



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

**AVALIANDO OS EFEITOS DAS PROTEÍNAS ANTICONGELANTES NA
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
VITRIFICADOS**

RECIFE

2022

RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

**AVALIANDO OS EFEITOS DAS PROTEÍNAS ANTICONGELANTES NA
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
VITRIFICADOS**

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Fisiopatologia da Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. André Mariano Batista

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a

Silva Júnior, Rafael Artur da Silva Júnior

AVALIANDO OS EFEITOS DAS PROTEÍNAS ANTICONGELANTES NA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO VITRIFICADOS / Rafael Artur da Silva Júnior Silva Júnior. - 2022.
99 f. : il.

Orientador: Andre Mariano Batista.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2022.

1. Lolium perenne. 2. Tenebrio molitor. 3. Criopreservação. 4. Vitricificação. 5. Cryotop. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIANDO OS EFEITOS DAS PROTEÍNAS ANTICONGELANTES NA
VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
VITRIFICADOS**

Tese de Doutorado elaborada por
RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

Aprovada em __/__/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ANDRÉ MARIANO BATISTA

Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. CLÁUDIO COUTINHO BARTOLOMEU

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof.^a. Dr.^a ANDREIA FERNANDES DE SOUZA

Departamento de Zootecnia da UFRPE

Prof.^a Dr.^a MARIANA ARAGÃO MATOS DONATO

Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE

Dr.^a ALIDE CAROLINE LIMA FONTES

Clínica Art Fértil

AGRADECIMENTOS

Ao *CNPq* pelo financiamento de todo o projeto e do doutorado que possibilitou a dedicação exclusiva ao desenvolvimento da tese e dos conhecimentos adquiridos e aqui divulgados;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de cursar o doutorado e pelo suporte ao desenvolvimento da pesquisa;

Ao *Prof. André Mariano Batista* pela orientação e amizade imprescindível para que eu pudesse desempenhar meu papel de forma satisfatória, pelas broncas e brincadeiras que deixavam o ambiente de trabalho totalmente descontraído e leve e por todo o conhecimento que consegui extrair dele;

Ao *Prof. Cláudio Coutinho Bartolomeu* que me acompanha desde a graduação por todo o suporte que me foi necessário para chegar até aqui;

A *Prof. Andreia Fernandes de Souza* pela amizade e auxílio no desenvolvimento do experimento;

Ao laboratório de Biotecnologia Aplicadas a Reprodução Animal, LBR. Peça chave deste doutorado e meu maior orgulho, ter feito parte dessa equipe que conseguiu reestruturar e desenvolver toda a ciência que conseguimos em tão pouco tempo do zero foi sem dúvidas a sensação mais gratificante;

A menina do PIBIC, que além de auxílio técnico também foi um auxílio mental, sempre ao meu lado de domingo a domingo em todos os momentos da rotina, obrigado *Raquel Desenzi*, nada seria possível sem sua ajuda!

A toda a equipe do LBR, em especial a *Milena Ramires* que sempre se fez presente em todas as etapas do desenvolvimento do projeto, principalmente nas avaliações semanais;

Ao *prof. Peter Davies*, pela gentil doação das AFPs;

Ao *Dr. Pedro*, por todos os ovários entregues nesses anos dos abatedouros, não importando se era dia Santo ou feriado, estava sempre lá, à disposição para fazer as

coletas, além de *Branco*, que estava na linha de abate separando todos os ovários que foram utilizados nesta tese.

A *Kleber Anciotto* por todo o suporte com os meios da PIVE;

Ao Laboratório de Citogenética Vegetal, em especial a *Thiago Nascimento* e a *prof.^a Andrea Pedrosa-Harand* pelo auxílio com a microscopia fluorescência e pela parceria firmada;

Ao Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE), em especial a *Prof.^a Mariana Donato* e a *prof.^a Christina Peixoto* pela parceria e execução da microscopia eletrônica, não só na parte técnica, mas sobretudo em todas as discussões aleatórias que foram feitas nos dias de análise, principalmente a sopa no micro-ondas e o salgadinho ki-queijo.

Ao Laboratório de Virologia Animal da UFRPE, pelo acolhimento no momento de dificuldade no processo de PIVE, fundamental para uma injeção de ânimo e perseverança, meus sinceros obrigados *Dr. Sérgio Nascimento* e *Davi Rodrigues* por toda a força;

A Nordeste in vitro, pela recepção e aprendizado que tive durante um final de semana que sem dúvidas foi peça chave para o sucesso do LBR, obrigado de coração a *Lucas Carvalho* por abrir as portas da sua empresa e principalmente a *Erick Vasquez* por todo o ensinamento transmitido, um excelente professor;

A *Agroútil* e *EGR Nelore* pelas doses de sêmen doadas, de extrema qualidade e importantes para a produção dos embriões;

Aos meus familiares e amigos que de forma direta ou indireta contribuíram muito neste processo, meus pais *Antonia* e *Rafael* pelo suporte e apoio durante essa longa jornada de 12 anos de Universidade desde a graduação até a finalização com o doutorado. Meu muito obrigado a *Carlos Murilo*, *Gabriela Gonçalves*, *Taizi Rodrigues*, *Jerônimo Hugo*, *Mayumi Ono*, *Erasmão (Juninho)* pelo companheirismo e afeto além de álcool e festas para desestressar da rotina pesada que se tem durante a PIVE;

E por fim, agradeço a *Deus*, que em sua infinita sabedoria uniu todas essas pessoas em minha volta e me fez capaz de chegar até aqui!

Meu muito obrigado a todos!

RESUMO

A criopreservação de embriões é uma importante ferramenta que possibilita a logística de armazenamento e transferência de blastocistos de alto mérito genético. Existem na atualidade duas principais metodologias distintas de criopreservação, o congelamento lento e a vitrificação, desenvolvidas a fim de evitar crioinjúrias. A vitrificação é uma técnica de congelamento rápido, que transforma o líquido em estado vítreo, diminuindo os efeitos negativos da formação de cristais de gelo. Contudo, a técnica de vitrificação ainda pode causar danos referentes à formação dos cristais de gelo. Algumas proteínas foram identificadas como inibidoras de formação de gelo intracelular, denominadas de proteínas anticongelantes (*antifreeze proteins* - AFP). Estas proteínas têm ação na modificação da estrutura do cristal de gelo, diminuindo o ponto de congelamento e inibindo a atividade de recristalização. Com base no exposto este trabalho objetivou avaliar os efeitos crioprotetores da AFP extraída da gramínea *Lolium perenne* (*LpAFP*) e da AFP extraída da larva do besouro do *Tenebrio molitor* (*TmAFP*) na vitrificação de embriões bovinos. Para isto, blastocistos bovinos produzidos *in vitro* foram vitrificados utilizando o método *cryotop* em ambos experimentos. No primeiro experimento, durante o processo de vitrificação, os blastocistos foram aleatoriamente separados em dois grupos experimentais, sendo o grupo controle (GC) contendo 0 ng/mL de *LpAFP* e o grupo tratamento (GT) suplementado com 500 ng/mL de *LpAFP*. A vitrificação deu-se transferindo os blastocistos para a solução de equilíbrio: 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetil sulfóxido (DMSO) por 2 min, posteriormente para a solução de vitrificação: 15% EG, 15% dimetil sulfóxido (DMSO) e em seguida depositados na haste do *cryotop* e submersos em Nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado em três etapas com concentrações decrescentes de sacarose (1,0, 0,5 e 0,5 M de sacarose). Após o aquecimento, os blastocistos foram cultivados por 24 horas e analisados a taxa de sobrevivência (expansão e/ou eclosão), marcados com Hoechst para avaliação do número total de células e analisados em microscopia eletrônica de transmissão para avaliação ultraestrutural. No segundo experimento, os blastocistos produzidos *in vitro* foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais e vitrificados com meio de estabilização e vitrificação suplementados com diferentes concentrações de *TmAFP*: 0 ng/mL; 500 ng/mL e 1.000 ng/mL. O processo de vitrificação e aquecimento se deu da mesma forma do primeiro experimento. Após 24 horas de cultivo pós aquecimento, foram analisadas a taxa de sobrevivência (expansão e/ou eclosão) e realizada análise

ultraestrutural dos embriões expandidos. No experimento 1 os resultados mostraram que não houve diferença significativa na taxa de reexpansão 24 horas após aquecimento, entretanto houve variação ($P < 0,05$) na taxa de eclosão no GT. O número total de células 24 horas após o aquecimento foi significativamente maior no GT quando comparado ao GC (GT $114,87 \pm 7,24$ vs. GC $91,81 \pm 4,94$). A análise ultraestrutural demonstrou diminuição das lesões citoplasmáticas, principalmente nas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso no GT. No experimento dois, o grupo suplementado com 500 ng/mL de *TmAFP* (500*TmAFP*) apresentou maior taxa de sobrevivência quando comparado aos outros dois grupos, controle (0 ng/mL de *TmAFP*) e 1000*TmAFP* (1000 ng/mL de *TmAFP*), também foi observada maior taxa de expansão da blastocela no grupo 500*TmAFP*. Lesões ultraestruturais foram observadas em todos os embriões vitrificados, entretanto os embriões dos grupos 500*TmAFP* e 1000*TmAFP* apresentaram menos lesões citoplasmáticas quando comparadas ao grupo controle. Em conclusão, o experimento 1 demonstrou que a adição de 500 ng/mL de *LpAFP* durante a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* se mostrou favorável na melhoria da sobrevivência e desenvolvimento dos blastocistos após o aquecimento. Em adição, o experimento 2 evidenciou que a suplementação de *TmAFP* pode mitigar as alterações celulares, as quais envolvem organelas e componentes celulares essenciais para o funcionamento adequado e viabilidade pós aquecimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados.

Palavras-chave: *Lolium perenne*; *Tenebrio molitor*; Criopreservação; Vitrificação; *Cryotop*; Blastocistos, PIVE.

ABSTRACT

Embryo cryopreservation is an important tool that enables the logistics of storage and transfer of blastocysts of high genetic merit. There are currently two main distinct cryopreservation methodologies, slow freezing and vitrification, developed in order to avoid cryoinjuries. Vitrification is a rapid freezing technique that transforms the liquid into a glassy state, reducing the negative effects of ice crystal formation. However, the vitrification technique can still cause damage related to the formation of ice crystals. Some proteins have been identified as inhibitors of intracellular ice formation, called antifreeze proteins (AFP). These proteins have action in modifying the structure of the ice crystal, decreasing the freezing point and inhibiting the recrystallization activity. Based on the above, this study aimed to evaluate the cryoprotective effects of AFP extracted from the grass *Lolium perenne* (*LpAFP*) and AFP extracted from the larva of the *Tenebrio molitor* beetle (*TmAFP*) on the vitrification of bovine embryos. For this, *in vitro* produced bovine blastocysts were vitrified using the cryotop method in both experiments. In the first experiment, during the vitrification process, the blastocysts were randomly separated into two experimental groups, the control group (GC) containing 0 ng/mL *LpAFP* and the treatment group (GT) supplemented with 500 ng/mL *LpAFP*. Vitrification was carried out by transferring the blastocysts to the equilibrium solution: 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 min, then to the vitrification solution: 15% EG, 15 % dimethyl sulfoxide (DMSO) and then deposited on the cryotop rod and submerged in liquid nitrogen. Heating was carried out in three steps with decreasing concentrations of sucrose (1.0, 0.5 and 0.5 M sucrose). After heating, the blastocysts were cultured for 24 hours and analyzed for survival rate (expansion and/or hatching), stained with Hoechst to evaluate the total number of cells and analyzed under transmission electron microscopy for ultrastructural evaluation. In the second experiment, *in vitro* produced blastocysts were randomly separated into three experimental groups and vitrified with stabilization and vitrification medium supplemented with different concentrations of *TmAFP*: 0 ng/mL; 500 ng/mL and 1000 ng/mL. The vitrification and heating process took place in the same way as in the first experiment. After 24 hours of post-warming cultivation, the survival rate (expansion and/or hatching) was analyzed and ultrastructural analysis of the expanded embryos was performed. In experiment 1, the results showed that there was no significant difference in the reexpansion rate 24 hours after heating, however there was variation ($P < 0.05$) in the hatching rate in the GT. The

total number of cells 24 hours after heating was significantly higher in the GT when compared to the GC (GT 114.87 ± 7.24 vs. GC 91.81 ± 4.94). The ultrastructural analysis showed a decrease in cytoplasmic lesions, mainly in mitochondria and rough endoplasmic reticulum in GT. In experiment two, the group supplemented with 500 ng/mL of *TmAFP* (500*TmAFP*) had a higher survival rate when compared to the other two groups, control (0 ng/mL of *TmAFP*) and 1000*TmAFP* (1000 ng/mL of *TmAFP*), also a higher rate of blastocoel expansion was observed in the 500*TmAFP* group. Ultrastructural lesions were observed in all vitrified embryos, however embryos from the 500*TmAFP* and 1000*TmAFP* groups showed less cytoplasmic lesions when compared to the control group. In conclusion, experiment 1 demonstrated that the addition of 500 ng/mL of *LpAFP* during the vitrification of *in vitro* produced bovine embryos proved to be favorable in improving the survival and development of blastocysts after heating. In addition, experiment 2 showed that *TmAFP* supplementation can mitigate cellular changes, which involve organelles and cellular components essential for proper functioning and viability after heating of vitrified *in vitro* produced bovine embryos.

Keywords: *Lolium perenne*; *Tenebrio molitor*; cryopreservation; vitrification; cryotop; Blastocysts, PIVE.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Fatores associados ao resfriamento e criopreservação, à lesão celular e morte em sistemas biológicos (Adaptado de Shaw e Troson, 2000).....	24
Tabela 2. Crioprotetores comumente utilizados na criopreservação de células (Adaptado de Hutmacher, 2008).....	26
Tabela 3 – Proteínas anticongelantes de peixes e insetos (Adaptado de Jia e Davies, 2002).....	32
Tabela 4. Principais estudos utilizando proteínas anticongelantes (AFPs) na criopreservação de embriões (Adaptador de Robles et al., 2019).....	33

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Efeito da suplementação de LpAFP na sobrevivência, expansão/eclosão e número total de células de embriões vitrificados e aquecidos.....	64
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Efeito da suplementação de <i>TmAFP</i> na sobrevivência, expansão/eclosão de embriões vitrificados e aquecidos com diferentes concentrações de <i>TmAFP</i> (500 ng/mL e 1000 ng/mL).....	85
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Fig. 1.** Representação esquemática de um embrião durante os métodos de congelamento lento e vitrificação. Os hexágonos brancos representam os cristais de gelo. A concentração de crioprotetores é mostrada pela escuridão do sombreado (Adaptado de Moawad, 2010).....19
- Fig. 2.** Modelo de inibição-adsorção da atividade anticongelante. Representação esquemática (a) do modelo original no sentido da direção lateral (pinagem) e (b) modelo adaptado da inibição-adsorção no sentido da direção normal por fixação na superfície (Adaptado de Knight et al., 1991; Oude Vrielink et al., 2016).....31
- Fig. 3.** Peixes da subclasse *Zoarcoidei* (Adaptado de DeVries, 2020).....34
- Fig. 4.** Larvas de *Tenebrio molitor* (Adaptado de Tomalty et al., 2019).....35
- Fig. 5.** Azevém perene (*Lolium perenne*) (Jardim botânico da UTAD, 2022).....36

CAPÍTULO 2

- Fig. 1. Desenho experimental.** Blastocistos produzidos *in vitro*, foram agrupados e distribuídos aleatoriamente entre dois grupos. A vitrificação foi realizada em meios suplementados ou não com proteína anticongelante de *Lolium perenne* (0 ou 500 ng/mL de *LpAFP*). SE - Solução de estabilização; SV - Solução de vitrificação; N₂ - Nitrogênio líquido.....60
- Fig. 2.** Micrografias em estereomicroscópio representativas da sobrevivência (reexpansão e eclosão) após aquecimento. CG – Grupo Controle; GT – Grupo tratamento.....64
- Fig. 3.** Blastocistos após aquecimento vitrificados em meios suplementados ou não com *LpAFP* (500 ng/mL) corados com Hoechst 33342 para contagem do número total de células. (A) grupo controle; (B) Grupo tratamento. Diferenças entre tratamentos (P = 0,01).....65

Fig. 4. Microscopia ultraestrutural de embriões bovinos produzidos in vitro, frescos e vitrificados com ou sem suplementação de 500 ng/mL de LpAFP. N – Núcleo; M – Mitocôndria; ZP – Zona Pelúcida; mv – Microvilosidades; L – gotícula lipídica; GC – Complexo de Golgi; R – Reticulo; Li – Lisossomos.....65

CAPÍTULO 3

Fig. 1. Desenho experimental. Blastocistos produzidos in vitro foram agrupados e distribuídos aleatoriamente entre três grupos. A vitrificação foi realizada em meios de estabilização e vitrificação suplementados com proteína anticongelante de *Tenebrio molitor* (*TmAFP*), nas concentrações de 0 (G. Controle), 500 ng/mL (G. 500*TmAFP*) e 1.000 ng/mL (G. 1000*TmAFP*).....82

Fig. 2. Micrografias em estereomicroscópio representativas da reexpansão e eclosão após aquecimento (0 e 24h) de blastocistos vitrificados em meios suplementados com concentrações de 0 (G. Controle), 500 (G. 500*TmAFP*) e 1.000 (G. 1000*TmAFP*) ng/mL de *TmAFP*. A – 0h, G. Controle; A' – 24h, G. Controle; B – 0h, G. 500*TmAFP*; B' – 24h, G. 500*TmAFP*; C – 0h, G. 1000*TmAFP*; C' – 24h, G. 1000*TmAFP*.....85

Fig. 3. Características ultraestruturais de blastocistos frescos. M – Mitocôndria; N – Núcleo; ZP – Zona pelúcida; mv – microvilosidades; GC – Complexo de golgi.....86

Fig. 4. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos in vitro, vitrificados e aquecidos sem suplementação de *TmAFP* (Grupo controle). M – Mitocôndria; N – Núcleo; mv – microvilosidades; L – gotícula lipídica; R – Reticulo; GC – Complexo de golgi.....87

Fig. 5. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos in vitro, vitrificados e aquecidos com suplementação de 500 ng/ml de *TmAFP* (Grupo 500 *TmAFP*). M – Mitocôndria; N – Núcleo; GC – Complexo de golgi; ZP – Zona pelúcida; If – Filamentos intermediários; mv – microvilosidades.....88

Fig. 6. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos in vitro, vitrificados e aquecidos com suplementação de 1.000 ng/ml de *TmAFP* (Grupo 1000*TmAFP*). M – Mitocôndria; N – Núcleo; mv – microvilosidades; MvB – Corpo multivesicular.....89

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1	17
Revisão de Literatura	
1.1. Conservação de recursos genéticos animal	18
1.1.1. Métodos de criopreservação de oócitos e embriões	19
1.1.1.1. Método de Congelação lenta	20
1.1.1.2. Método de Vitriificação.....	20
1.2. Mecanismos de injúria celular durante a criopreservação	22
1.2.1. Tipos de injúrias durante a criopreservação	23
1.2.2. Formação de cristais de gelo.....	24
1.2.3. Choque osmótico.....	25
1.3. Crioprotetores	26
1.3.1. Crioprotetores penetrantes	27
1.3.2. Crioprotetores não penetrantes	28
1.3.3. Consequências tóxicas dos crioprotetores	28
1.4. Proteínas anticongelantes	30
1.4.1. AFP tipo III	33
1.4.2. AFP TmAFP.....	34
1.4.3. AFP LpAFP.....	36
1.5. Características de embriões produzidos in vitro	37
1.6 Referências	38
CAPÍTULO 2	52
Efeitos benéficos da proteína anticongelante de <i>Lolium perenne</i> (LpAFP) na vitrificação de embriões bovinos produzidos in vitro	
CAPÍTULO 3	73
Utilização da proteína anticongelante de <i>Tenebrio molitor</i> (TmAFP) para vitrificação de embriões produzidos bovinos in vitro: Estudo ultraestrutural	

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da tecnologia para produção de embriões *in vitro* (PIVE) reforça o ganho genético, pois possibilita maior utilização de matrizes e reprodutores de elite. A criopreservação é uma ferramenta que possibilita a melhoria na logística de armazenamento e transferência dos blastocistos e conseqüentemente a difusão do germoplasma por todo o mundo, além de possibilitar o armazenamento de embriões produzidos em excesso.

