em células da granulosa obtidas por biópsia de oócitos imaturos após vitrificação (B).

8. Discussão

De acordo com nossos resultados, o uso de fluido folicular (FFB) como substituto do FBS manteve efetivamente a disponibilidade de oócitos após a vitrificação, resultando na maturação nuclear. Isso contribuiu para o conhecimento atual sobre o uso de fluido folicular como um suplemento adequado, que tem sido bem documentado principalmente na maturação *in vitro* de oócitos ^(20,21, 7, 22,23, 17, 24, 25) e, até o momento, este é o primeiro estudo a relatar seu uso em meio de vitrificação de oócitos.

A vitrificação é conhecida como um procedimento estressante e, em relação aos oócitos imaturos, pode induzir alterações na membrana, danos ao fuso meiótico e ao citoesqueleto ^(14,26). Assim, como esperado, os oócitos vitrificados em soluções à base de BFF e FBS apresentaram danos estruturais na membrana citoplasmática e na zona pelúcida após o aquecimento, resultando em degeneração oocitária nos grupos vitrificados, que foi muito menor no controle não vitrificado. Esse resultado provavelmente se deve ao próprio procedimento de vitrificação. O grupo controle apresentou uma taxa de metáfase II comparável à relatada na literatura ^(27, 28), indicando que o sistema de maturação *in vitro* empregado neste estudo foi eficaz.

Portanto, o próprio processo de vitrificação foi responsável pelas taxas reduzidas de maturação pós-aquecimento observadas nos grupos FBS e BFF.

Estudos anteriores que utilizaram o método OPS para vitrificar oócitos bovinos imaturos relataram que a exposição a crioprotetores reduziu as taxas de maturação em comparação com os controles frescos (65–71%, respectivamente), nos quais apenas 19,8% dos oócitos vitrificados atingiram o estágio de metáfase II, exibindo, em vez disso, sinais de degeneração celular, como agregação cromossômica e citoplasma granular ^(9,29). Em contraste, outro estudo indicou que a redução da exposição ao crioprotetor durante a vitrificação melhorou as taxas de metáfase II, embora ainda inferiores à maturação nos controles frescos ⁽²⁾.

Foi relatado que a vitrificação de oócitos imaturos é vantajosa porque o fuso meiótico ainda não foi formado e a cromatina é protegida pela membrana nuclear (30,31,3). De fato, neste estudo, a avaliação de oócitos imaturos e maturados *in vitro* após a vitrificação mostrou sinais de danos aos núcleos e degeneração celular, além de apresentarem sobrevivência semelhante após a vitrificação.

Os oócitos vitrificados exibiram maior expressão relativa de HSP70 em comparação com o grupo controle, como esperado, visto que a vitrificação é um processo indutor de estresse celular ^(32,33,34) e promove o aumento da produção de proteínas chaperonas, como a HSP70, que atuam inibindo a apoptose ^(35,10,13). Da mesma forma, blastocistos bovinos submetidos à

vitricificação e ao aquecimento demonstraram aumento na expressão de HSP70 em resposta a concentrações progressivamente maiores de crioprotetores e danos à membrana, sugerindo que a produção de HSP70 pode representar um mecanismo de recuperação celular ⁽³⁴⁾.

Da mesma forma, as células da granulosa também exibiram aumento na expressão de HSP70 nos grupos vitrificados com FBS e BFF em comparação com o controle fresco; além disso, a expressão em BFF foi menor do que em FBS. Em um estudo anterior ⁽³⁶⁾ avaliando a vitricificação de células cumulus obtidas de oócitos imaturos, não foram relatadas diferenças na abundância relativa de HSP70 em resposta ao estresse térmico induzido pela vitricificação, provavelmente devido ao tempo de exposição reduzido aos crioprotetores (30 e 25 segundos).