De acordo com a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS, 2021), em 2019, foram transferidos, em todo mundo, 797.190 embriões bovinos produzidos *in vitro*, deste total, 44,39% foram de embriões congelados-descongelados. Apesar do número crescente de embriões criopreservados, esse processo de armazenamento pode causar lesões nas células embrionárias devido à formação de cristais de gelo intracelular, ao choque osmótico e à toxicidade de crioprotetores (Alfarha et al., 2018; Ferreira et al., 2015). Em adição, embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis à criopreservação, quando comparados com seus equivalentes produzidos *in vivo*, em decorrência, sobretudo do alto teor lipídico presente no citoplasma de embriões PIVE (Pryor et al., 2011; Sudano et al., 2011).

As estratégias para superar essas adversidades incluem, principalmente, a redução do volume de solução de crioproteção e o aumento da criotolerância com a incorporação de aditivos ao meio de criopreservação (Pereira e Marques, 2008), além de diferentes métodos de criopreservação utilizados. O congelamento lento e vitrificação são os procedimentos mais comumente empregados para criopreservação de embriões (Arshad et al., 2021).

A vitrificação tem como objetivo solidificar células sem cristalização, diminuindo os efeitos adversos do congelamento, além dos benefícios adicionais que permitem flexibilidade e praticidade, podendo ser realizada rapidamente e eliminando a necessidade de equipamentos caros e de alta manutenção (Liebermann e Tucker, 2004). Quando comparada ao congelamento lento, a vitrificação se torna mais eficiente quando é avaliada a taxa de gestação após a transferência dos embriões criopreservados (An et al., 2016; Do et al., 2017).

Diversos dispositivos são utilizados para a vitrificação de blastocistos, como grades de microscopia eletrônica, *cryotop*, *cryoloop*, *hemistraws* e *cryotip* (Morató et al., 2010), entre estes, podemos destacar o *cryotop* como excelente dispositivo de vitrificação, devido ao baixo volume de meio de criopreservação e a exposição direta dos blastocistos em nitrogênio líquido, que leva à transição para um estado semelhante ao vidro e por conseguinte reduz o potencial dano celular (Morató et al., 2010).

Contudo, a vitrificação pode causar alterações nos blastocistos bovinos (Inaba et al., 2016). Em embriões porcinos foi observado retardo na proliferação de blastômeros vivos durante o cultivo pós aquecimento (Nguyen et al., 2018), sugerindo que este procedimento pode afetar o desenvolvimento subsequente dos embriões que sobreviveram à vitrificação.

Diversas pesquisas têm sido conduzidas para diminuir os efeitos negativos da formação dos cristais de gelo durante a criopreservação (Nishijima et al., 2014). Entre elas, podemos destacar a suplementação do meio de vitrificação com proteínas anticogelantes (AFPs) (Nishijima et al., 2014; Lee et al., 2015; Liang et al., 2016).

As AFPs são encontradas em diversos seres vivos que são adaptados a ambientes frios (Rubinsky et al., 1991), como peixes do ártico e antárticos, além de vegetais, anfíbios e insetos, desempenhando assim, papel importante para sua sobrevivência em ambientes com temperaturas abaixo de 0 °C (Yeh e Feeney, 1996; DeVries e Wohlschlag, 1969). Estas proteínas têm afinidade de ligação ao gelo e podem cineticamente diminuir a temperatura para a formação de cristais de gelo, sendo assim, prevenindo os danos mecânicos causados às células devido à formação de cristais de gelo. (Jia e Davies, 2002; Madura et al., 2000).

Com base no exposto, objetivou-se analisar os efeitos crioprotetores da AFP extraída da gramínea *Lolium perenne* (*LpAFP*) e da AFP extraída da larva do besouro do *Tenebrio molitor* (*TmAFP*) na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Conservação de recursos genéticos animal

Os avanços científicos e tecnológicos alcançados durante as últimas décadas na reprodução animal resultaram no desenvolvimento de uma variedade de ferramentas comumente referidas como tecnologias de reprodução assistida, que tem como principal objetivo maximizar o número de descendentes de animais geneticamente superiores e disseminar o germoplasma por todo mundo (Ferré et al., 2020). A conservação de gametas e embriões animais, incorporada às biotecnologias da reprodução assistida, é um pré-requisito para utilização destes materiais genéticos em escala comercial, além de permitir a criação de bancos de germoplasma de animais geneticamente superiores além dos ameaçados de extinção.

Em 1938 Basile J. Luyet e Eugene L. Hodapp publicaram o primeiro relato bem-sucedido de vitrificação de espermatozoides (Arav, 2014), no entanto, somente após 1949, Christopher Polge, Audrey Smith e Alan Parkes, ao tentarem duplicar os resultados de Luyet, descobriram acidentalmente que o glicerol possuía propriedades crioprotetoras, sendo este fato, um marco nos estudos da criobiologia (Polge et al., 1949).

A criobiologia, termo derivado do grego (*crio* = frio, *bios* = vida e *logos* = ciência), pode ser definida como o estudo dos efeitos das baixas temperaturas sobre as células ou seres vivos com o propósito da criopreservação, e inclui a análise de células, proteínas, órgãos ou todo o organismo de animais e plantas submetidas à criopreservação (Moawad, 2010).

Todavia, a criobiologia não estuda exclusivamente a criopreservação de células, tecidos, gametas e embriões de animais e humanos, podemos destacar outras áreas de estudos que incluem: o estudo da adaptação ao frio; o armazenamento de órgãos em condições hipotérmicas para transplante; a liofilização; criocirurgias e os aspectos de engenharia mecânica da transferência de calor durante resfriamento e aquecimento (Moawad, 2010).

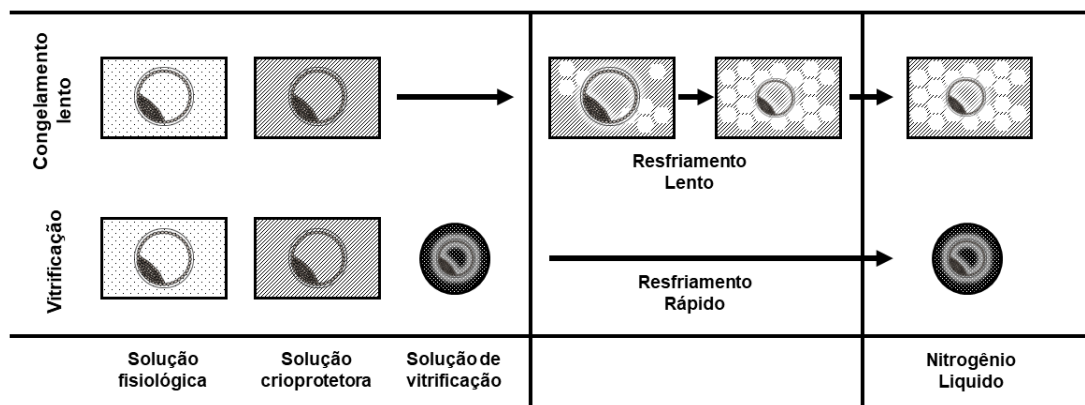
A criopreservação de embriões permite o incremento das taxas de melhoramento genético em rebanhos, pois favorece a logística de difusão genética, contemplando machos e fêmeas de elite, beneficiando o intercâmbio internacional de germoplasma e evitando o transporte de animais (Pereira e Marques, 2008). Contudo as técnicas de criopreservação não são exclusivas de espécies domésticas, tecidos e células de animais

selvagens ameaçados de extinção também podem ser criopreservados com o objetivo de diminuir o risco do seu desaparecimento (Holt e Comizzoli, 2022).

1.1.1. Métodos de criopreservação de oócitos e embriões

Além da refrigeração, na atualidade existem dois métodos principais de criopreservação de gametas, a saber: o congelamento lento e a vitrificação. Estas duas abordagens foram desenvolvidas para evitar a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento bem como lesões osmóticas e toxicidade dos crioprotetores (Figura 1) (Alfoteisy, 2012).

Figura 1. Representação esquemática de um embrião durante os métodos de congelamento lento e vitrificação. Os hexágonos brancos representam os cristais de gelo. A concentração de crioprotetores é mostrada pela escuridão do sombreamento (Adaptado de Moawad, 2010).



O congelamento lento tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores que, em grandes concentrações, estão associados com toxicidade química e choque osmótico (Arav, 2014). A vitrificação é um processo rápido de criopreservação em que os embriões são imediatamente congelados em nitrogênio líquido levando à formação de uma camada vítrea (Argyle et al., 2016).

Ambas as metodologias de criopreservação são baseadas em dois principais fatores: os crioprotetores e as taxas de resfriamento e aquecimento (Moawad, 2010). O armazenamento, aquecimento e remoção dos crioprotetores (reidratação) difere pouco entre as técnicas de criopreservação, sendo a principal diferença a quantidade dos crioprotetores e a taxa de resfriamento (Vajta e Kuwayama 2006).

1.1.1.1. Método de Congelação lenta

A técnica de congelamento lento foi desenvolvida pela primeira vez, em 1971, para criopreservação de embriões de camundongos (Whittingham et al., 1972; Willadsen et al., 1978) e poucos anos depois, a técnica estava bem estabelecida para ovelhas (Willadsen et al., 1976) e gado bovino (Willadsen et al., 1978). O método de resfriamento lento pode ser definido como um procedimento onde o material biológico é embebido em soluções crioprotetoras e resfriado lentamente a cerca de 1°C/min (Woods et al., 2004). Levando ao congelamento da solução extracelular antes que os cristais de gelo intracelulares se formem, criando um desequilíbrio osmótico e favorecendo a saída da água do meio intracelular através da membrana celular (Hardin, 2016).

Nesta técnica, as células são gradualmente expostas ao meio de congelamento com concentrações relativamente baixas de crioprotetores (CPs) penetrantes, que minimizam os danos mecânicos causados às células, evitando a formação de cristais de gelo intracelular.

O congelamento lento tem sido usado com sucesso para congelar oócitos e embriões de várias espécies de mamíferos, especialmente aqueles que são menos sensíveis ao frio, como camundongo e gato (Luvoni et al., 1997; Ruppert-Lingham, 2003; Luvoni, 2006) e também foi utilizado para congelar oócitos e embriões humanos (Fabbri, 2006). Por outro lado, resultados insatisfatórios foram relatados para espécies mais sensíveis a lesões por frio, incluindo bovinos, ovinos, suínos e equinos (Martino et al., 1996; Isachenko et al., 1998; Vajta et al., 1998; LeGall and Massip, 1999).

1.1.1.2. Método de Vitrificação

A vitrificação é uma técnica de congelamento rápido, que transforma o líquido em estado de vidro sem formação de cristais de gelo (Hardin, 2016). A camada vítrea se molda ao formato da membrana celular, permitindo a sua integridade estrutural para permanecer intacta, ao contrário do congelamento lento (Mandawala et al., 2016).

Apesar de ter sido relatada em 1938 por Basile J. Luyet e Eugene L. Hodapp com espermatozoides (Luyet e Hodapp, 1938), apenas em 1985 a vitrificação foi apresentada por Rall e Fahy (1985) com embriões murinos e mais tarde, em 1987, obtiveram sucesso com a vitrificação de embriões de ratos (Rall et al., 1987).

Por vários anos, a vitrificação não foi o método de escolha para a criopreservação, o congelamento lento tinha a preferência. Isto devido ao fato de que o sucesso da vitrificação não foi alcançado facilmente, em razão da necessidade de altas concentrações de crioprotetores penetrantes e volumes relativamente alto de amostras (Arav, 2014).

Um dos fatores determinantes para o sucesso da técnica de vitrificação é a viscosidade do meio em que os embriões ou células estão suspensos. Quanto maior a concentração de crioprotetores maior será a variação de temperatura para a transição vítrea, diminuindo assim as chances de cristalização da água, e diferentes crioprotetores e aditivos têm variados níveis de toxicidade, taxa de penetração e temperatura de transição vítrea, a viscosidade do meio é definida pela concentração de vários crioprotetores e aditivos durante a vitrificação (Arav, 2014).

No método de vitrificação altas concentrações de crioprotetores penetrantes são utilizados para aumentar a viscosidade da amostra ao ponto onde as moléculas permanecem imobilizadas. Em seguida, a amostra é resfriada em velocidade ultrarrápida (-100°C/min) para temperatura extremamente baixa, imergindo-a diretamente em nitrogênio líquido (-196 °C), deixando as células ou tecidos solidificados, semelhante ao vidro (Fahy et al., 1984; Argyle et al., 2016).

Os crioprotetores penetrantes utilizados na vitrificação entram na célula rapidamente e formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água intracelular, diminuindo o ponto de congelamento para menos de -120 °C (Alfoteisy, 2012). A vitrificação bem sucedida utilizando uma combinação de etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e sacarose foi inicialmente relatada por Ishimori et al. (1992), onde se estabeleceu as bases para os protocolos de vitrificação.

As soluções de vitrificação comumente consistem em duas ou três soluções que são preparadas em Meio de Cultura de Tecidos (TCM-199) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Hardin, 2016). Os meios de vitrificação são classificados ou denominados como meio de equilíbrio no qual há baixa concentração de crioprotetores que então é aumentada na segunda e/ou terceira solução. Estas soluções também contêm sacarose ou trealose como crioprotetores não penetrante (Kuleshova et al., 1999; Hardin, 2016). As concentrações dos crioprotetores penetrantes podem variar, e a quantidade de tempo em cada solução também pode ser diferente entre os protocolos, pois ainda não foi estabelecido um protocolo ideal (Hardin, 2016).

Além da viscosidade do meio, devido às altas concentrações de crioprotetores, a probabilidade do sucesso da vitrificação aumenta à medida em que o volume da amostra

com solução diminui. Volumes menores permitem melhor transferência de calor, facilitando assim maiores taxas de resfriamento (Arav, 2014). Além disso, o pequeno volume tem efeito independente sobre a probabilidade de nucleação do gelo como foi descoberto no século XIX por Gay-Lussac, que ao subir em um balão percebeu que as gotas das nuvens não congelavam, apesar das temperaturas abaixo de 0 °C. Descobriu-se o efeito do volume mínimo sobre a resistência ao congelamento (Arav, 2014).

Atualmente, o uso da vitrificação é preferível ao congelamento lento, porque permite a conservação da viabilidade do embrião, pois há a redução dos danos causados à membrana celular quando as células passam pela zona crítica de temperatura, entre -5 °C a -80 °C, onde geralmente ocorre a ruptura da membrana celular causada pela formação de cristais de gelo intracelular (Vajta e Nagy, 2006).

A técnica de vitrificação geralmente pode ser dividida em duas categorias distintas: as técnicas de superfície e técnicas de tubulação (Saragusty e Arav, 2011). As técnicas de superfície incluem grade de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), *Cryotop* (Hamawaki et al., 1999; Kuwayama et al., 2005), *Cryoloop* (Lane et al., 1999), *Hemi-straw* (Vanderzwalmen et al., 2000), superfície sólida (Dinnyes et al., 2000), malha de náilon (Matsumoto et al., 2001), *Cryoleaf* (Chian et al., 2005), vitrificação de cobertura direta (Chen et al., 2006), plug de fibra (Muthukumar et al., 2008), espátula de vitrificação (Tsang e Chow, 2009), *Cryo-E* (Petyim et al., 2009), lâmina de plástico (Sugiyama et al., 2010) e *Vitri-Inga* (Almodin et al., 2010).

Entre as técnicas de tubulação pode-se citar a palheta plástica (Rall e Fahy, 1985), palheta aberta (Vajta et al., 1998), palheta fechada puxada (Chen et al., 2001), pipeta flexipet-desnudadora (Liebermann et al., 2002), palheta aberta superfina (Isachenko et al., 2003), *CryoTip* (Kuwayama, 2007), ponta de pipeta (Sun et al., 2008), dispositivo de vitrificação de alta segurança (Camus et al., 2006), palheta selada (Yavin et al., 2009), *Cryopette* (Portmann et al., 2010), *Rapid-i* (Larman e Gardner, 2010) e *JY Straw* (Arav, 2014).

1.2. Mecanismos de injúria celular durante a criopreservação

Embriões submetidos a processos de criopreservação são desafiados termicamente, mecanicamente, tóxica e osmoticamente, provocando uma série de mudanças (Valente et al., 2020). Diversas injúrias celulares são causadas durante a criopreservação, os crioinjúrias podem ser definidos como uma série de eventos devido

ao comprometimento das funções celulares após a criopreservação, mais precisamente durante o congelamento da água intracelular (Smith e Silva, 2004).

Podem ocorrer criodanos em todos os intervalos de temperatura durante o processo de criopreservação. Na faixa de 15 °C a -5 °C podem ocorrer danos irreversíveis às gotículas lipídicas citoplasmáticas e aos microtúbulos (Vajta e Nagy, 2006). Entre -5 °C e -80 °C o principal criodano observado é a formação de cristais de gelo intracelular, já entre -50 °C e -150 °C é quando são observadas fraturas na zona pelúcida e danos em organelas citoplasmáticas (Rall e Meyer, 1989). Temperaturas abaixo de -150 °C correspondem à fase de menor injúria celular (Becker, 2016)

1.2.1. Tipos de injúrias durante a criopreservação

A despeito do método empregado no processo de criopreservação, vários fatores podem levar a crioinjúrias celulares. A formação de cristais de gelo, efeitos tóxicos dos crioprotetores e choque osmótico são alguns exemplos de injúrias causadas às células durante o protocolo de criopreservação, independentemente do método de congelamento lento ou da vitrificação (Vajta e Kuwayama, 2006).

O processo de criopreservação em geral, provoca diversas alterações celulares, geralmente em decorrência da formação dos cristais de gelo e do choque osmótico, dentre elas podemos citar: alterações cromossômicas, modificações da zona pelúcida, alterações ultraestruturais do citoesqueleto e das membranas mitocondriais, e a fragmentação do material genético (Moussa et al., 2014). A Tabela 1 mostra o tipo e a causa de danos causados durante a criopreservação dentro de sistemas biológicos.

Tabela 1. Fatores associados ao resfriamento e criopreservação, à lesão celular e morte em sistemas biológicos (Adaptado de Shaw e Troson, 2000).

Sistema	Tipo / causa do criodano
Todos	Formação de gelo intracelular / extracelular
	Toxidade
	Desbalanço de Ca
	Produção de radicais livres
Membrana	Falha de fertilização
	Ruptura
	Vazamentos
	Fusão
Cromossomos	Microvilosidades
	Perda / ganho
DNA	Tetraploidia
	Fusão
Citoesqueleto	Rearranjo
	Os microtúbulos se dissolvem
Proteínas / enzimas	Actina
	Desidratação
Ultra estrutural	Perda de função
	Microvilosidades mitocondrial
	Vesículas
Zona pelúcida	Grânulos corticais
	Endurecimento
	Fratura

1.2.2. Formação de cristais de gelo

Na ausência de crioprotetores, durante o processo pelo qual qualquer tecido animal é congelado, a água irá se cristalizar tanto do lado de fora da célula (extracelular) quanto do lado de dentro (intracelular) (Do et al., 2019). O congelamento da água parece ser um criodano óbvio causado pelo processo de criopreservação de oócitos e embriões, a formação destes cristais de gelo pode perfurar ou rasgar as células e destruir estruturas celulares simplesmente por ação mecânica (Pegg, 2015).

Além de danos mecânicos, a formação dos cristais de gelo altera completamente a composição do meio, concentrando os solutos dissolvidos e precipitando os solutos que estão supersaturados, resultando em desidratação osmótica da célula (Nardid et al., 1997). Os criodanos causados pela formação de cristais de gelo provocam o encolhimento e expansão das células, que podem ser muito intensos para que elas mantenham a integridade estrutural, resultando em criodanos irreversíveis (Smith e Silva, 2004)

Contudo, Mazur et al. (2005) citam que a formação de cristais de gelo extracelulares pode não ser prejudicial à célula, eles relataram que mesmo havendo distorções no citoplasma da célula e da membrana plasmática, essas alterações são reversíveis, e, dentro de 3 a 4 minutos após o derretimento do gelo extracelular, a zona pelúcida volta à sua forma original. Em contraste, a formação de cristais de gelo intracelular durante o processo de criopreservação é prejudicial à célula (Mazur, 2010).

Uma vez formados, os cristais de gelo possuem uma taxa de crescimento dependente da temperatura, quanto mais baixa for a temperatura, mais lenta será a taxa de cristalização da água. Rápidas taxas de resfriamento, como na vitrificação, resultará em muitos pequenos cristais de gelo, porque não haverá tempo para a cristalização (Yavin e Arav, 2007), logo, uma taxa de resfriamento mais lenta leva a formação de cristais de gelo intracelulares maiores.

Embora o processo de vitrificação minimize a formação de cristais de gelo durante o congelamento, é durante o aquecimento que ocorrem os criodanos causados pela formação de cristais de gelo neste tipo de criopreservação (Teng, 2020). Quando as células são aquecidas, os núcleos de gelo minúsculos formados durante o resfriamento começam a crescer e acelera à medida que a temperatura aumenta, levando uma grande fração do solvente inicialmente vitrificado a se converter em gelo, causando lesões mecânicas às células (Hopkins et al., 2012).

1.2.3. Choque osmótico

Uma das consequências fundamentais da transição da água para o gelo é a alteração da capacidade da água de solvatar sais e outros solutos (Elliott et al., 2017). Os solutos são expulsos das estruturas dos cristais de gelo, levando a aumento da concentração de sais na fração residual da água (Cocks e Brower, 1974).

O aumento de solutos no meio extracelular é um fator prejudicial às células durante o congelamento, causando danos irreversíveis à membrana e subsequente lise celular durante o descongelamento (Elliott et al., 2017). Foi observado que durante o processo de criopreservação de células há a perda de íons de Potássio (K⁺) tornando as membranas mais permeáveis, o que intensifica o gradiente osmótico, resultando em lesões da membrana (Gomes, 2020).

1.3. Crioprotetores

A prevenção da formação de cristais de gelo intracelular e choque osmótico podem ser adquiridas utilizando meios de criopreservação que incluem crioprotetores (Shaw et al., 1997). Os crioprotetores além de atuar como um gradiente osmótico para auxiliar o movimento da água através da membrana celular, também agem reduzindo o ponto de fusão dessa água, diminuindo a formação dos cristais de gelo (Hardin, 2016).

De modo geral, os agentes crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são compostos por substâncias com baixa massa molecular, os quais atravessam facilmente a membrana celular. Todavia os crioprotetores não penetrantes são compostos por açúcares ou grandes polímeros de cadeia longa, os quais não conseguem atravessar as membranas celulares (Gomes, 2020) (Tabela 2).

A combinação de crioprotetores penetrantes e não penetrantes podem preservar as células de maneira ideal durante o processo de criopreservação, entretanto, há diversos fatores que precisam ser avaliados individualmente, antes de estabelecer algum protocolo, como a concentração, combinação de crioprotetores penetrantes e não penetrantes e o tempo de exposição em cada solução que podem afetar a viabilidade das células que serão criopreservadas (Hardin, 2016).

Tabela 2 - Crioprotetores comumente utilizados na criopreservação de células (Adaptado de Hutmacher, 2008).

Crioprotetores penetrantes Baixa massa molecular (M_p) $M_p < 100$ Da		Crioprotetores não penetrantes Alta massa molecular (M_p) $180 \leq M_p \leq 594$ Da $M_p > 1.000$ Da (1 KDa)			
Crioprotetor	M_p (Da)	Crioprotetor	M_p (Da)	Crioprotetor	M_p (KDa)
Etilenoglicol (EG)	62,07	Glicose	180,00	Hidroxietilamido	1,35
Propilenoglicol	76,09	Frutose	180,16	Polietilenoglicol (PEG)	1,45
Dimetilsulfóxido (DMSO)	78,13	Lactose	342,30	Polivinilpirrolidona (PVP)	10 – 40
Glicerol	92,09	Sacarose	342,30	Álcool polivinílico (PVA)	30 – 70
Butilenoglicol	92,09	Trealose	378,33	Ficoll® 70	60 – 80
Acetamida *	59,07	Rafinose	594,51	Dextran	>500
Formamida *	45,04				

* Crioprotetores mais tóxicos.

1.3.1. Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são solventes orgânicos com massa molecular pequeno e conseqüentemente conseguem penetrar na célula (Rall et al., 1984), formando pontes de hidrogênio com as moléculas de água e baixando a temperatura de congelamento, prevenindo a formação de cristais de gelo (Chang et al., 2011). Além disso, os crioprotetores penetrantes também atuam na prevenção da exposição do material biológico a altas concentrações de eletrólitos (Castro et al., 2011). A eficiência dos CPs varia em função da estrutura a ser criopreservada, células ou tecidos, tipo, concentração e tempo de exposição aos crioprotetores, além das diferenças entre as espécies animais (Gandolfi et al., 2006; Faustino et al., 2010).

Quando as células são expostas aos crioprotetores penetrantes, ocorre diminuição momentânea de tamanho e posteriormente verifica-se aumento de volume intracelular, devido ao movimento da água através da membrana (Alfotesis, 2012). O encolhimento é causado pela hiper osmolaridade da solução extracelular, este cessa quando o efluxo da água intracelular e o influxo do crioprotetor penetrante atingem o estado de equilíbrio. Os CPs entrarão nas células em taxas que variam de acordo com a permeabilidade, temperatura, razão entre a área de superfície e volume da célula e do gradiente de concentração extracelular de crioprotetores (Pegg, 2007).

Os crioprotetores penetrantes atravessam para o interior da célula por difusão simples através da bicamada fosfolipídica da membrana celular ou por difusão facilitada por canais localizados na membrana. Quando a passagem é realizada por difusão simples, a permeabilidade será diminuída e é dependente da temperatura da solução. Contrariamente à penetração por difusão facilitada que depende menos da temperatura e possui maior permeabilidade (Jin et al. 2011).

Altas concentrações de crioprotetores penetrantes são necessárias para proteger as células das lesões causadas pelo processo de criopreservação, entretanto, estudos evidenciam que estes são quimicamente tóxicos (Takahashi et al., 1985; Karlsson et al., 2014). Já nos anos 1980, estudos consideravam o efeito tóxicos dos crioprotetores penetrantes como uma barreira para o êxito da criopreservação (Fahy, 1986). A procura de crioprotetores adequados e suas concentrações apropriadas tem sido relevante em todos os protocolos de congelamento, crioprotetores com maior efeito osmótico e menor efeito tóxico nas células pós aquecimento é o objetivo principal de diversas pesquisas (Castro et al, 2011).

1.3.2. Crioprotetores não penetrantes

Outra classe de crioprotetores são os agentes crioprotetores não penetrantes, ou extracelulares, eles não penetram na membrana celular e atuam sobre o desequilíbrio osmótico que ocorre durante a criopreservação (Hardin, 2016). São macromoléculas ou polímeros, de massa molecular e tamanho elevado, adicionados ao meio de criopreservação para reduzir o uso de crioprotetores penetrantes, assim, minimizando a toxicidade da solução (Alfoteisy, 2012). Genericamente, os crioprotetores não penetrantes atuam na elevação da osmolaridade do ambiente extracelular, agindo na desidratação celular (Gomes, 2020).

Embora não penetrem na célula, essa classe de crioprotetores a protegem por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídicos da membrana (Santos et al., 2008). Com isso controlam a entrada e saída de água da célula, levando a desidratação celular antes do congelamento, reduzindo os danos causados pelo choque osmótico (Shaw et al., 2000).

A adição de açúcares como crioprotetores não penetrante visa reduzir o gradiente osmótico entre as soluções intracelulares e extracelulares (Kuleshova et al., 1999; Alfoteisy, 2012). Os açúcares mais utilizados como crioprotetores não penetrantes são a sacarose, trealose, rafinose, lactose, glicose e frutose, além de proteínas e lipoproteínas (Pereira e Marques, 2008). Além disso, foi mostrado que a utilização em conjunto de crioprotetores não penetrantes, como os sacarídeos, e penetrantes reduzem os efeitos tóxicos destes (Baxter e Lathe, 1971; Saito et al., 1994; Orief et al, 2005).

Outras macromoléculas são utilizadas nos meios de congelamento e atuam como crioprotetores não penetrantes, como o polietilenoglicol, polivinilpirrolidona, álcool polivinílico, Dextran e Ficoll. Este último sendo utilizado com sucesso na criopreservação de embriões bovinos (Lane et al., 1999) e humanos (Zech et al., 2005).

1.3.3. Consequências tóxicas dos crioprotetores

A toxicidade dos crioprotetores é fator limitante fundamental para o sucesso da criopreservação (Fahy, 2010), as altas concentrações de crioprotetores podem ser prejudiciais às células (Meryman, 1971). É relatado que os efeitos tóxicos dos crioprotetores diminuem a viabilidade celular muito mais do que os danos causados pelo estresse osmótico (Zhang et al., 2005). Diversos estudos têm demonstrado variação nos

efeitos tóxicos dos crioprotetores nas células, por exemplo, o etilenoglicol (EG) e o Glicerol foram menos tóxicos que o Propanodiol (PrOH) e Dimetilsulfóxido (DMSO) (Hutmacher, 2008; Jomha et al., 2010). Cada crioprotetor possui um mecanismo tóxico diferente.

Dentro da célula, o etilenoglicol é metabolizado inicialmente no retículo endoplasmático, convertido pela ação da enzima álcool desidrogenase em glicoraldeído, que por sua vez, tem como sub produto o ácido glicólico (Sumner et al., 1999). Conforme a quantidade de ácido glicólico excede a capacidade de tamponamento natural da célula, leva à diminuição do pH e conseqüentemente acidose celular (Carney, 1999).

Por se tratar de um constituinte natural das membranas celulares, além de estar presente em óleos e gorduras animais e vegetais, todas as células são capazes de metabolizar o glicerol ou sua forma comercial, a glicerina, ressaltando uma atividade atóxica. Porém, foi relatado que o glicerol afeta a organização citoplasmática através da viscosidade e alterações na polimerização das tubulinas, além de alterar a permeabilidade e a estabilidade da membrana celular (Hammerstedt e Graham, 1992).

Os efeitos tóxicos do propanodiol ainda não foram bem explorados, foi observada a produção de lactato intracelular e conseqüentemente acidificação e alterações hematológicas, ocasionando um desequilíbrio ácido-base e posteriormente morte celular (Wilson et al., 2005), em um mecanismo semelhante ao etilenoglicol.

O dimetilsulfóxido é capaz de combinar ou relacionar-se com proteínas, lipídeos, carboidratos além de ácidos nucleicos, sem alterar de forma irreversível a configuração destas moléculas (Sojka et al, 1990), sendo essa substância considerada muitas vezes como atóxica (Wusteman et al., 2008). Entretanto, foi demonstrado que em altas concentrações (>2,0 M), o DMSO causou aumento do DNA mitocondrial, como tentativa de reparar as injúrias causadas, em concentrações maiores que 3,0 M, foi observado queda imediata dos níveis celulares de ATP e a incapacidade de replicação de DNA mitocondrial (Zampolla et al., 2009).

Diferentes estratégias têm sido usadas para minimizar os efeitos tóxicos e nocivos da alta concentração de crioprotetores, sem alterar a capacidade de criopreservação (Fahy, 2010). Além disso, verificou-se que a mistura de dois ou mais tipos de crioprotetores em meios de congelamento podem causar interações sinérgicas entre eles, ocasionando em menor toxicidade do que a utilização de apenas um CPs (Fahy et al., 2004). A toxicidade de um crioprotetor deve ser o principal fator limitante a ser considerado para alcançar uma

criopreservação bem sucedida, independente se for utilizada a metodologia de congelação lenta ou vitrificação (Fahy et al., 1987).

1.4. Proteínas anticongelantes

As proteínas anticongelantes (AFPs) foram descobertas no final dos anos 1960, sendo uma classe de polipeptídios, que estavam presentes em alguns peixes antárticos que possuíam a capacidade de resistir ao congelamento nas águas extremamente frias do oceano austral (DeVries e Wohlschlag 1969). Essas proteínas anticongelantes protegem as células da lesão por congelamento, reduzindo a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento (Chapsky e Rubinsky 1997).

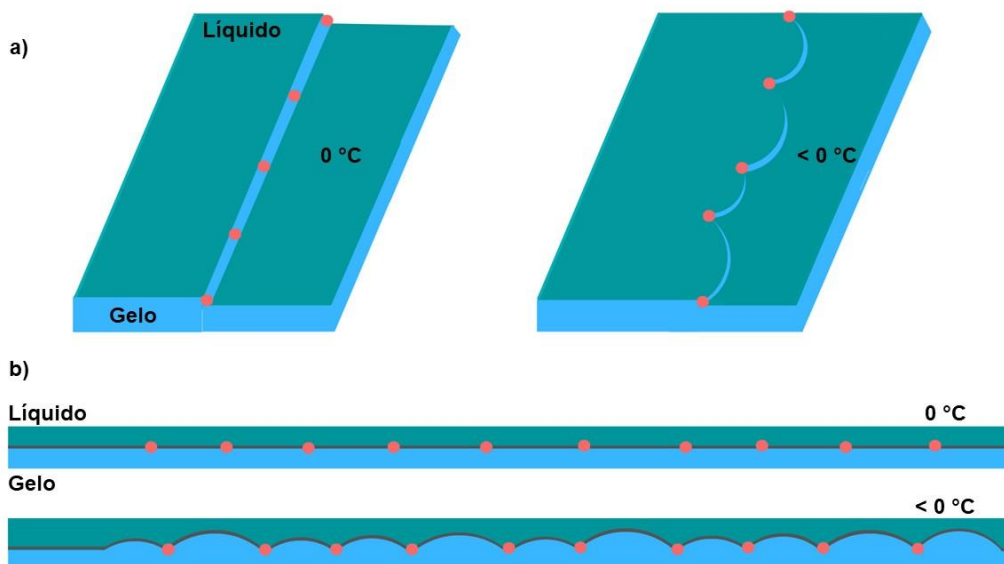
Elas reduzem o ponto de congelamento da água e podem se ligar à superfície de um cristal de gelo em crescimento para impedir seu crescimento contínuo (Davies e Hew, 1990) e inibir a formação destes cristais durante o aquecimento (Knight et al., 1984). As AFPs já foram documentadas em vários peixes tolerantes ao frio (DeVries e Wohlschl, 1969; DeVries et al., 1970), insetos (Graham et al., 1997), bactérias (Gilbert et al., 2005; Raymond et al., 2008), fungos (Park et al., 2012) e plantas (Griffith e Yaish, 2004) e por possuírem a capacidade de influenciar o crescimento dos cristais de gelo, se levou a uma ampla variedade de aplicações, desde a preservação de alimentos congelados à criopreservação de órgãos e células (Bang et al., 2013).

Inicialmente foi sugerido que as AFPs se ligavam em forma de pontes de hidrogênio a átomos de oxigênio da superfície do gelo (combinação de rede) além da formação de pontes de hidrogênio em cadeias laterais (ocupação de rede). Entretanto, a maioria das estruturas das AFPs de determinados peixes descartam a ocupação de rede e seus locais de ligação ao gelo são geralmente hidrofóbicos, sugerindo que a ligação das AFPs com os cristais de gelo seja fortemente dependente de interações hidrofóbicas de van der Waals (Jia e Davies, 2002).

A principal interpretação físico-química da atividade anticongelante jaz no fato da adsorção das AFPs aumentarem a curvatura do gelo, deixando-o energeticamente menos favorável para as moléculas de água se juntarem à estrutura do gelo (Figura 2). Esse formato de ligação faz com que a temperatura do ponto de fusão seja diminuída, conseqüentemente diminuindo a formação de cristais de gelo. Essas proteínas podem reconhecer e ligar-se a planos específicos do gelo, controlando o crescimento dos cristais (Suris-Valls e Voets, 2019).

Resultando na diminuição do ponto de congelamento e aumento no ponto de fusão, sendo explicado pelo efeito Gibbs-Thompson (Knight et al., 1991). Esse efeito é um fenômeno onde ocorre uma variação no potencial químico através de uma superfície curvada ou de uma interface em uma superfície do gelo, além desse efeito as AFPs também possuem a capacidade de adsorver em um ou mais planos da superfície do gelo (Bar Dolev et al., 2016).

Figura 2. Modelo de inibição-adsorção da atividade anticongelante. Representação esquemática (a) do modelo original no sentido da direção lateral (pinagem) e (b) modelo adaptado da inibição-adsorção no sentido da direção normal por fixação na superfície (Adaptado de Knight et al., 1991; Oude Vrielink et al., 2016).



As AFPs de peixes foram classificadas em cinco tipos distintos, com base nas suas características estruturais, dois tipos foram caracterizados em insetos (Tabela 3), além de diversas variedades encontradas em plantas (Hon et al., 1995). Cada tipo de AFPs é radicalmente diferente dos demais em suas estruturas e possuem múltiplas isoformas que variam em comprimento ou sequência de aminoácidos (Jia e Davies, 2002). Essa diferença entre os tipos de AFPs mesmo em indivíduos da mesma família, insinua que houve evolução muito recente dessas proteínas, por volta do início da glaciação da água do mar, cerca de 10 a 20 milhões de anos no hemisfério sul e 1-2 milhões de anos no hemisfério norte (Scott et al., 1986; Wilson, 1993; Cheng, 1998; Fletcher e Hew, 2001).

Tabela 3. Proteínas anticongelantes de peixes e insetos (Adaptado de Jia e Davies, 2002).

Tipo	Classificação	Tamanho (KDa)
Peixe		
I	Hélice α rica em alanina	3 – 5
II	Dobra de lecitina do tipo C de estrutura mista α , β e alça	14 – 24
III	Proteína globular contendo pequenos filamentos β	7
IV	Pacote de hélice	12
AFGP	Glicoproteína anticongelante	3 – 24
Insetos		
<i>Tm e Dc</i>	Hélice β direita	8 – 9
<i>Cf</i>	Hélice β esquerda	9 - 12

Legenda: *Tm* - *Tenebrio Molitor*; *Dc* - *Dendroides canadenses*; *Cf* - *Choristoneura fumiferana*

Em geral, as AFPs formam estruturas tridimensionais mantidas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e ligações dissulfeto, mas o núcleo hidrofóbico tradicional às vezes pode não está presente (Sun et al., 2014; Davies, 2014; Marshall et al., 2002; Pentelute et al., 2008). Por exemplo, as AFPs tipo I têm uma estrutura mais simples, constituído por uma única hélice rica em Alanina (Sicheri e Yang, 1995), já as AFPs do tipo II e III são proteínas globulares relativamente pequenas, sendo a do tipo II estabilizada por ligações dissulfetos e as do tipo III por meio de um núcleo hidrofóbico (Liu et al., 2007; Ko et al., 2003).

Um indicador frequentemente usado para indicar a atividade das AFPs é a diferença entre o ponto de congelamento e o de fusão, denominada histerese térmica (HT) (Kristiansen e Zachariassen, 2005). Acredita-se que a histerese térmica seja causada pelo efeito Kelvin, porque a ligação das AFPs à superfície do gelo gera uma estrutura micro convexa que é termodinamicamente menos favorável para as moléculas de água se ligarem em comparação à uma superfície plana de gelo (Knight e DeVries, 1989; Knight, 2000).

As AFPs também podem ser classificadas de acordo com sua eficácia pela HT (Mangiagalli et al., 2017). Podendo ser classificadas em hiperativas e moderadas, onde as AFPs moderadas têm HT de até 1 °C nas concentrações milimolares enquanto que as AFPs hiperativas produzem HT mais altas em concentrações micromolares (Celik et al., 2010).

Considerando estas propriedades crioprotetoras interessantes das AFPs, alguns pesquisadores adicionaram estas proteínas em seus protocolos de criopreservação de embriões de diversas espécies (Tabela 4), reduzindo assim o uso de crioprotetores tóxicos e proporcionando uma melhora na eficiência e segurança dos protocolos de criopreservação (Robles et al., 2019).

Tabela 4. Principais estudos utilizando proteínas anticongelantes (AFPs) na criopreservação de embriões (Adaptador de Robles et al., 2019).