9. Conclusão

O fluido folicular suplementado no meio de vitricificação promoveu a maturação nuclear pós-aquecimento e a sobrevivência celular de forma semelhante ao efeito do soro fetal bovino. Em conclusão, o soro fetal bovino pode ser uma suplementação alternativa no meio de vitricificação de oócitos bovinos.

10 Referências

1. Vajta G. & Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 2006.v.65, n.1, p.236-244.
doi: [10.1016/j.theriogenology.2005.09.026](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026).
2. Faheem, M. S., Baron, E., Carvalhais, I, et al .The effect of vitrification of immature bovine oocytes to the subsequent in vitro development and gene expression. *Zygote*. 2015, v. 23, n.6, p. 933-942. doi: 10.1017/s0967199414000653.
3. García-Martínez, T., Martínez-Rodero, I., Roncero-Carol, J., et al Impact of equilibration duration combined with temperature on the outcome of bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*. 2022. 184, 110-123. doi: [10.1016/j.theriogenology.2022.02.024](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.024)
4. Zhang F., Zhang Z. Y., Cai M. D., et al. Effect of vitrification temperature and cryoprotectant concentrations on the mRNA transcriptome of bovine mature oocytes after vitrifying at immature stage. *Theriogenology*, 2020. 148, 225-23. doi: [10.1016/j.theriogenology.2019.11.006](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.006).
5. Paul, A. K., Liang, Y., Srirattana, K., et al. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. *Animal Sci. Journal*. 2018.v.89. n. 2, p. 307-315.
doi: 10.1111/asj.12892.
6. Olexiková, L., Dujičková, L., Kubovičová, E., et al. Development and ultrastructure of bovine matured oocytes vitrified using electron microscopy grids. *Theriogenology*. 2020.v.158, p. 258-266. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.09.009.
7. Chinen, S., Yamanaka, T., Hirabayashi, M., et al . Rescue of vitrified-warmed bovine mature oocytes by short-term recovery culture with resveratrol. *Cryobiology*, 2020, v.97. p. 185-190. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.004.
8. Olexiková, L., Makarevich, A., Dujičková, L., et al. (Factors affecting cryotolerance of mammalian oocytes. *Cryobiology*, 2024. 116, 104946.
Disponível em : <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.104946>
9. Azari D.N., Raes A., Pavani K. C, et al . Follicular fluid during individual oocyte maturation enhances cumulus expansion and improves embryo development and quality in a dose-specific manner. *Theriogenology*. 2021, v.166, p. 38-45. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.016.
10. Choi Y. H., Takagi M., Kamishita H., et al. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Animal repro. Sci.*.1998, v.50, n.1-2, p. 27-33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.016
11. Lopes J. S., Canha G. A., París O. E., et al. Supplementation of bovine follicular fluid during in vitro maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. *Theriogenology*. 2019, v.126. p. 222-229.
doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.010.