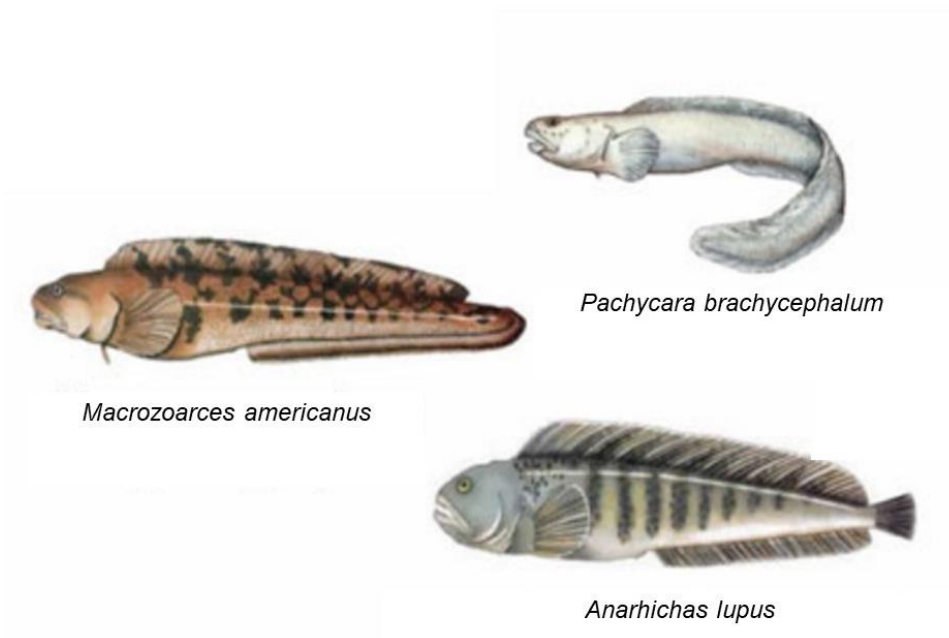
AFPs	Espécie	Concentração	Método de criopreservação	Ano
AFGP	Camundongo	20 mg/mL	Criopreservação	1994
AFP III	Camundongo	0,1 – 1 mg/mL	Criopreservação	1995
AFP	Equina	20 mg/mL	Resfriamento	1997
AFP III	Coelho	500 ng/mL	Criopreservação	2014
AFP 11	Bovina	10 mg/mL	Hipotérmico	2015
AFP III	Bovina	500 e 1000 ng/mL	Vitrificação	2016
AFGP8	Bovina	1 nM	Vitrificação	2017
AFP III	Porcina	1 ug/mL	Hipotérmico	2018

1.4.1. AFP tipo III

A proteína anticongelante tipo III (AFP tipo III) contém 66 aminoácidos com tamanho de 7 kDa e raramente possui resíduos de alanina ou cisteína (Chaves et al., 2016), presente em membros da subclasse Zoarcoidei (Figura 3), um grupo de peixes polares que são resistentes ao congelamento (Antson et al., 2001; Salvay et al., 2010). A AFP tipo III protege o peixe do congelamento, adsorvendo à superfície dos cristais de gelo nucleantes e inibindo o seu crescimento. Assim, o ponto de congelamento do peixe é diminuído abaixo da temperatura do oceano por um processo não coligativo (Raymond e DeVries, 1997).

Existem diversas isoformas da AFP tipo III oriunda da *Macrozoarces americanos*, peixe da subclasse Zoarcoidei, sendo a principal espécie onde a AFP tipo III é encontrada (Baardsnes e Davies, 2002).

Figura 3. Peixes da subclasse *Zoarcoidei* (Adaptado de DeVries, 2020).



1.4.2. AFP *TmAFP*

O *Tenebrio molitor* é uma praga de grãos, conhecido como besouro da farinha amarela, frequentemente encontrado em regiões de clima frio (Liou et al., 1999). Suas larvas (Figura 4) são intolerantes ao congelamento, contudo, são capazes de sobreviver a temperaturas abaixo de zero a uma média de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Johnston e Lee, 1990), sua sobrevivência é facilitada pelo acúmulo de AFPs (Ramsey, 1964, Tomchaney et al., 1982), que aumentam a atividade da histerese térmica de sua hemolinfa e fluidos extracelulares impedindo seu congelamento (Tomalty et al., 2019).

A AFP do *T. molitor* (*TmAFP*) é uma mistura de isoformas semelhantes na faixa de massa de 7-9 kDa (Tomalty et al., 2019), foi purificada cerca de três décadas depois que foi descrita pela primeira vez (Shears et al., 1993), tendo seu cDNA clonado e expresso em bactérias recombinantes (Graham et al., 1997).

A tradução conceitual de 17 clones de cDNA rendeu 8 isoformas de *TmAFP* diferentes, todas codificando 84, 96 ou 120 aminoácidos, consistindo em 5, 6 ou 7

repetições, respectivamente, de uma sequência de 12 resíduos, Thr-Cys-Thr-X- Ser-X- X-Cys-X-X-Ala-X (onde X pode ser qualquer resíduo). Os três primeiros resíduos de cada repetição de aminoácido, Thr-Cys-Thr, são empilhados e formam uma superfície plana da β -hélice, que é complementar à superfície do gelo (Liou et al., 2000).

Figura 4. Larvas de *Tenebrio molitor* (Adaptado de Tomalty et al., 2019).



Yang et al. (2003) estudaram a função de moléculas de água dentro de uma camada da β -hélice da *TmAFP* e demonstraram que as moléculas de água regularmente dispostas na primeira camada de hidratação de *TmAFP*, participam de fortes interações não vinculadas com a *TmAFP* e aderem ao monômero de proteína como uma estrutura única em solução. Além disso, eles descobriram que um número maior de átomos de oxigênio de água regularmente dispostos (pontos de rede) no local de ligação de gelo de *TmAFP* teve chance melhor de iniciar o processo de reconhecimento e ligação.

Em resumo, a atividade de *TmAFP* pode ser atribuída de duas maneiras, a interação direta de curto alcance da superfície da proteína com a superfície de gelo em crescimento e a interação de longo alcance pela dinâmica da água induzida por proteínas que se estende até 20 Å da superfície da proteína (Meister et al., 2013). Embora possua grande atividade anticongelante, não há relatos da utilização desta AFP em métodos de criopreservação de embriões.

1.4.3. AFP *LpAFP*

A *LpAFP* é uma proteína anticongelante da gramínea *Lolium perenne* (Figura 5), é pertencente à família Poaceae, que são adaptadas para crescer no frio Hemisfério Norte (Sandve et al., 2011) e relatado para resistir ao congelamento (Kuiper et al., 2001). Sua cristalização mostrou que se trata de um beta hélice canhota estabilizado por escadas internas de Asn/His, sendo distinta da *TmAFP*. O local de ligação do gelo da *LpAFP* é plano e localizado em uma superfície do beta hélice, o que permite sua ligação aos planos basal e primário do gelo (Middleton et al., 2012).

Figura 5. Azevém perene (*Lolium perenne*) (Jardim botânico da UTAD, 2022).



O gene *LpAFP* consiste em 354 pb que codifica uma proteína de cerca de 118 aminoácidos (13,5 kDa) com uma repetição semiconservada de sete aminoácidos X-X-N-X-V X-G em todo o seu comprimento (Sidebottom et al., 2000; Middleton et al., 2009).

LpAFP tem alta atividade de inibição da cristalização do gelo, mas baixa atividade de HT, sugerindo ser uma estratégia tolerante ao congelamento em vez de evitar o congelamento em plantas (Lauersen et al., 2011). Na natureza, a *LpAFP* é secretada para o apoplasto celular, onde o cristal de gelo geralmente cresce e atua para minimizar os danos causados pela geada ao tecido da planta (Bredow et al., 2017 e Middleton et al.,

2009). Além de reduzir o ponto de congelamento a LpAFP também atua protegendo as células contra danos durante condições de não congelamento (Tomczak et al., 2002) principalmente devido às suas interações com as proteínas integrais da membrana (Rubinsky et al. 1991), os lipídios da membrana (Hays et al. 1996) e a membrana, que modifica a cadeia acila no núcleo de bicamada (Tomczak et al., 2002). Não existem relatos da utilização desta AFP na criopreservação de embriões ou gametas.

1.5. Características de embriões produzidos *in vitro*

Embriões produzidos *in vitro* são menos resistentes à criopreservação quando comparados aos produzidos *in vivo* (Abe et al., 2002), essa diferença pode estar associada a diferenças físicas e morfológicas como maior quantidade de vacúolos, expressão reduzida de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, disco embrionário geralmente menor com menos células, menor quantidade de células totais e zona pelúcida mais frágil (Crosier et al., 2001). Além de serem mais sensíveis ao estresse oxidativo devido à alta concentração de lipídeos na membrana plasmática (Mata-Campuzano et al., 2012) e por serem expostos a altas concentrações de oxigênio durante a sua produção (Agarwal et al., 2006).

O acúmulo de lipídeos pode desempenhar papel fisiológico importante, uma vez que são as principais reservas energéticas para o desenvolvimento embrionário até a implantação (Sturmeijer et al., 2009). Sudano et al. (2014) sugeriram que a adição de Soro Fetal Bovino (SFB) ao meio de cultivo é um fator que pode influenciar o acúmulo de lipídeos nas células embrionárias. Portanto, o alto teor de lipídeos no citoplasma de embriões de mamíferos produzidos *in vitro* é considerado o principal fator para a baixa criotolerância destes (Valente et al., 2022).

O alto teor de lipídeos pode ser resultado da captação destes do meio ou em consequência do metabolismo ineficiente das mitocôndrias embrionárias, uma vez que os embriões produzidos *in vitro* possuem um decréscimo da densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (Farin et al., 2004; Barceló-Fimbres e Seidel Jr, 2007).

Todavia, o aumento da quantidade de gotículas lipídicas em embriões PIV não é o único fator que altera negativamente a qualidade, pode-se destacar também diferenças nos perfis transcricionais, população esparsa de microvilosidades, menor número total de células, metabolismo excessivo de substratos energéticos e alta sensibilidade térmica

(Gardner et al., 2000, Lonergan et al., 2001, Abe et al., 2002, Sudano et al., 2014). Embora esteja bem estabelecida, a produção *in vitro* de embriões produz blastocistos com características que reduzem sua qualidade e conseqüentemente reduzindo sua criosobrevivência quando comparado a seus pares produzidos *in vivo* (Valente et al., 2022).

1.6 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, p.57-66, 2002.

Agarwal, A. et al. Oxidative stress in an assisted reproductive technique setting. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 503-512. 2006.

Alfarha, A.B. *et al.* Evaluation of three cryoprotectants used with bovine milk affected with *Mycoplasma bovis* in different freezing conditions. **BMC Research Notes**, v. 11, p.216. 2018.

Alfoteisy, B.A. **Natural honey as a cryoprotectant to improve viability of vitrified bovine oocytes**. Tese apresentada ao College of Graduate Studies no Department of Veterinary Biomedical Sciences University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

Almodin, C.G. *et al.* Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. **Human Reproduction**, v. 25, p. 1192-1198. 2010.

An, L. *et al.* Successful vitrification of *in vivo* embryos collected from superovulated Japanese Black cattle (Wagyu). **Reproduction Domestic Animals**, v. 51, p.255-261. 2016.

Andrabi, S.M.H. e Maxwell, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p.223-243, 2007.

Antson, A.A. et al. Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins J. **Molecular Biology**, v. 305, p. 875-889. 2001.

Arav, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, p.96-102, 2014.

Arav, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 96-102. 2014.

Argyle, C.E. *et al.* Oocyte cryopreservation: where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22 (4), p.440-449, 2016.

Arshad, M.S.U. *et al.* Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. **Cryobiology**, v. 101, p.1-11. 2021.

Baardsnes, J. e Davies, P.L. Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1601, p. 49 – 54. 2002.

Bang, J.K. *et al.* Antifreeze peptides and glycopeptides, and their derivatives: Potential uses in biotechnology. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2013–2041. 2013.

Bar dolev, M. *et al.* Ice-Binding Proteins and Their Function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 515–542. 2016.

Barceló-Fimbres, M. e Seidel Jr G.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 74(11), p. 1395-1405. 2007.

Baxter, S.J. e Lathe, G.H. Biochemical effects on kidney of exposure to high concentrations of dimethyl sulphoxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, p. 1079-1091. 1971.

Becker, B.S. **Viabilidade de blastocistos de *mus musculus domesticus* expostos à alta pressão gasosa e submetidos à criopreservação.** (Mestrado) –Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

Bredow, M. *et al.* Ice-binding proteins confer freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15(1), p. 68–81. 2017.

Camus, A. *et al.* Principe de la vitrification: cinétiques comparatives [The comparison of the process of five different vitrification devices]. **Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie**, v. 34, p. 737-745. 2006.

Castro, S.V *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39(2), p. 957. 2011.

Celik, Y. *et al.* Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 12, p. 5423–5428. 2010.

Chang, C.C. *et al.* Cryopreservation of oocytes in experimental models. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 23, p.307–313. 2011.

Chapsky, L. e Rubinsky, B. Kinetics of antifreeze protein-induced ice growth inhibition. **FEBS Letters**, v. 412, p. 241–244. 1997.

Chaves, D.F. *et al.* The use of antifreeze protein type III for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 73(3), p. 324-328. 2016.

Chen, S.U. *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v. 21, p. 2794-2800. 2006.

Chen, S.U. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v. 16, p. 2350-2356. 2001.

Cheng, C.H. Evolution of the diverse antifreeze proteins. **Current Opinions in Genetics and Development**, v. 8, p. 715–720. 1998.

Chian, R.C. *et al.* High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. S36. 2005.

Cocks, F.H. e Brower, W.E. Phase diagram relationships in cryobiology. **Cryobiology**, v. 11, p. 340-358. 1974.

Comizzoli, P. e Holt, W.V. Recent Progress in Spermatology Contributing to the Knowledge and Conservation of Rare and Endangered Species. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 10, p.469-490, 2022.

Crosier, A.E. *et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology Reproduction**, v.64, p.1375-1385. 2001.

Davies, P.L. e Hew, C.L. Biochemistry of fish antifreeze proteins. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 4, p. 2460–2468. 1990.
Davies, P.L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. **Trends in biochemical sciences**, v. 39(11), p. 548–555. 2014.

DeVries, A.L. e Wohlschlag, D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes. **Science**, v. 163, p.1073-1075, 1969.

DeVries, A.L. *et al.* Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. **The Journal of biological chemistry**, v. 245(11), p. 2901–8. 1970.

Dinnyes, A. *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology Reproduction**, v. 63, 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, p. 837-846. 2019.

Do, V.H. *et al.* A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. **Cryobiology**, v. 77, p. 58-63. 2017.

- Elliott, G.D. *et al.* Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. **Cryobiology**, v. 76, p. 74-91. 2017.
- Fabbri, R. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. **Cell Tissue Banking**, v. 7, p. 113-122. 2006.
- Fahy, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p. 45-53. 2010.
- Fahy, G.M. *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, p. 22-35. 2004.
- Fahy, G.M. *et al.* Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 24, p. 196-213. 1987.
- Fahy, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p.1-13. 1986.
- Fahy, G.M. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407-426. 1984.
- Farin, C.E. *et al.* Development of fetuses from in vitro - produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 53-62. 2004.
- Faustino, L.R. *et al.* Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: Effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 90-97. 2010.
- Ferré, L.B. *et al.* Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14 (5), p.991-1004, 2019.
- Ferreira, A.V. *et al.* Toxicity of cryoprotectants agents in freshwater prawn embryos of *Macrobrachium amazonicum*. **Zygote**, v. 23, p.813-820. 2015.
- Fletcher, G. e Hew, C.L. Antifreeze proteins of teleost fishes. **Annual Review of Physiology**, v. 63, p, 359–390. 2001.
- Gandolfi, F. *et al.* Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1150-1156. 2006.
- Gardner, D.K. *et al.* Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. **Seminars in Reproductive Medicine**, p. 205–218. 2000.
- Gilbert, J.A. *et al.* A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245(1), p. 67–72. 2005.

Gomes, I.C. **O potencial crioprotetor do alginato de sódio na criopreservação de tecido ovariano.** (Doutorado) Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020.

Graham, L.A. et al. Hyperactive antifreeze protein from beetles. **Nature**, v. 388, p. 727–728. 1997.

Griffith, M. e Yaish, M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. **Trends in Plant Science**, v. 9(8), p. 399–405. 2004.

Hamawaki, A. *et al.* Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v. 51, p. 165. 1999.

Hammerstedt, R.H. e Graham, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29(1), p. 26- 38. 1992.

Hardin, P.T. **Vitrification of immature and mature bovine oocytes.** (Mestrado) Faculdade do Estado da Louisiana, 2016.

Hays, L.M. et al. Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6835–6840. 1996.

Heather, E. et al. Laboratory-Scale Isolation of Insect Antifreeze Protein for Cryobiology. **Biomolecules**, v. 9, p. 180. 2019.

Holt, W.V. e Comizzoli, P. Opportunities and Limitations for Reproductive Science in Species Conservation. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 10, p.491–511.

Hon, W.C. *et al.* Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. **Plant Physiology**, v. 109(3), p. 879–889. 1995.

Hopkins, J.B. *et al.* Effect of common cryoprotectants on critical warming rates and ice formation in aqueous solutions. **Cryobiology**, v. 65 (3), p.169-178, 2012.

Hutmacher D. Cryobiology A2 - Blitterswijk Clemens van, em: Thomsen, P. *et al.*, **Tissue Engineer Academic Press**, Burlington, p. 363–401. 2008.

Inaba, Y. *et al.* Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. **Cryobiology**, v. 72 (2), p.86-92, 2016.

Isachenko, V. *et al.* Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 36, p. 250-253. 1998.

Isachenko, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452. 2003.

- Ishimori, H. *et al.* Factors affecting survival of mouse blastocysts vitrified by a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v. 38, p. 1175-1185. 1992.
- Jardim botânico da UTAD. *Lolium perenne*. Disponível em <https://jb.utad.pt/especie/Lolium_perenne>. Acesso em 27 de jun de 2022.
- Jia, Z. e Davies P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, p. 101-106. 2002.
- Jin, B. *et al.* Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 834–847. 2011.
- Johnston, S.L. e Lee, R.E. Regulation of supercooling and nucleation in a freeze tolerant beetle (*Tenebrio molitor*). **Cryobiology**, v. 27, p. 562-568. 1990.
- Jomha, N.M. *et al.* Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes. **Cryobiology**, v. 61, p. 297-302. 2010.
- Karlsson, J.O. *et al.* Optimization of cryoprotectant loading into murine and human oocytes. **Cryobiology**, v. 68, p.18–28. 2014.
- Knight, C.A. e Devries, A.L. Melting inhibition and superheating of ice by an antifreeze glycopeptide. **Science**, v. 245(4917), p. 505–7. 1989.
- Knight, C.A. *et al.* Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. **Biophysical Journal**, v. 59, p. 409–418. 1991.
- Knight, C.A. *et al.* Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. **Nature**, v. 308, p. 295–296. 1984.
- Knight, C.A. Structural biology. Adding to the antifreeze agenda. **Nature**, v. 406(6793), p. 249, 51. 2000.
- Ko, T.P. *et al.* The refined crystal structure of an eel pout type III antifreeze protein RD1 at 0.62-Å resolution reveals structural microheterogeneity of protein and solvation. **Biophysical Journal**, v. 84(2 Pt 1), p. 1228–37. 2003.
- Kristiansen, E. e Zachariassen, K.E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. **Cryobiology**, v. 51(3), p. 262–80. 2005.
- Kuiper, M.J. *et al.* A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne*. **Biophysical Journal**, v. 81, p. 3560–3565. 2001.
- Kuleshova, L. *et al.* Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. **Human Reproduction**, v. 14, p. 3077-3079. 1999.
- Kuleshova, L.L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130. 1999.

- Kuwayama, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproduction Biomedicine**, v. 11, p. 608-614. 2005.
- Kuwayama, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, p. 73-80. 2007.
- Lane, M. *et al.* Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1234–1236. 1999.
- Larman, M.G. e Gardner, D.K. Vitrifying mouse oocytes and embryos with super-cooled air. **Human Reproduction**, v. 25, p. 265. 2010.
- Lauersen, K.J. *et al.* Expression and characterization of an antifreeze protein from the perennial rye grass, *Lolium perenne*. **Cryobiology**, 2011.
- Lee, H.H. *et al.* Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. **Human Reproduction**, v. 30, p. 2110-2119. 2015.
- LeGal, F. e Massip, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effect of meiotic stage, cyclohexamide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, p. 290-300. 1999.
- Liang, S. *et al.* Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.86 (2), p.485-494, 2016.
- Liebermann, J. e Tucker, M.J. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**. v. 254, p. 345-64. 2004.
- Liebermann, J. *et al.* Blastocyst development after vitrification of multi pronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. **Reproduction BioMedicine Online**, v. 4, p. 146-150. 2002.
- Liou, Y.C. *et al.* Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. **Nature**, v. 406, p. 322–324. 2000.
- Liu, Y. *et al.* Structure and evolutionary origin of Ca (2+)-dependent herring type II antifreeze protein. **PLoS One**, v. 2(6), p. e548. 2007.
- Lonergan, P. *et al.* Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, p. 427–437. 2001.
- Luvoni, G.C. *et al.* Effects of slow and ultrarapid freezing on morphology and resumption of meiosis in immature cat oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 51, p. 93-98. 1997.