12. Mutary M.A., Ghadi M.A, Himaidi A., et al Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on in vitro maturation and gene expression of sheep oocytes. *Sau. Journal of Bio. Sci.* 2019, v.26, n.6, p. 1216-1222.
doi: 10.1016/j.sjbs.2018.01.001.
13. Ferrazza R. D. A., Garcia H. D. M., Schmidt E. M. D. S., et. Quantitative proteomic profiling of bovine follicular fluid during follicle development. *Biology of reproduction.* 2017, v. 97, n.6, p. 835-849. doi: 10.1093/biolre/iox148.
14. Read, C. C. et al. Correlation between Pre-Ovulatory Follicle Diameter and Follicular Fluid Metabolome Profiles in Lactating Beef Cows. *Metabolites.*2021, v.11, n. 9, p. 623.
doi: [10.3390/metabo11090623](https://doi.org/10.3390/metabo11090623).
15. Nandi S., Kumar V. G., Manjunatha B. M., et al . Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size. *Development, growth & differentiation.* 2007. V.49, n.1.p. 61-66. doi: 10.1111/j.1440-169X.2007.00901.x.
16. Raposo, G; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology.* 2013, v.200, n.4. p. 373-383. doi: [10.1083/jcb.201211138](https://doi.org/10.1083/jcb.201211138).
17. Leibfried L. & First N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science.* 1979. v.48.n.1, p. 76-86.
doi: 10.2527/jas1979.48176x.
18. Vajta G., Holm P., Kuwayama M., et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol.Repro. and Development: Incorporating Gamete Research.* 1998. v.51, n.1. p. 53-58. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec; v.25,n.4, p.402-8.
doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
20. Asaadi, a. et al. Extracellular Vesicles from Follicular and Ampullary Fluid Isolated by Density Gradient Ultracentrifugation Improve Bovine Embryo Development and Quality. *Inter. Jour. of mol. sci.* v. 22, n. 2, p. 578, 2021.
doi: [10.3390/ijms22020578](https://doi.org/10.3390/ijms22020578). PMID: 33430094.
21. Chaves D. F., Corbin E., Almiñana C., et al. Vitriification of immature and in vitro matured bovine cumulus-oocyte complexes: Effects on oocyte structure and embryo development. *Live. Sci.* 2017. (199), p. 50-56.
doi: 10.1016/j.livsci.2017.02.022.
22. Hajarian H., Wahid H., Rosnina Y., et al Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. *Arquivo Bras. de Med. Vet. e Zootecnia.* 2011. v.63, p. 67-73.
doi: 10.2527/jas1979.48176x.

23. Le G. F. & Massip A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology*. 1999. v.38, n.4, p. 290-300. doi: 10.1006/cryo.1999.2172.
24. Lonergan P., Monaghan P., Rizos D., et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. and development*. 1994. v.37. n. 1, p. 48-53. doi: 10.1002/mrd.1080370107.
25. Negrón-Pérez, V. M., Al Naib, A., Zezeski, A. L. et al. Cumulus cell expansion, nuclear maturation and embryonic development of bovine cumulus-oocyte complexes matured in varying concentrations of follicular fluid. *PloS one*. 2025. v. 20, n. 2, p. e0318376. doi : [10.1371/journal.pone.0318376](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0318376)
26. Revelli, A., Piane, LD, Casano, S. *et al.* Conteúdo do fluido folicular e qualidade do oócito: de marcadores bioquímicos isolados à metabolômica. *Reprod Biol Endocrino*. 2009. 7, 40. doi: [10.1186/1477-7827-7-40](https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-40).
27. Sprícigo, J. F. W. et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*. 2014. v. 69, n. 2, p. 256-265. doi: [10.1016/j.cryobiol.2014.07.015](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.015).
- 28 Costa, E. P. et al. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. *Rev. Br. de Zootecnia*. 2002. v. 31, p. 1122-1129. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000500008>.
29. Kasman A. M. N., Santoso B., Tirtaningsih N. W., et al Comparisons of Morphology and HSP70 Expression between Fresh Oocytes and Vitrified Oocytes Post Warming. In : *Proceedings of the 2020 10th International Conference on Bio. Engi. and Tecn*. 2020.91-94. Disponível em : <https://doi.org/10.1145/3397391.3397447>
30. Mutary M.A., Ghadi M.A, Himaidi A., et al. Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on in vitro maturation and gene expression of sheep oocytes. *Saudi Jour. of Bio. Sci*. 2019. v.26, n.6.p.1216-1222. doi: [10.1016/j.sjbs.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.01.001).
31. Kampinga, H. H. Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and protecting against cellular stress. *Mol. Chap. in Health and Disease*, 2006. 1-42. doi: 10.1007/3-540-29717-0_1.
32. Alrabiah, N.A. et al. Biochemical alterations in the follicular fluid of bovine peri-ovulatory follicles and their association with final oocyte maturation. *Repro. and Fert*. 2023. v. 4, n. 1. doi: 10.1530/raf-22-0090.
- 33 Ferré L. B., Kjelland M. E., Taiyeb A. M., et al. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Repro. in Domestic Animals*. 2020. V.55, n.6, p. 659-676. doi: 10.1111/rda.13667.
- 34 Siqueira-Pyles, e. s. c.; Landim-Alvarenga, F. C. Effect of meiotic stage on viability and developmental competence of bovine oocytes vitrified in TCM-199 and bovine follicular

fluid. Anim. Repro. 2018. v. 2, n. 1, p. 63-69. Disponível em: <https://animalreproduction.org/article/5b5a6085f7783717068b47e8#nav1>.