- Luvoni, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 101-111. 2006.
- Luyet, B.J. e Hodapp, R. Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 39, p. 433-434. 1938.
- Madura, J.D. *et al.* Molecular recognition and binding of thermal hysteresis proteins to ice. **Journal of Molecular Recognition**, v. 13, p.101-113, 2000.
- Mandawala, A.A. *et al.* Cryopreservation of animal oocytes and embryos: current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, p. 1637–1644. 2016.
- Mangiagalli, M. *et al.* Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria. **FEBS Journal**, v. 284, n. 1, p. 163–177. 2017.
- Marshall, C.B. *et al.* Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*. **FEBS letters**, v. 529(2–3), p. 261–267. 2002.
- Martino, A. *et al.* Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 503-512. 1996.
- Martino, A. *et al.* Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069. 1996.
- Mata-Campuzano, M. *et al.* Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. **Theriogenology**, v. 78, p. 1005–1019. 2012.
- Matsumoto, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144. 2001.
- Mazur, P. Do biological cells and tissues cryopreserved in biorepositories and thawed differ significantly from the original materials? **Cryobiology**, v. 61, p. 366. 2010.
- Mazur, P. *et al.* Extra-and intracellular ice formation in mouse oocytes. **Cryobiology**, v. 51, p. 29–53. 2005.
- Meister, K. *et al.* Long-range protein–water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110.5, p. 1617-1622. 2013.
- Meryman, H. Cryoprotectants agents. **Cryobiology**, v. 8, p. 173-183. 1971.
- Middleton, A.J. *et al.* Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. **Journal of Molecular Biology**, v. 416(5), p. 713–724. 2012.
- Middleton, A.J. *et al.* Identification of the icebinding face of a plant antifreeze protein. **FEBS Letters**, v. 583, p. 815–819. 2009.

- Moawad A.R. **Cryopreservation of ovine oocytes**. (Doutorado) Ciência Animal, Universidade de Nottingham. 2010.
- Morató, R. *et al.* Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22(7), p.1141. 2010.
- Moussa, M. *et al.* Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. **Science China Life Science**, v. 57, p. 903-914. 2014.
- Muthukumar, K. *et al.* Blastocyst cryopreservation: vitrification or slow freeze. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. S426-S427. 2008.
- Nardid, O. *et al.* A Comparative Study of the Effect of Freeze–Thawing on Peripheral and Integral Membrane Proteins. **Cryobiology**, v. 34 (2), p.107-113, 1997.
- Nguyen, V. K. *et al.* Comparison of the microdrop and minimum volume cooling methods for vitrification of porcine in vitro-produced zygotes and blastocysts after equilibration in low concentrations of cryoprotectant agents. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, p. 457– 462. 2018.
- Nishijima, K. *et al.* Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. **Cryobiology**, v. 69 (1), p.22-25, 2014.
- Orief, Y. *et al.* Vitrification: Will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? **Middle East Fertility Society Journal**, v. 10, p. 171-184. 2005.
- Oude Vrielink, A.S. *et al.* Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions. **Biointerphases**, v. 11, p. 18906. 2016.
- Park, K.S. *et al.* Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. **Cryobiology**, v. 64(3), p. 286–96. 2012.
- Pegg, D.E. Principles of Cryopreservation. In: Wolkers, W., Oldenhof, H. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 1257. 2015.
- Pegg, D.E. Principles of cryopreservation. **Methods in molecular biology**, v. 368, p. 39-57. 2007.
- Pentelute, B.L. *et al.* X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130(30), p. 9695–9701. 2008.
- Pereira, R.M. e Marques, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v. 9 (4), p.267-277. 2008.

Petyim, S. *et al.* The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 92, p. 1116-1121. 2009.

Polge, C. *et al.* Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p.666, 1949.

Portmann, M. *et al.* Evaluation of blastocyst survival following vitrification/warming using two different closed carrier systems. **Human Reproduction**, v. 25, p. 261. 2010.

Pryor, J.H. *et al.* Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v. 75 (1), p.24-33. 2011.

Rall, W.F e Meyer, T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 31 (3), p.683-692, 1989.

Rall, W.F. e Fahy, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575. 1985.

Rall, W.F. *et al.* Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v. 21, p. 106-121. 1984.

Rall, W.F. *et al.* Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Reproduction Fertility**, v. 80, p. 499-504. 1987.

Ramsey, J.A. The rectal complex of the mealworm *Tenebrio molitor*, L. (Coleoptera, Tenebrionidae). **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. B 248, p. 279–314. 1964.

Raymond, J.A. e DeVries, A.L. Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. **Proceedings of the National Acadademy of Science of the United State of America**, v. 74, p. 2589 – 2593. 1977.

Raymond, J.A. *et al.* A bacterial ice-binding protein from the Vostok ice core. **Extremophiles: life under extreme conditions**, v. 12(5), p. 713–7. 2008.

Rubinsky, B. *et al.* Hypothermic protection: A fundamental property of “antifreeze” proteins. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 180, p. 566–571. 1991.

Rubinsky, B. *et al.* The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. **Cryobiology**, v. 29, p.69-79, 1992.

Ruppert-Lingham, C.J. *et al.* Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulusocyte complexes following exposure to dimethyl sulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cell after thawing. **Human Reproduction**, v. 18, p. 392-398. 2003.

- Saito, N. *et al.* Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. **Theriogenology**, v. 41, p. 1053-1060. 1994.
- Salvay, A.G. *et al.* Structure and interactions of fish type III antifreeze protein in solution. **Biophysical Journal**, v. 99, p. 609-618. 2010.
- Sandve, S.R. *et al.* Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. **Plant Science**, v. 180, p. 69–77. 2011.
- Santos, R.R. *et al.* Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p.09-15, 2008.
- Saragusty, J. e Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19. 2011.
- Scott, G.K. *et al.* Fish antifreeze proteins: recent gene evolution. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 43, p. 1028–1034. 1986.
- Shaw, J. M., *et al.* Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219–229. 1997.
- Shaw, J.M. e Troson, A.O. Fundamental Cryobiology of Mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72. 2000.
- Shaw, L.M. *et al.* **Cryopreservation of oocyte and embryo**. em: Trounson, A e Gardner, D. Handbook of in vitro fertilization. 2ed Flórida, p.376-380. 2000.
- Shears, M. *et al.* Distribution of type III antifreeze proteins in the *Zoarcoidei*. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 2, p. 104 – 111. 1993.
- Sicheri, F. e Yang, D.S. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. **Nature**, v. 375(6530), p. 427–31. 1995.
- Sidebottom, C. *et al.* Phytochemistry: Heat-stable antifreeze protein from grass. **Nature**, v. 406, p. 256. 2000.
- Smith, G.D. e Silva, C.A.S.E. Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9 (2), p.171-178, 2004.
- Sojka, J.E. *et al.* Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners**. v.36, p. 683-690. 1990.
- Sturmeý, R.G. *et al.* Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 50-58. 2009.

- Sudano, M.J. et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, p.124-131. 2014.
- Sudano, M.J. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75 (7), p.1211-1220. 2011.
- Sugiyama, R. et al. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p. 161-167. 2010.
- Sumner, S.C.J. et al. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. **Chemical Research Toxicology**, v.12, p. 1110-1116. 1999.
- Sun, T. et al. An antifreeze protein folds with an interior network of more than 400 semi-clathrate waters. **Science**, v. 343(6172), p. 795–798. 2014.
- Sun, X. et al. Engelhardt. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. **Biology Reproduction**, v. 79, p. 832-840. 2008.
- Suris-Valls, R. e Voets, I.K. Peptidic antifreeze materials: Prospects and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20(20), p. 5149. 2019.
- Takahashi T, et al. Effect of cryoprotectants on the viability and function of unfrozen human polymorphonuclear cells. **Cryobiology**, v. 22, p. 336–50. 1985.
- Teng, J. **Improving cryopreservation of bovine oocytes and embryos**. (Doutorado) Ciência animal, Universidade de Cornell, 2020.
- Tomchanev, A.P. et al. Purification, composition, and physical properties of a thermal hysteresis antifreeze protein from larvae of the beetle, *Tenebrio molitor*. **Biochemistry**, v. 21, p. 716–721. 1982.
- Tomczak, M.M. et al. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 874–881. 2002.
- Tsang W.H. e Chow. K.L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. **Biotechniques**, v. 46, p. 550-552. 2009.
- Vagita, G. e Nagy, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12 (6), p.779-796, 2006.
- Vajta, G. e Kuwayama, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244. 2006.
- Vajta, G. et al. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58. 1998.

- Vajta, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58. 1998.
- Valente, R.S. *et al.* Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 239, p. 1-8. 2022.
- Valente, R.S. *et al.* Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development. **Theriogenology**, v. 158, p. 290–296. 2020.
- Vanderzwalmen, P. *et al.* In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. S215-S216. 2000.
- Whittingham D.G. *et al.* Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C . **Science**, v. 178, p. 411-414. 1972.
- Willadsen, S. *et al.* The viability of deep-frozen cow embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 391-393. 1978.
- Willadsen, S.M. *et al.* Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 151-154. 1976.
- Wilson, K.C. *et al.* Propylene glycol toxicity: a severe iatrogenic illness in ICU patients receiving IV benzodiazepines. **Chest**, v. 128(3), p. 1674-1681. 2005.
- Wilson, P.W. Explaining thermal hysteresis by the Kelvin effect. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 31–36. 1993.
- Woods, E.J. *et al.* Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48 (2), p. 146-156, 2004.
- Wusteman, M. *et al.* Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. **Cryobiology**, v. 56, p. 72-79. 2008.
- Yang, Z. *et al.* Computational study on the function of water within a β -helix antifreeze protein dimer and in the process of ice-protein binding. **Biophysical Journal**, v. 85.4, p. 2599-2605. 2003.
- Yavin, S. e Arav, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, v. 67, p.81-89, 2007.
- Yeh, Y. e Feeney, R.E. Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. **Chemical Reviews**, v. 96 (2), p. 601-618, 1996.
- Yih-Cherng, L. *et al.* A Complex Family of Highly Heterogeneous and Internally Repetitive Hyperactive Antifreeze Proteins from the Beetle *Tenebrio molitor*. **Biochemistry**, v. 38, p. 11415-11424. 1999.

Zampolla, T. *et al.* Effect of methanol and ME2 SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). **Cryobiology**, v. 59, p. 188-194. 2009.

Zech, N.H. *et al.* Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification. **Reproduction BioMedicine Online**, v. 11, p. 355–6. 2005.

Zhang, Y.Z. *et al.* Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. **Theriogenology**, v. 63, p. 763-773. 2005.

CAPÍTULO 2

Efeitos benéficos da proteína anticongelante de *Lolium perenne* (LpAFP) na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Artigo a ser submetido à *Theriogenology*

[Guia para autores](#)



Efeitos benéficos da proteína anticongelante de *Lolium perenne* (LpAFP) na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

*The beneficial effects of antifreeze protein from *Lolium perenne* (LpAFP) in the vitrification of in vitro-produced bovine embryos*

Rafael Artur da Silva Júnior^{a,*}, Raquel Desenzi Pessoa^a, Millena Mary da Silva Ramires^b, Andreia Fernandes de Souza^b, Mariana Aragão Matos Donato^c, Christina Alves Peixoto^d, Thiago Henrique do Nascimento^e, Andrea Pedrosa-Harand^e, Peter L Davies^f, Cláudio Coutinho Bartolomeu^a, André Mariano Batista^{a,*}

^a*Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

^c*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

^d*Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil; National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM, CNPq), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.*

^e*Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

^f*Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6*

***Corresponding author at:** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. *E-mails address:* andre.batista@ufrpe.br (André M. Batista); artur_rjs@hotmail.com (Rafael A. Silva Júnior)

Resumo

No presente estudo, foram avaliados os efeitos crioprotetores da proteína anticongelante da *Lolium perenne* (*LpAFP*) na vitrificação de embriões bovinos. Para isto, blastocistos produzidos *in vitro* (n=120) foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) sem adição de *LpAFP* e o Grupo Tratamento (GT) com adição de 500 ng/mL de *LpAFP* nos meios de equilíbrio e vitrificação; e vitrificados utilizando o *cryotop*. A vitrificação deu-se transferindo os blastocistos para a solução de equilíbrio: 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetil sulfóxido (DMSO) por 2 min, posteriormente para a solução de vitrificação: 15% EG, 15% dimetil sulfóxido (DMSO) e em seguida depositados na haste do *cryotop* e submersos em nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado em três etapas com concentrações de sacarose (1,0, 0,5 e 0,5 M de sacarose). Os embriões foram avaliados quanto à expansão/eclosão, contagem do número total de células e análise ultraestrutural. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa na taxa de reexpansão 24 horas após aquecimento, entretanto houve variação ($P < 0,05$) na taxa de eclosão no GT. O número total de células 24 horas após o aquecimento foi significativamente maior no GT quando comparado ao GC (GT $114,87 \pm 7,24$ vs. GC $91,81 \pm 4,94$). À análise ultraestrutural, foram observadas alterações em organelas referentes ao processo de vitrificação, contudo no GT houve menos danos às mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso quando comparado ao GC. Em conclusão, a adição de 500 ng/mL de *LpAFP* durante a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* se mostrou favorável na melhoria da sobrevivência e do desenvolvimento dos blastocistos após o aquecimento, além da mitigação de danos intracelulares.

Palavras-chave: Criopreservação; Blastocistos; FIV; Reprodução assistida; *Cryotop*.

Abstract

In the present study, the cryoprotective effects of *Lolium perenne* antifreeze protein (*LpAFP*) on the vitrification of bovine embryos were evaluated. For this, *in vitro* produced blastocysts (n=120) were divided into two groups: Control Group (CG) without addition of *LpAFP* and the Treatment Group (TG) with addition of 500 ng/mL of *LpAFP* in equilibrium and vitrification media; and vitrified using cryotop. Vitrification was carried out by transferring the blastocysts to the equilibrium solution: 7.5% ethylene glycol (EG) and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 min, then to the vitrification solution: 15% EG, 15 % dimethyl sulfoxide (DMSO) and then deposited on the cryotop rod and submerged in liquid nitrogen. Heating was carried out in three steps with sucrose concentrations (1.0, 0.5 and 0.5 M sucrose). Embryos were evaluated for expansion/hatching, total cell count and ultrastructural analysis. The results showed that there was no significant difference in the reexpansion rate 24 hours after heating, however there was variation ($P < 0.05$) in the hatching rate in the TG. The total number of cells 24 hours after heating was significantly higher in the TG when compared to the CG (TG 114.87 ± 7.24 vs. CG 91.81 ± 4.94). The ultrastructural analysis showed changes in organelles related to the vitrification process, however in TG there was less damage to mitochondria and rough endoplasmic reticulum when compared to CG. In conclusion, the addition of 500 ng/mL of *LpAFP* during the vitrification of *in vitro* produced bovine embryos was shown to be favorable in improving the survival and development of blastocysts after heating, in addition to mitigating intracellular damage.

Keywords: Cryopreservation; blastocysts; IVF; Assisted reproduction; cryotop.

1. Introdução

Em bovinos, as tecnologias de reprodução assistida (TRA), são amplamente utilizadas por empresas de pecuária para aumentar o progresso genético; reduzindo o intervalo de gerações e aumentando a intensidade da seleção. A criopreservação tem se tornado parte integral das TRA, por preservar os embriões de qualidade superior e permitir a disseminação de animais valiosos de alto mérito genético [1].

Entretanto, a criopreservação pode produzir lesões importantes em embriões, porque o choque térmico e osmótico, a formação de cristais de gelo ou a toxicidade do crioprotetor podem provocar consideráveis mudanças morfofuncionais [2]. De modo geral, esses efeitos reduziram as taxas de reexpansão e número total de células dos blastocistos e aumentaram as taxas de apoptose que levaram à diminuição na taxa de sobrevivência após o congelamento [2,3]. Neste contexto, a busca por novas alternativas para a melhoria deste processo permanece uma importante área de investigação.

As proteínas anticongelantes (AFPs) encontradas em diversos organismos que são expostos a ambientes subcongelantes em algum momento de suas histórias de vida [4], têm sido consideradas moléculas interessantes para serem incluídas em protocolos de criopreservação, devido à habilidade das AFPs em controlar o crescimento de cristais de gelo, e em particular, inibir a recristalização [5]. Estudos anteriores demonstraram os efeitos crioprotetores da AFPs na prevenção de criodanos durante a criopreservação de gametas e embriões [6-10].

No entanto, os benefícios do uso das AFPs são bastante variáveis, e o sucesso parece depender da espécie, tipo de célula ou estágio de desenvolvimento embrionário, tipo e concentração de AFP e também do protocolo de criopreservação utilizado [11]. Curiosamente, os ensaios realizados na criopreservação de embriões utilizaram AFPs de origem de peixes (principalmente AFPI, AFPIII e AFGP).

A *Lolium perene* (*Lp*), é uma gramínea forrageira tolerante ao congelamento, cultivada em todo o mundo, que prospera em ambientes frios [12]. Tem sido sugerido que a *Lp*, utiliza sua proteína anticongelante (*LpAFP*), como estratégia de tolerância ao congelamento, por meio da inibição da recristalização do gelo [13,14]. Contudo, relatos sobre a aplicação de *LpAFP* na crioproteção de embriões produzidos *in vitro* são ausentes. Com base no mencionado acima, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos crioprotetores de *LpAFP* na vitrificação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

2. Materiais e métodos

Declaração ética: Os ovários utilizados neste estudo foram obtidos de abatedouro comercial de animais que foram abatidos seguindo as diretrizes internacionais para a produção de carne para consumo humano. Portanto, a aprovação ética não foi necessária.

2.1 Coleta de oócitos e maturação in vitro (MIV)

Ovários bovinos foram coletados de abatedouros locais e transportados ao laboratório à 38 °C em solução salina (NaCl 0,9%) suplementada com antibiótico/antimicótico (Ab/Am; 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram aspirados de folículos medindo entre 4 e 8 mm de diâmetro utilizando agulha 18g acoplada a seringa de 10 mL contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS) à 38 °C. Apenas oócitos com citoplasma uniforme e três ou mais camadas de células do cumulus compactas foram selecionados e lavados três vezes em meio de cultura de tecido (TCM199/HEPES; Gibco, Life Technologies), contendo gentamicina (10 mg/mL; Gibco, Life Technologies) (Meio de lavagem). Grupos

de 20 CCOs foram maturados em gotas de 100 µL de meio de maturação comercial pré-equilibrado (MIV; GeneUp Biotecnologia, Regente Feijó, São Paulo, Brasil), em placas de petri de 35 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), cobertos com óleo mineral à 38,5 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 horas.

2.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Após o período de maturação, CCOs foram recuperados, lavados em meio de lavagem e transferidos para gotas de 100 µL de meio de fertilização comercial pré-equilibrado (FIV; GeneUp Biotecnologia). Sêmen congelado de um touro provado foi utilizado para obter espermatozoides móveis, após o aquecimento, durante todo o experimento. Para a capacitação espermática, após centrifugação por 5 min a 5.500 X g em gradiente de densidade descontínuo (45%/90%) de Percoll[®] (Pharmacia, Uppsala, Sweden), a fração espermática resultante foi ressuspensa em 1 mL de meio FIV e foi novamente peletizado por centrifugação por 3 min a 70 X g. Os espermatozoides foram então contados em câmara de Neubauer e diluídos em volume adequado de meio FIV e adicionados em cada gota de fertilização na concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os gametas foram co-incubados por 18 horas à 38,5 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

2.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Ao final do período de fertilização os prováveis zigotos foram completamente desnudados através de cuidadosas pipetagens e lavados em meio de cultura comercial pré-equilibrado (Fluido de Oviduto Sintético - SOF; GeneUp Biotecnologia). Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 100 µL de meio SOF pré-equilibrado cobertas com óleo mineral à 38,5 °C em atmosfera úmida com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ por sete dias.

2.4 Vitrificação e aquecimento dos embriões

Os blastocistos foram submetidos ao procedimento de vitrificação em duas etapas utilizando *cryotop* (Kitazato Corp., Shizuoka, Japão), suplementadas ou não com *LpAFP* durante todo o procedimento de vitrificação (Fig. 1), sendo o Grupo controle (GC) sem suplementação e o Grupo tratamento (GT) com suplementação. Embriões que não passaram pelo processo de vitrificação também foram utilizados como controle fresco para avaliação ultraestrutural. Para determinar uma concentração ideal da *LpAFP*, testamos o efeito dose dependente da *LpAFP* em um estudo preliminar, no qual a maior taxa de sobrevivência foi observada à 500 ng/mL *LpAFP*, quando comparada à concentração de 1.000 ng/mL. A *LpAFP* foi gentilmente cedida pelo Dr. P. Davies [13].

O meio de manutenção (MM) utilizado para formular todas as soluções de vitrificação/aquecimento, consistiu em TCM199/HEPES suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Todos os procedimentos foram realizados sob capela de fluxo laminar usando superfície aquecida a 38,5 °C e um estereomicroscópio para visualização de cada etapa.

Grupos de cinco a oito embriões foram transferidos para solução de equilíbrio (SE), contendo 7,5% (v/v) etilenoglicol (EG; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) + 7,5% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma), em MM por 2 minutos, em seguida os embriões foram então transferidos para solução de vitrificação (SV), consistindo de 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO e 0,5 M de sacarose dissolvida em MM. Durante a última etapa, os embriões foram colocados em gota de 1 µL e depositados no *cryotop*. Então, quase toda a solução foi removida para deixar apenas uma fina camada cobrindo os blastocistos e, em seguida, os *cryotops* foram rapidamente mergulhados em nitrogênio líquido (N₂), posteriormente a capa protetora foi acoplada ao *cryotop* e então armazenados em containers de N₂. Todo o processo, desde a imersão na solução de vitrificação até a imersão em nitrogênio

líquido, levou menos de 1 minuto. Os embriões foram armazenados em nitrogênio líquido até o descongelamento para os experimentos.

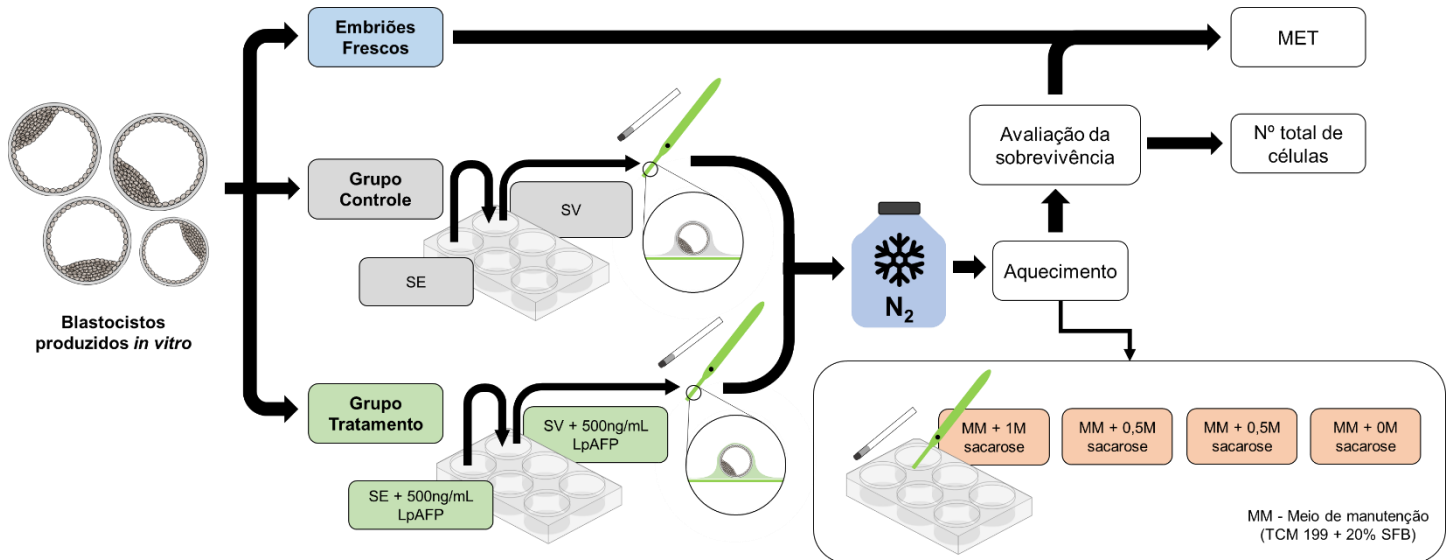


Figura 1. Desenho experimental. Blastocistos produzidos *in vitro*, foram agrupados e distribuídos aleatoriamente entre dois grupos. A vitrificação foi realizada em meios suplementados ou não com proteína anticongelante de *Lolium perene* (0 ou 500 ng/mL de *LpAFP*). SE - Solução de estabilização; SV - Solução de vitrificação; N₂ - Nitrogênio líquido; MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão; MM – Meio de manutenção.

Para o aquecimento, as capas protetoras foram removidas enquanto ainda submersas em N₂ e os *cryotops* foram diretamente imersos em solução de aquecimento contendo 1M de sacarose em MM por 1 minuto e então transferidos sequencialmente para as soluções 2 e 3 que consistiam em MM suplementado com 0,5M de sacarose por 1 e 5 minutos, respectivamente. Após a lavagem final em MM por 1 minuto os blastocistos foram transferidos para o meio de cultura (SOF) e incubados a 38,5 °C em 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ em umidade máxima por 24h.

2.5 Avaliação da sobrevivência dos embriões

Para avaliar a sobrevivência dos embriões aquecidos, cada blastocisto foi examinado após 24 horas de cultivo e classificado com base em se o restabelecimento da

blastocite tinha ocorrido (sim/não) e se o embrião havia eclodido ou estava eclodindo (sim/não).

Para a estimativa do número de células, blastocistos expandidos e eclodidos que sobreviveram à vitrificação em cada grupo, foram lavados em PBS suplementado com 1 mg/mL de polivinilpirrolidona (PBS/PVP), antes de serem fixados durante 30 min em paraformaldeído 4% em PBS à temperatura ambiente. Os embriões fixados foram lavados três vezes em PBS/PVP, e em seguida permeabilizados em 0,5% de Triton X-100, contendo 0,1% de citrato de sódio em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Após a permeabilização, os embriões foram lavados em PBS/PVP e incubados em microgotas de 25 µL de Hoechst 33342 (1 µg/mL) por 15 min no escuro. Os embriões foram lavados três vezes em PBS/PVP para remover o excesso Hoechst 33342 e montados em lâminas revestidas com poli-L-lisina com meio de montagem ProLong[®] Golg (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA), cobertos por lamínulas suportadas por colunas de parafina e seladas com verniz para unhas.

Os núcleos marcados com Hoechst foram contabilizados usando um microscópio de fluorescência Leica DM 5500B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram registradas usando câmera digital Leica DFC345 FX e software LAS AF versão 2.5. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ v.1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, Rockville, MD, EUA).

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para melhor investigar a morfologia celular e organização das organelas no citoplasma de embriões, foi realizada microscopia eletrônica de transmissão nos blastócitos reaquecidos e cultivados por 24 horas além do grupo de embriões frescos que não foi submetido à vitrificação. Apenas embriões de grau 1 foram utilizados [15]. Os embriões isolados (n = 15 por grupo) foram fixados em solução de Karnovsky (4%

paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por pelo menos 4 h em temperatura ambiente (~25°C). Após a fixação, os embriões foram incluídos em gotas de agarose de baixo ponto de fusão a 4% e mantidos em tampão cacodilato de sódio. Os espécimes foram fixados em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h em temperatura ambiente, lavados em tampão cacodilato de sódio e corados com acetato de uranila 5%. As amostras foram então desidratadas através de um gradiente de soluções de acetona e em seguida embebidas em resina epóxi (EpoxyEmbedding Kit, Fluka Chemika). Em seguida, cortes semifinos (2 µm) foram cortados, corados com azul de toluidina e analisados em microscopia de luz com aumento de 400 ×. Posteriormente, cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos dos blastocistos bovinos. Os cortes ultrafinos foram contracorados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Morgani-FEI [16].

2.6 Análise estatística

Blastocistos foram vitrificados/aquecidos em total de 05 repetições. Para avaliação da taxa de reexpansão e eclosão, os dados foram testados quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Shapiro Wilk. Em seguida foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos. Para a análise da contagem do número total de células, após o teste de normalidade, os dados foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, sendo os dados expressos como média ± erro padrão. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism (Ver 7.02 para Windows; GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA). $P < 0,05$ foi definido como nível de significância. Os resultados da microscopia eletrônica são baseados em análises qualitativas, portanto não foram avaliados de forma estatística.

3. Resultados

Micrografias em estereomicroscópio representativas da sobrevivência (reexpansão ou eclosão) de cada grupo estão apresentadas na Figura 2. As taxas de reexpansão e eclosão após aquecimento de blastocistos vitrificados/aquecidos em meios suplementados ou não com *LpAFP*, estão apresentadas na Tabela 1. Às 24 h após o aquecimento, não foram observadas diferenças nas taxas de reexpansão entre os grupos (GC 61,36% vs. GT 60,87%) ($P > 0,05$). No entanto, quando as taxas de eclosão foram avaliadas, a suplementação com *LpAFP* produziu porcentagens de eclodibilidade maiores (GC 18,18% vs. GT 28,26%) ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Tab. 1).

Os resultados do número de células totais 24 horas após o aquecimento de blastocistos expandidos e eclodidos que sobreviveram à vitrificação/aquecimento em meio suplementado ou não com *LpAFP* (Figura 3), são apresentados na Tabela 1. Os blastocistos expandidos e eclodidos que sobreviveram à vitrificação/aquecimento em meio suplementado com *LpAFP* tiveram números de células maiores ($P = 0,01$), do que aqueles do grupo sem suplementação (GC $91,81 \pm 4,94$ vs. GT $114,87 \pm 7,24$; Tabela 1).

Imagens de microscopia eletrônica revelaram em todos os embriões analisados, frescos e vitrificados com ou sem *LpAFP*, células achadas com núcleos proeminentes além de microvilosidades e junções celulares bem visíveis. Nos embriões frescos foram observados eventuais complexos de golgi bem evidenciados. Nos embriões do grupo controle, devido ao processo de vitrificação, foi possível visualizar algumas alterações citoplasmáticas como desorganização intracelular, dilatação do retículo endoplasmático rugoso e alterações do complexo de golgi. No grupo tratamento, foram observadas algumas mitocôndrias com dilatações nas cristas (Figura 4).

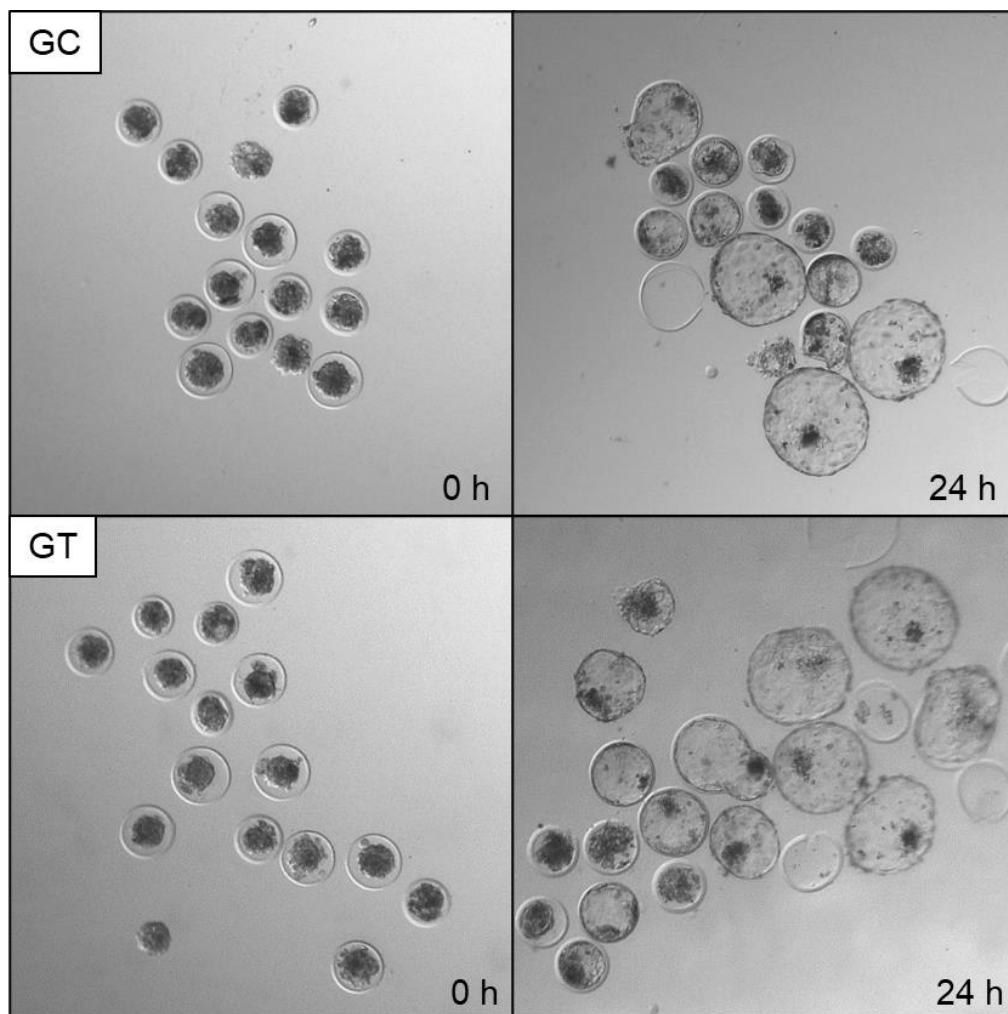


Figura 2. Micrografias em estereomicroscópio representativas da sobrevivência (reexpansão e eclosão) após aquecimento. CG – Grupo Controle; GT – Grupo tratamento.

Tabela 1. Efeito da suplementação de *LpAFP* na sobrevivência, expansão/eclosão e número total de células de embriões vitrificados e aquecidos.

	Grupo Controle	Grupo Tratamento	
Sobrevivência	61,36% (27/44)	60,87% (28/46)	
Reexpansão	43,18% (19/44)	32,61% (15/46)	
Eclosão	18,18% (8/44) ^b	28,26% (13/46) ^a	P < 0,05
Número de células totais	91,81 ± 4,94 ^b	114,87 ± 7,24 ^a	P = 0,01

Dados são apresentados como percentual de blastócitos que reestabeleceram a blastocel e média ± erro padrão. ^{a,b} Valores na mesma linha com diferentes sobrescritos indica diferenças significativas entre os grupos (P = 0,01). Grupo Controle: blastocistos vitrificados/aquecidos sem suplementação de *LpAFP*; Grupo tratamento: blastocistos vitrificados/aquecidos com suplementação de 500 ng/mL *LpAFP*.

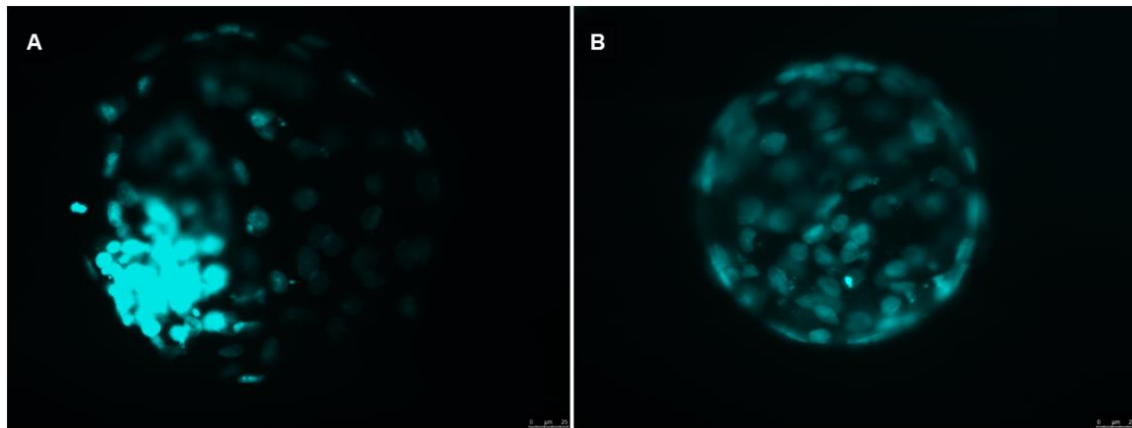


Figura 3. Blastocistos após aquecimento vitrificados em meios suplementados ou não com *LpAFP* (500 ng/mL) corados com Hoechst 33342 para contagem do número total de células. (A) grupo controle; (B) Grupo tratamento. Diferenças entre tratamentos ($P = 0,01$).

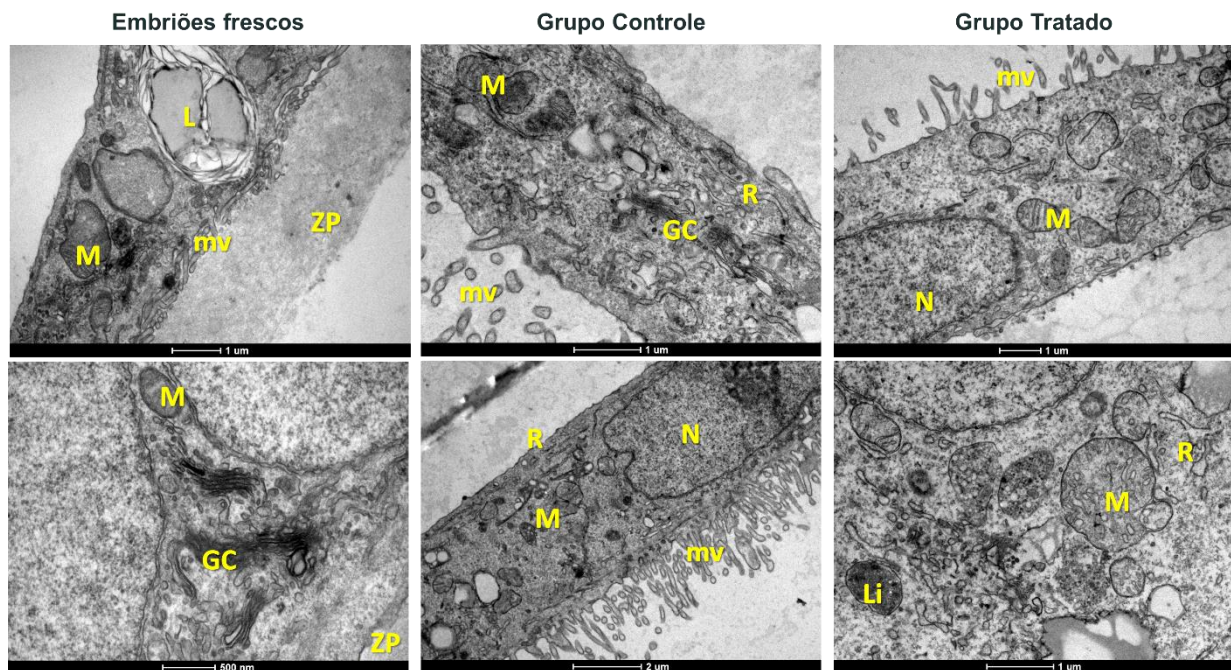


Figura 4. Microscopia ultraestrutural de embriões bovinos produzidos *in vitro*, frescos e vitrificados com ou sem suplementação de 500 ng/mL de *LpAFP*. N – Núcleo; M – Mitocôndria; ZP – Zona Pelúcida; mv – Microvilosidades; L – gotícula lipídica; GC – Complexo de Golgi; R – Reticulo; Li – Lisossomos.

4. Discussão

A criopreservação de embriões bovinos é um componente importante quando se trata da adoção e uso da produção *in vitro* de embriões. No presente estudo, blastocistos

bovinos, produzidos *in vitro* foram vitrificados através do método *cryotop*, em meios suplementados com 500 ng/mL *LpAFP*, para avaliar o efeito crioprotetor da AFP.

Os resultados do presente estudo, demonstraram que o percentual de blastocistos eclodidos, 24 horas após o aquecimento, foram significativamente maiores no grupo suplementado com *LpAFP*, em comparação ao grupo controle. Além disso, os blastocistos sobreviventes do grupo *LpAFP* apresentaram contagem do número de células totais por blastocistos, significativamente maior quando comparado aos blastocistos do grupo controle. Em estudo publicado recentemente, Valente et al. [17] demonstraram que embriões bovinos apresentando maior número total de células, apresentam maiores taxas de reexpansão e eclosão após a vitrificação quando comparadas aos embriões não resistentes à criopreservação.