35 Akerfelt M., Morimoto R. I. & Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. Nat. reviews Mol. cell biology. 2010. v.11, n. 8,p. 545-555. doi: [10.1038/nrm2938](https://doi.org/10.1038/nrm2938).

36 Alrabiah, N. A., Simintiras, C. A., Evans, A. C., et al. Biochemical alterations in the follicular fluid of bovine peri-ovulatory follicles and their association with final oocyte maturation. Repro. and Fert. 2023. v.4, n.1. doi: [10.1530/raf-22-0090](https://doi.org/10.1530/raf-22-0090).

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética, CEUA, da Universidade Federal Rural da Amazônia.



Comissão de Ética no
Uso de Animais CEUA/UFRA



Belém, 18 de julho de 2022
CEUA N 3734070322

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Priscila Di Paula Bessa Santana
Área: Biotecnologia Animal

Título da proposta: "Vitrificação em meio suplementado com líquido folicular e seu efeito no desenvolvimento embrionário de bovinos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFRA (ID 000437)

A criopreservação de oócitos de bovinos desenvolvidos in vitro é essencial para a reprodução e conservação de animais de alto valor genético, ou animais voltados para fins comerciais. Em humanos, a vitrificação de oócitos é uma técnica padronizada e que apresenta resultados eficientes de pós-aquecimento, porém em bovinos a vitrificação ainda necessita ser aprimorada principalmente no que diz respeito à sobrevivência e competência dos oócitos pós-aquecimento. A proposta desse estudo é o desenvolvimento de um protocolo de vitrificação de oócitos bovinos utilizando um meio de vitrificação eficiente e baixo custo contendo líquido folicular. O líquido folicular produzido nos folículos ovarianos é rico em proteínas, fatores de crescimento, hormônios, glicoproteínas, citocinas e vesículas extracelulares, que fornecem um microambiente ideal para apoiar o desenvolvimento e capacitação dos oócitos no sistema in vivo. Dessa forma, nossa hipótese é que o líquido folicular pode ser usado como substituto do Soro Fetal Bovino (SFB) nos meios de vitrificação e aquecimento. Brevemente, os complexos cumulus oócitos (CCOs) maturados serão distribuídos em três grupos experimentais. O grupo Controle negativo em que os oócitos maturados não serão vitrificados e em vez disso seguirão para a fertilização e cultivo in vitro. O grupo Controle 2 em que os oócitos maturados serão vitrificados em meio padrão (meio TCM 199 + 20% SFB + crioprotetores), em seguida aquecidos e submetidos a fertilização e cultivo in vitro. E o grupo Vitrificados em que os oócitos maturados serão vitrificados em meio baixo custo (meio TCM 199 + 20% Líquido folicular + crioprotetores) em seguida submetidos a fertilização e cultivo in vitro. As taxas de sobrevivência oocitária e desenvolvimento embrionário serão expressos em porcentagens e avaliadas por análise da variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni com nível de significância de 5%.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia, na reunião de 23/03/2022, **ANALISOU** a proposta em questão, e decidiu por **ARQUIVAR** todo o processo.

Comentário da CEUA: *Prezada pesquisadora, Após avaliação do projeto, uma vez que não serão utilizados animais vivos, o projeto dispensa autorização pela CEUA. Iremos enviar ao seu e-mail uma dispensa de parecer. Atenciosamente, CEUA*

Profa. Dra. Natalia Guarino Souza Barbosa
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia

Profa. Dra. Ernestina Ribeiro dos Santos Neta
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural da Amazônia