À avaliação ultraestrutural dos embriões vitrificados com ou sem suplementação de *LpAFP* revelou sinais de lesões osmóticas, que provocaram desorganização intracelular. No grupo controle foi possível visualizar dilatação do retículo endoplasmático rugoso, alterações no complexo de golgi e dilatações nas cristas mitocondriais. Lesões semelhantes foram observadas em embriões bovinos, ovinos, suínos e leporinos vitrificados [18-21]. Ohboshi et al. [22] sugeriram que a distensão do retículo endoplasmático rugoso e alterações nas cristas mitocondriais diminuem as taxas de sobrevivência de embriões bovinos vitrificados.

Por outro lado, a adição de 500 ng/mL de *LpAFP*, parece ter mitigado os efeitos causados pelo processo de vitrificação, como observado pela menor proporção de mitocôndrias com cristas dilatadas e ausência de lesões no retículo endoplasmático rugoso, sugerindo o efeito crioprotetor da *LpAFP* ao diminuir estas alterações citoplasmáticas. As evidências apresentadas neste estudo, indicam que a adição de *LpAFP* durante o

processo de vitrificação pode ter efeito positivo nos embriões vitrificados/aquecidos, permitindo-os superar os danos criogênicos.

Criodanos, como danos mecânicos e/ou osmóticos causados pela formação de cristais de gelo, podem induzir consideráveis mudanças morfofuncionais nas células [2]. Acredita-se que a recristalização do gelo, que é um processo no qual cristais de gelo menores crescem gradualmente em temperaturas abaixo de zero, seja a principal causa de danos e diminuição da viabilidade celular associada ao processo de criopreservação [23]. Assim, proteínas e outros compostos que inibem o processo de recristalização de gelo, são necessários para evitar danos celulares durante a criopreservação.

A capacidade das AFPs de inibir ou impedir que a recristalização ocorra tem tornado estas moléculas interessantes para uso em protocolos de criopreservação de oócitos e embriões [24], entretanto, os resultados são variados. Em estudo prévio, o qual compararam diferentes tipos de AFPs, ficou claramente demonstrado que as AFPs com maior atividade de inibição da recristalização, apresentaram melhores resultados no procedimento de vitrificação/aquecimento [25]. Sun et al. [26] demonstraram que a adição da proteína de ligação ao gelo do *Leucosporidium* (*LeIBP*), proteína com atividade de inibição da recristalização, melhorou o potencial de desenvolvimento e suprimiu a apoptose de embriões derivados de oócitos bovino vitrificados/aquecido.

Tem sido reportado que a *LpAFP* demonstrou atividade superior de inibição de recristalização de gelo quando comparado com AFPs de peixes e inseto [12-14]. Em adição, Capicciotti et al. [27] relataram a habilidade da proteína mutante T67Y *LpAFP*, em proteger uma linhagem de células de fígado humano (HepG2) contra crioinjúrias, resultando no aumento da viabilidade das células HepG2 após a criopreservação. Portanto, podemos sugerir que o mecanismo crioprotetor do tratamento com *LpAFP*

durante a vitrificação de embriões bovinos, como demonstrado no presente estudo, está relacionado à atividade de inibição da recristalização.

Em conclusão, a suplementação da *LpAFP* durante a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mostrou-se benéfica por melhorar a sobrevivência e o desenvolvimento, além de mitigar lesões citoplasmáticas de embriões pós-aquecimento *in vitro*. Pesquisas futuras são necessárias para entender se esses resultados se traduzem em melhores resultados de prenhez para embriões PIV vitrificados.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brasil.

Interesses competitivos

Os autores declaram que não há conflito de interesse que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Referências

[1] Ferré LB, Kjelland ME, Taiyeb AM, Campos-Chillon F, Ross PJ. Recent progress in bovine *in vitro*-derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod Dom Anim.* 2020;55:659–676. doi.org/10.1111/rda.13667.

- [2] Valente RS, Marsico TV, Sudano MJ. Basic and applied features in the cryopreservation progress of bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2022;239:106970. doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.106970.
- [3] Arshad U, Sagheer M, González-Silvestry FB, Hassan M, Sosa F. Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology.* 2021;101:1-11. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.06.007.
- [4] Davies PL, Graham LA. Protein evolution revisited. *Syst Biol Reprod Med.* 2018;64(6):403-416. doi.org/10.1080/19396368.2018.1511764.
- [5] Robles V, Valcarce DG, Riesco MF. The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Biomolecules.* 2019;9(5):181. doi.org/10.3390/biom9050181.
- [6] Baguisi A, Arav A, Crosby TF, Roche JF, Boland MP. Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: development in vitro and in vivo. *Theriogenology.* 1997;48(6):1017-1024. doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00328-2.
- [7] Lagneaux D, Huhtinen M, Koskinen E, Palmer E. Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining. *Equine Vet J Suppl.* 1997;25:85-87. doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05108.x.
- [8] Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Nakamura Y, Hayama K, Shirasawa A, Sakaguchi K, Tominaga N, Nishimiya Y, Tsuda S. Prolonging hypothermic storage (4 C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. *J Reprod Dev.* 2015;61(1):1-6. doi.org/10.1262/jrd.2014-073.
- [9] Chaves DF, Campelo IS, Silva MMAS, Bhat MH, Teixeira DIA, Melo LM, Souza-Fabjan JMG, Mermillod P, Freitas VJF. The use of antifreeze protein type III for

vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 2016;73(3):324-328. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.10.003.

[10] Liang S, Yuan B, Jin YX, Zhang JB, Bang JK, Kim NH. Effects of antifreeze glycoprotein 8 (AFGP8) supplementation during vitrification on the in vitro developmental capacity of expanded bovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(11):2140-2148. doi.org/10.1071/RD16426.

[11] Correia LFL, Alves BRC, Batista RITP, Mermillod P, Souza-Fabjan JMG. Antifreeze proteins for low-temperature preservation in reproductive medicine: A systematic review over the last three decades. *Theriogenology*. 2021;176:94-103. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.025.

[12] Sandve SR, Kosmala A, Rudi H, Fjellheim S, Rapacz M, Yamada T, Rognli OA. Molecular mechanisms underlying frost tolerance in perennial grasses adapted to cold climates. *Plant Sci*. 2011;180(1):69-77. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.07.011.

[13] Lauersen KJ, Brown A, Middleton A, Davies PL, Walker VK. Expression and characterization of an antifreeze protein from the perennial rye grass, *Lolium perenne*. *Cryobiology*. 2011;62(3):194-201. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.03.003.

[14] Middleton AJ, Marshall CB, Faucher F, Bar-Dolev M, Braslavsky I, Campbell RL, Walker VK, Davies PL. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *J Mol Biol*. 2012;416(5):713-724. doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.032.

[15] Bó GA, Mapletoft, RJ. Evaluation and classification of bovine embryo. *Animal Reprod*. 2013;10(3):344-348.

[16] Barroso PAA, Paulino LRFM, Silva BR, Vasconcelos GL, Gomes DS, Lima Neto MF, Silva AWB, Souza ALP, Donato MAM, Peixoto CA, Silva JRV. Effects of

dexamethasone on growth, viability and ultrastructure of bovine secondary follicles cultured in vitro. *Zygote*. 2020;28(6):504-510. doi.org/10.1017/S0967199420000416

[17] Valente RS, Almeida TG, Alves MF, Paschoal DM, Basso AC, Sudano MJ. Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development. *Theriogenology*. 2020;158:290-296. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.026.

[18] Darvelid U, Gustafsson H, Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez Martinez H. Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine in vitro and in vivo developed embryos. *Acta Vet Scand*. 1994;35(4):417-426. doi.org/10.1186/BF03548317

[19] Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BD, Neves JP, Lucci CM. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*. 2013;67(2):137-145. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.012

[20] Fabian D, Gjørret JO, Berthelot F, Martinat-Botté F, Maddox-Hyttel P. Ultrastructure and cell death of in vivo derived and vitrified porcine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2005;70(2):155-165. doi.org/10.1002/mrd.20129

[21] Chrenek P, Makarevich AV, Popelková M, et al. Ultrastructure of vitrified rabbit transgenic embryos. *Zygote*. 2014;22(4):558-564. doi.org/10.1017/S0967199413000282

[22] Ohboshi S, Fujihara N, Yoshida T, Tomagane H. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote*. 1998;6(1):17-26. doi.org/10.1017/s0967199400005049

[23] Do VH, Catt S, Kinder JE, Walton S, Taylor-Robinson AW. Vitrification of in vitro-derived bovine embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardising procedures. *Reprod Fertil Dev*. 2019;31(5):837-846. doi.org/10.1071/RD18352.

- [24] Ekpo MD, Xie J, Hu Y, Liu X, Liu F, Xiang J, Zhao R, Wang B, Tan S. Antifreeze Proteins: Novel Applications and Navigation towards Their Clinical Application in Cryobanking. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2639. doi.org/10.3390/ijms23052639.
- [25] Lee HH, Lee HJ, Kim HJ, Lee JH, Ko Y, Kim SM, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. *Hum Reprod.* 2015;30(9):2110-2119. doi.org/10.1093/humrep/dev170.
- [26] Sun WS, Jang H, Kwon HJ, Kim KY, Ahn SB, Hwang S, Lee SG, Lee JH, Hwang IS, Lee JW. The protective effect of *Leucosporidium*-derived ice-binding protein (LeIBP) on bovine oocytes and embryos during vitrification. *Theriogenology.* 2020;151:137-143. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.016.
- [27] Capicciotti CJ, Poisson JS, Boddy CN, Ben RN. Modulation of antifreeze activity and the effect upon post-thaw HepG2 cell viability after cryopreservation. *Cryobiology.* 2015;70(2):79-89. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.002.

CAPÍTULO 3

Utilização da proteína anticongelante de *Tenebrio molitor* (TmAFP) para vitrificação de embriões produzidos bovinos *in vitro*: Estudo ultraestrutural

Artigo a ser submetido à *Cryobiology*

[Guia para autores](#)



Utilização da proteína anticongelante de *Tenebrio molitor* (TmAFP) para vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: Estudo ultraestrutural

*The use of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* (TmAFP) for vitrification of *in vitro* -produced bovine embryos: An ultrastructural study*

Rafael Artur da Silva Júnior^{a,*}, Raquel Desenzi Pessoa^a, Millena Mary da Silva Ramires^b,
Andreia Fernandes de Souza^b, Mariana Aragão Matos Donato^c, Christina Alves Peixoto^d,
Peter L Davies^e, Cláudio Coutinho Bartolomeu^a, André Mariano Batista^{a,*}

^a*Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

^c*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil*

^d*Laboratory of Ultrastructure, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Recife, PE, Brazil; National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM, CNPq), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.*

^e*Department of Biochemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6*

***Corresponding author at:** Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. *E-mails address:* andre.batista@ufrpe.br (André M. Batista); artur_rjs@hotmail.com (Rafael A. Silva Júnior)

Resumo

Objetivou-se avaliar efeitos de diferentes concentrações da AFP extraída da larva do besouro *Tenebrio molitor* (*TmAFP*) na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os blastocistos produzidos *in vitro* foram divididos em três grupos experimentais e vitrificados utilizando o *cryotop*. A *TmAFP* foi adicionada nas soluções de equilíbrio (SE) e vitrificação (SV), na concentração de 0 ng/ml (controle), 500 ng/ml (500*TmAFP*) ou 1.000 ng/ml (1000*TmAFP*). A vitrificação se deu depositando os blastocistos na SE por 2 min (7,5% de EG; 7,5% DMSO), em seguida transferidos para a SV (15% EG; 15% DMSO) e prontamente depositados na haste do *cryotop* e submersos em nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado em três etapas com concentrações decrescentes de sacarose. Após o aquecimento os blastócitos foram cultivados por 24 horas para posterior análise da sobrevivência e avaliação ultraestrutural. Os resultados mostraram que houve diferença significativa na taxa de sobrevivência e expansão no grupo 500*TmAFP* quando comparado aos demais grupos. À análise ultraestrutural foram observadas lesões intracelulares em todos os embriões vitrificados, entretanto os embriões dos grupos 500*TmAFP* e 1000*TmAFP* apresentaram menos lesões citoplasmáticas quando comparadas ao grupo controle. Conclui-se que a adição de *TmAFP* pode mitigar as alterações celulares, as quais envolvem organelas e componentes celulares essenciais para o funcionamento adequado e viabilidade pós aquecimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados.

Palavras chave: Criopreservação; *cryotop*; corpos multivesicular; mitocôndrias; reprodução assistida; PIVE.

Abstract

The objective was to evaluate the effects of different concentrations of AFP extracted from the larva of the beetle *Tenebrio molitor* (*TmAFP*) on the vitrification of bovine embryos produced in vitro. In vitro produced blastocysts were divided into three experimental groups and vitrified using cryotop. *TmAFP* was added to equilibrium (SE) and vitrification (SV) solutions, at a concentration of 0 ng/mL (control), 500 ng/mL (500*TmAFP*) or 1000 ng/mL (1000*TmAFP*). Vitrification was carried out by depositing the blastocysts in the SE for 2 min (7.5% EG; 7.5% DMSO), then transferred to the SV (15% EG; 15% DMSO) and promptly deposited on the cryotop stem and submerged in liquid nitrogen. Heating was carried out in three steps with decreasing concentrations of sucrose. After heating, the blast cells were cultured for 24 hours for subsequent survival analysis and ultrastructural evaluation. The results showed that there was a significant difference in the survival rate and expansion in the 500*TmAFP* group when compared to the other groups. In the ultrastructural analysis, intracellular lesions were observed in all vitrified embryos, however the embryos of the 500*TmAFP* and 1000*TmAFP* groups showed less cytoplasmic lesions when compared to the control group. It is concluded that the addition of *TmAFP* can mitigate cellular changes, which involve organelles and cellular components essential for the proper functioning and viability after heating of vitrified in vitro produced bovine embryos.

Keywords: Cryopreservation; cryotop; multivesicular bodies; mitochondria; assisted reproduction; IVP.

1. Introdução

Atualmente, há uma demanda crescente por protocolos eficientes de criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) e tecnologias associadas em bovinos, para fins comerciais e de pesquisa [1]. A vitrificação é hoje, a técnica mais amplamente usada para a criopreservação de embriões PIV, devido à sua simplicidade e altas taxas de viabilidade e desenvolvimento de blastocistos [2], pois evita a formação de cristais de gelo por meio de exposições curtas a altas concentrações de crioprotetores e rápida submersão em nitrogênio líquido [3].

Apesar dos resultados positivos, os pesquisadores ainda estão preocupados em otimizar a viabilidade e as funcionalidades celular para prevenir resultados clínicos ruins e falhas reprodutivas [5-8]. Os aspectos tecnológicos da vitrificação, protocolos de vitrificação e os tipos de agentes crioprotetores (ACPs) são considerados por desempenhar papel vital nas taxas de sobrevivência após descongelação [2]. Portanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar e padronizar os procedimentos de vitrificação para que taxas satisfatórias de sobrevivência e prenhez possam ser alcançadas após a criopreservação de embriões.

Neste cenário, diferentes tentativas têm sido realizadas para melhorar os atuais protocolos de criopreservação, incluindo a suplementação com proteínas anticongelantes (AFPs) [9,10]. As AFPs são encontradas em fungos, bactérias, peixes polares e algumas espécies de insetos e plantas adaptados a ambientes frios [11], e podem proteger os organismos do congelamento ligando-se ao gelo e inibindo a cristalização adicional. A capacidade das AFPs de controlar o crescimento do gelo e, em particular, para inibir a recristalização do gelo nos materiais congelados, tem levado a muitas aplicações experimentais das AFPs em criobiologia [12].

Em embriões bovinos, a adição de AFP no meio (10 mg/mL), combinando com um pré-aquecimento controlado, promoveu melhorias no armazenamento de curto prazo de embriões bovinos a 4 °C [13]. Além disso, a suplementação com AFGP8 durante a vitrificação parece ter efeito protetor contra a lesão induzida pelo frio em blastocistos bovinos [14].

A caracterização de uma variedade de AFPs hiperativas em insetos [15], tem estimulado ideias para suas aplicações em criobiologia. Tem sido relatado que a AFP derivada das larvas do besouro *Tenebrio molitor* (*TmAFP*), expressa maior atividade de histerese térmica do que as de peixes [16], o que a torna um reagente atraente para aplicações que exigem resistência ao congelamento ou controle do crescimento e morfologia do gelo. Existem relatos sobre a aplicação de *TmAFP* na crioproteção de órgãos [17] e alimentos congelados [18], embora pesquisas sobre a tolerância à baixa temperatura de embriões produzidos *in vitro* na presença de *TmAFP* sejam ausentes.

A avaliação por microscopia óptica da viabilidade de embriões pós-descongelação parece ser inconclusiva. Embriões que parecem morfologicamente bons após a descongelação, algumas vezes falham em produzir prenhez quando transferidos [19]. Portanto, este estudo investigou os efeitos de diferentes concentrações de *TmAFP* na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, analisando as taxas de sobrevivência e a ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

2. Material e Métodos

Declaração ética: Os ovários utilizados neste estudo foram obtidos de abatedouro comercial de animais que foram abatidos seguindo as diretrizes internacionais para a produção de carne para consumo humano. Portanto, a aprovação ética não foi necessária.

2.1 Produção *in vitro* de embriões

Os ovários foram recuperados de vacas recém-abatidas de abatedouros locais. Os ovários foram transportados a 38 °C em 0,9% (p/v) de NaCl suplementado com 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Uma vez no laboratório, ovários sem estruturas císticas ou folículos > 10 mm de diâmetro foram selecionados para coleta e lavados várias vezes para remover o excesso de sangue. As etapas subsequentes foram todas realizadas com soluções e meios que foram pré-aquecidos a 38,5 °C.

Todos os folículos visíveis com 4-8 mm de diâmetro foram aspirados utilizando agulha 18g acoplada a seringa de 10 mL contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS). O fluido contendo complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foi filtrado através de um mini filtro para oócitos com malha de 100 µm (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Os CCOs retidos na peneira foram lavados em placa de Petri de 100 mm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) usando 20 mL de meio de cultura de tecido (TCM199/HEPES; Gibco, Life Technologies), contendo gentamicina (10 mg/mL; Gibco, Life Technologies), e agulha 18g acoplada a seringa de 10 mL. O conteúdo da placa foi pesquisado usando estereomicroscópio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e os CCOs foram removidos usando uma pipeta *stripper* (Origio, Charlottesville, VA, USA).

Aqueles CCOs com citoplasma uniformemente granulado e três ou mais camadas de células do *cumulus* foram selecionados para maturação *in vitro*. Grupos de 20 CCOs foram maturados em incubadora, em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 38,5 °C em gotas de 100 µL de meio de maturação comercial pré-equilibrado (MIV; GeneUp Biotecnologia, Regente Feijó, São Paulo, Brasil), coberto com óleo mineral por 22-24 h.

A fertilização foi realizada com sêmen congelado de um touro provado. O sêmen foi descongelado a 37 °C por 30 s e os espermatozoides foram selecionados através de gradientes descontínuo de Percoll (45-90%). Resumidamente, o sêmen foi suavemente colocado sobre duas camadas (250 µL cada) de solução de Percoll 90% (inferior) e 45% (topo), em tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL. O sêmen foi centrifugado pela primeira vez a $5.500 \times g$ por 5 min. Em seguida, o *pellet* resultante no fundo do tubo foi colocado em 1 mL de meio de fertilização comercial pré-equilibrado (FIV; GeneUp Biotecnologia), em *ependorf* de 1,5 mL e uma segunda centrifugação a $70 \times g$ por 3 min foi realizada. Os espermatozoides foram ressuspensos em meio FIV anteriormente equilibrado em incubadora em atmosfera umidificada de 5% CO₂ a 38,5 °C e a concentração de espermatozoides ajustada para que a concentração final na gota de fertilização fosse 1×10^6 /mL. Para a fertilização, os CCOs maturados foram lavados 3 vezes com meio FIV pré-equilibrado e até 25 CCOs maturados foram transferidos para placa de fertilização. Os gametas foram co-incubados em atmosfera úmida de 5% CO₂ a 38,5 °C por 18 h.

Após a fertilização, as células do *cumulus* foram removidas dos presumíveis zigotos através de cuidadosas pipetagens. Os supostos zigotos foram transferidos em grupos de 30 para gotas de 100 µL de meio de cultura comercial pré-equilibrado (Fluido de Oviduto Sintético - SOF; GeneUp Biotecnologia), coberto com óleo mineral. Os embriões foram cultivados por 7 dias em atmosfera umidificada de 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ a 38,5 °C.

2.2 Vitriificação

As etapas de incubação para vitriificação foram realizadas em placas de 4 poços (Nunc, Roskilde, Denmark). Todos os blastocistos foram colocados em 800 µL de meio de manutenção (MM) no primeiro poço. O MM consistia em solução de TCM199/HEPES suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Life Technologies, Grand

Island, NY, USA). Os embriões foram então transferidos para o segundo poço contendo 800 µL MM e mantidos até o futuro processamento. Em particular, grupos de 4-5 blastocistos foram colocados no terceiro poço contendo 1000 µL de solução de equilíbrio (SE) que consistia em MM contendo 7,5% (v/v) etilenoglicol (EG; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e 7,5% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma). Após 2 minutos, os blastocistos foram colhidos no menor volume e transferidos para solução de vitrificação (SV), consistindo de 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO e 0,5 M de sacarose dissolvida em MM. Blastocistos foram aspirados e expelidos várias vezes para assegurar a mistura completa à SV. A pipeta *stripper* foi usada para carregar os 4 a 5 blastocistos sobre fina tira de polipropileno do *cryotop* (Kitazato Corp., Shizuoka, Japão), seguido pela aspiração do excesso de meio. O *cryotop* com embriões foi então rapidamente imerso em nitrogênio líquido (NL) e a capa protetora foi colocada sobre a tira para proporcionar proteção durante o armazenamento em containers de NL. Todo o processo, desde a imersão na solução de vitrificação até a imersão em nitrogênio líquido, levou menos de 1 minuto. Os blastocistos foram armazenados em nitrogênio líquido até o descongelamento para análises.

2.3 Aquecimento e posterior cultura de blastocistos vitrificados

Para o aquecimento, a capa protetora foi removida enquanto ainda submersos em NL e o *cryotop* foi diretamente imerso em solução de aquecimento contendo 1 M de sacarose em MM por 1 minuto. Em seguida, os blastocistos foram transferidos sequencialmente para os poços 2 e 3 contendo MM suplementado com 0,5 M de sacarose por 1 e 5 minutos, respectivamente. Os blastocistos foram então transferidos para o quarto poço de MM 100% por 5 min. Depois de aquecer os blastocistos e lavá-los em várias misturas de MM e sacarose, como descrito acima. Grupos de até 25 blastocistos foram cultivados em gotas de 100 µL de meio SOF coberto com óleo mineral. Blastocistos foram

cultivados em incubadora a 38,5 °C em atmosfera umidificada de 5% CO₂, 5% O₂, e 90% N₂ por 24h.

2.4 Desenho experimental

Os blastocistos foram vitrificados distribuídos em três grupos experimentais, com pelo menos cinco repetições em cada grupo. A *TmAFP* foi adicionada nas soluções de equilíbrio (SE) e vitrificação (SV), na concentração de 0 ng/mL (controle), 500 ng/mL (500*TmAFP*) ou 1.000 ng/mL (1000*TmAFP*). Um outro grupo de embriões não vitrificados foi denominado de controle fresco, para avaliação ultraestrutural. A *TmAFP* foi gentilmente cedida pelo Dr. P. Davies (Tomalty et al., 2019). O desenho experimental está apresentado na Figura 1.

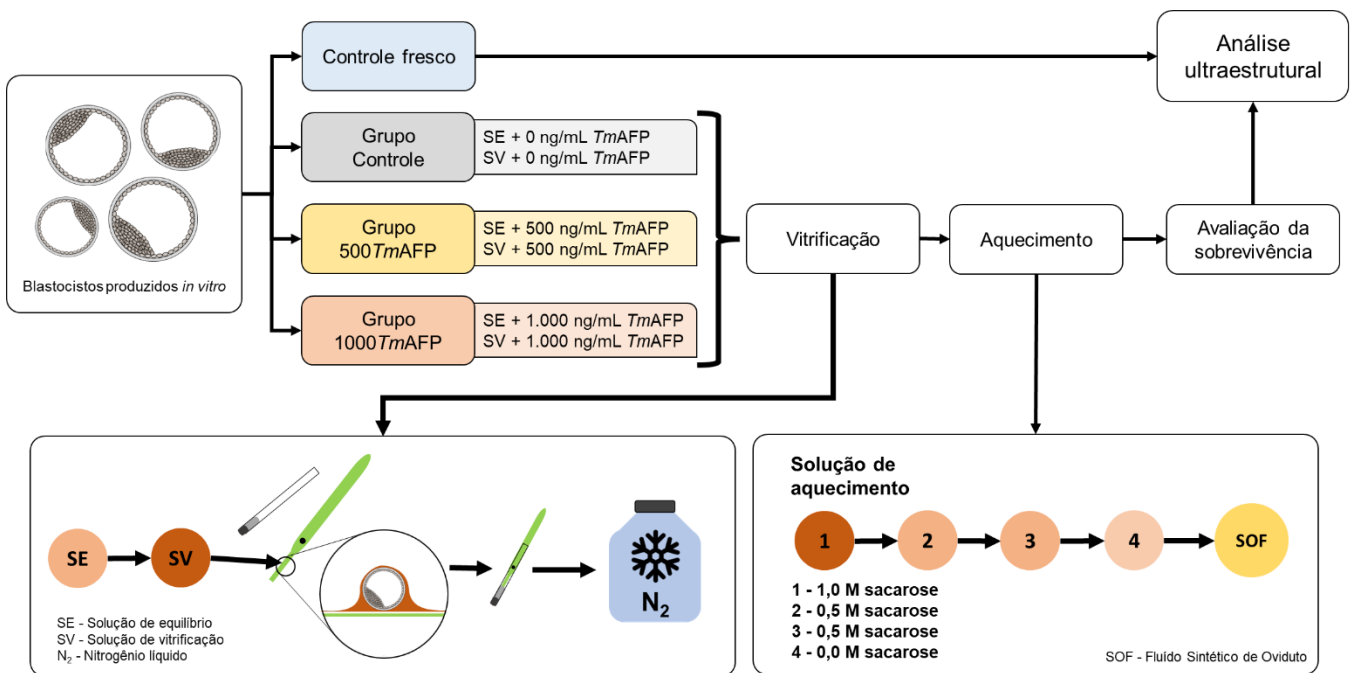


Figura 1. Desenho experimental. Blastocistos produzidos *in vitro* foram agrupados e distribuídos aleatoriamente entre três grupos. A vitrificação foi realizada em meios de estabilização e vitrificação suplementados com proteína anticongelante de *Tenebrio molitor* (*TmAFP*), nas concentrações de 0 (G. Controle), 500 ng/mL (G. 500*TmAFP*) e 1.000 ng/mL (G. 1000*TmAFP*).

2.5 Avaliação da sobrevivência dos embriões

Blastocistos vitrificados em meio de vitrificação contendo diferentes concentrações de *TmAFP* foram cultivados por 24 h como descrito acima. Ao final da cultura, cada blastocisto foi classificado com base em se a cavidade blastocélica havia restabelecido após o descongelamento e se o blastocisto estava em processo de eclosão (quer eclodindo ou eclodido da zona pelúcida). O experimento foi realizado com blastocistos produzidos em cinco repetições.

2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para melhor investigar a morfologia celular e organização das organelas no citoplasma dos embriões, foi realizada microscopia eletrônica de transmissão nos blastocistos reaquecidos e cultivados por 24 horas, além de um grupo de embriões frescos que não foram submetidos à vitrificação. Apenas embriões de grau 1 foram utilizados [20]. Os blastocistos (n = 15 por grupo) foram fixados em solução de Karnovsky (4% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2) por pelo menos 4 h em temperatura ambiente (~25°C). Após a fixação, os embriões foram incluídos em gotas de agarose de baixo ponto de fusão a 4% e mantidos em tampão cacodilato de sódio. Os espécimes foram fixados em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 h em temperatura ambiente, lavados em tampão cacodilato de sódio e corados com acetato de uranila 5%. As amostras foram então desidratadas através de um gradiente de soluções de acetona e em seguida embebidas em resina epóxi (EpoxyEmbedding Kit, Fluka Chemika). Em seguida, cortes semifinos (2 µm) foram cortados, corados com azul de toluidina e analisados em microscopia de luz com aumento de 400 X. Posteriormente, cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos dos blastocistos bovinos. Os cortes ultrafinos

foram contracorados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Morgani-FEI [21].

2.7 Análise estatística

O modelo experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três grupos e cinco repetições por grupo, categorizados com base nos períodos de 0 e 24 horas. Os dados foram testados quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Shapiro Wilk. O procedimento GLM do SAS - *Statistical Analysis System* (SAS, 2009) foi utilizado para análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos, o contraste de médias foi realizado pelo teste de alcance de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados da microscopia eletrônica são baseados em análises qualitativas, portanto não foram avaliados de forma estatística.

3. Resultados

Micrografias em estereomicroscópio representativas de cada grupo, após reexpansão/eclosão estão apresentadas na Figura 2. As taxas de sobrevivência e eclosão após aquecimento de blastocistos vitrificados em meios suplementados ou não com diferentes concentrações de *TmAFP* (500 ng/mL e 1000 ng/mL), estão apresentadas na Tabela 1. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas taxas de sobrevivência e expansão no grupo 500*TmAFP* quando comparado com os grupos controle e 1000*TmAFP*.

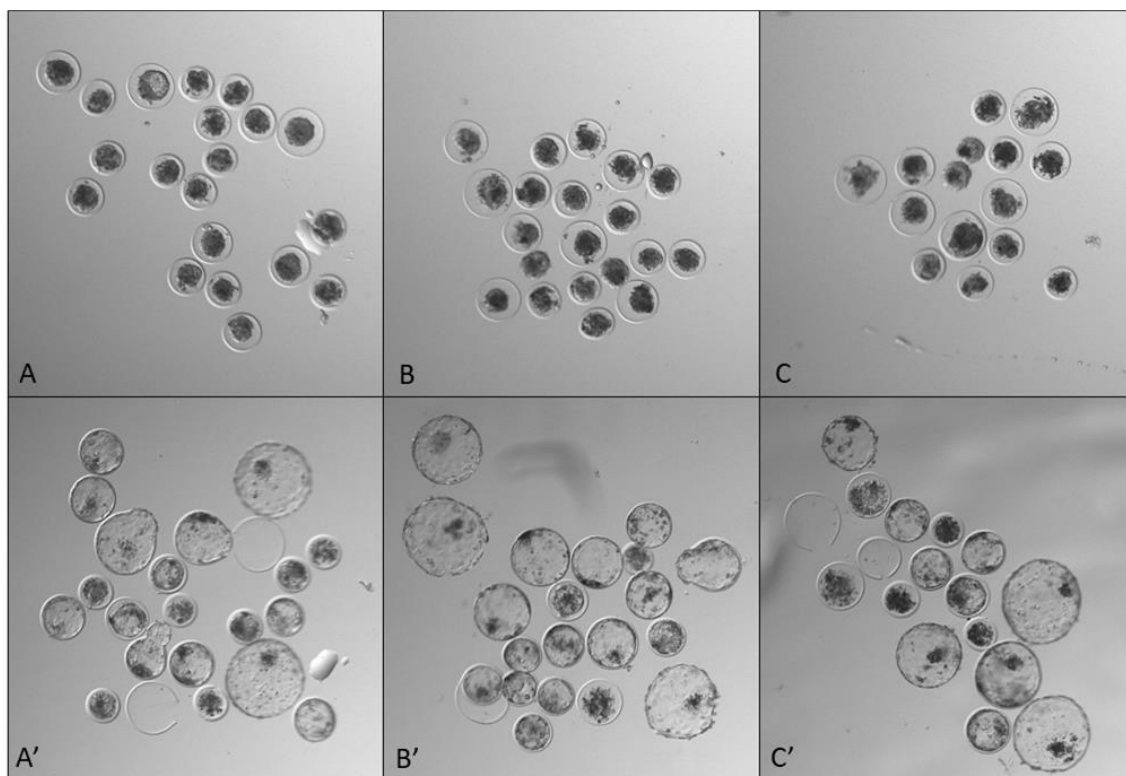


Figura 2. Micrografias em estereomicroscópio representativas da reexpansão e eclosão após aquecimento (0 e 24h) de blastocistos vitrificados em meios suplementados com concentrações de 0 (G. Controle), 500 (G. 500*TmAFP*) e 1.000 (G. 1000*TmAFP*) ng/mL de *TmAFP*. **A** – 0h, G. Controle; **A'** – 24h, G. Controle; **B** – 0h, G. 500*TmAFP*; **B'** – 24h, G. 500*TmAFP*; **C** – 0h, G. 1000*TmAFP*; **C'** – 24h, G. 1000*TmAFP*.

Tabela 1. Efeito da suplementação de *TmAFP* na sobrevivência, expansão/eclosão de embriões vitrificados e aquecidos com diferentes concentrações de *TmAFP* (500 ng/mL e 1000 ng/mL).

	Grupos		
	Controle	500 <i>TmAFP</i>	1000 <i>TmAFP</i>
Sobrevivência	48% (39/82) ^B	61% (47/77) ^A	53% (41/78) ^B
Expandidos	74% (29/39) ^B	79% (37/47) ^A	71% (29/41) ^B
Eclodidos	26% (10/39)	21% (10/47)	29% (12/41)

À microscopia eletrônica foram observadas, em todos os grupos os mesmos tipos celulares: o trofoblasto em contato ou não com a zona pelúcida. A arquitetura embrionária permaneceu preservada e não houve fragmentação embrionária significativa. Nos embriões frescos foram observadas células alongadas com núcleo proeminente, mitocôndrias bem preservadas e eventuais complexos de golgi foram evidenciados. Em

algumas regiões foi possível observar microvilosidades próximo à zona pelúcida e junções celulares bem visíveis (Figura 3).

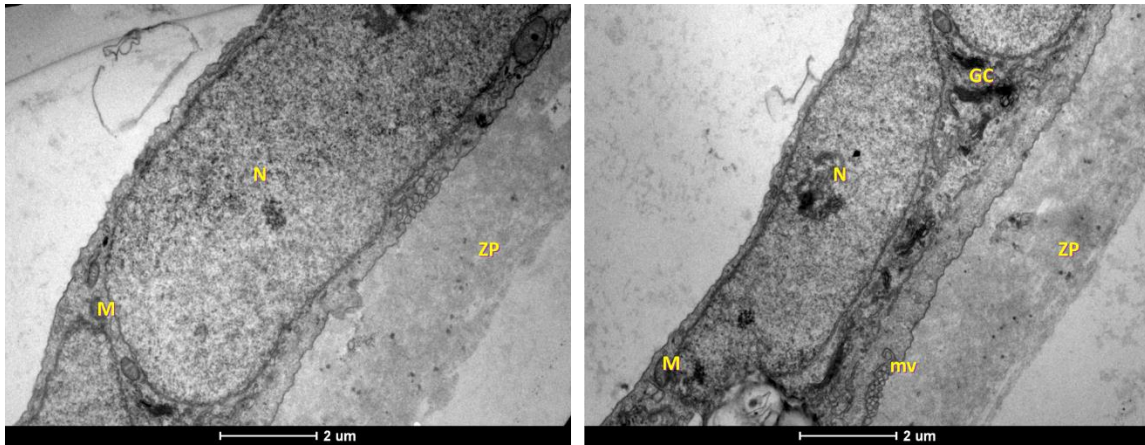


Figura 3. Características ultraestruturais de blastocistos frescos. M – Mitocôndria; N – Núcleo; ZP – Zona pelúcida; mv – microvilosidades; GC – Complexo de golgi.

No grupo controle foram observadas células alongadas com núcleo proeminente. As mitocôndrias apresentaram-se com dilatações nas cristas. Foi possível observar microvilosidades e junções celulares bem visíveis. Devido ao processo de congelamento foi possível ver algumas alterações citoplasmáticas, como desorganização intracelular, dilatação do retículo endoplasmático rugoso e alteração do complexo de golgi (Figura 4).

No grupo 500TmAFP as células se apresentavam alongadas com núcleo proeminente e aumento da densidade citoplasmática. Nestas amostras, as mitocôndrias apresentavam dilatações nas cristas, embora em menor extensão quando comparadas àquelas visualizadas no grupo controle. Neste grupo, também foi possível observar a presença de filamentos intracelulares e o aumento de unidades de membrana (Figura 5).

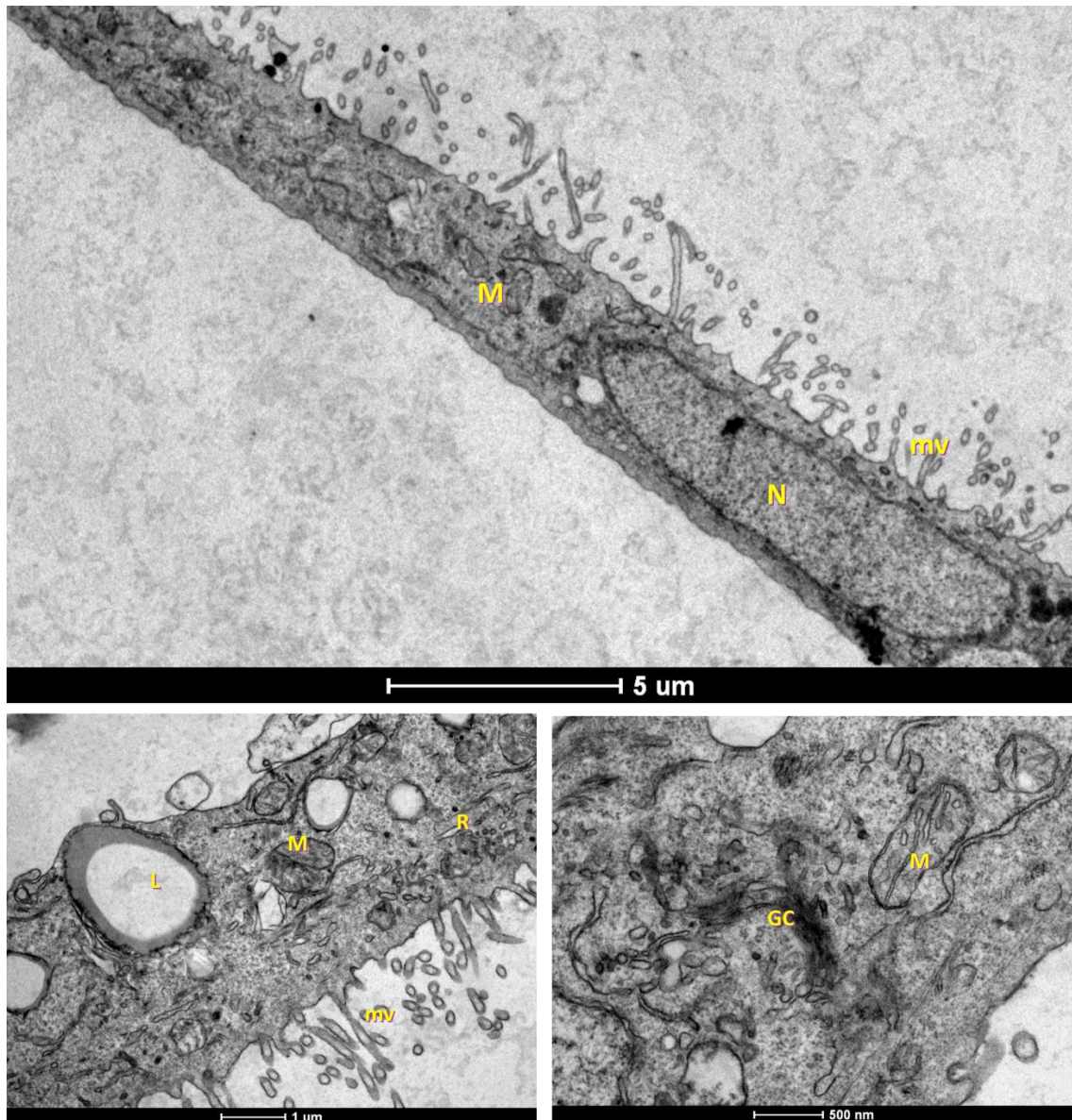


Figura 4. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados e aquecidos sem suplementação de *TmAFP* (Grupo controle). M – Mitocôndria; N – Núcleo; mv – microvilosidades; L – gotícula lipídica; R – Reticulo; GC – Complexo de golgi.

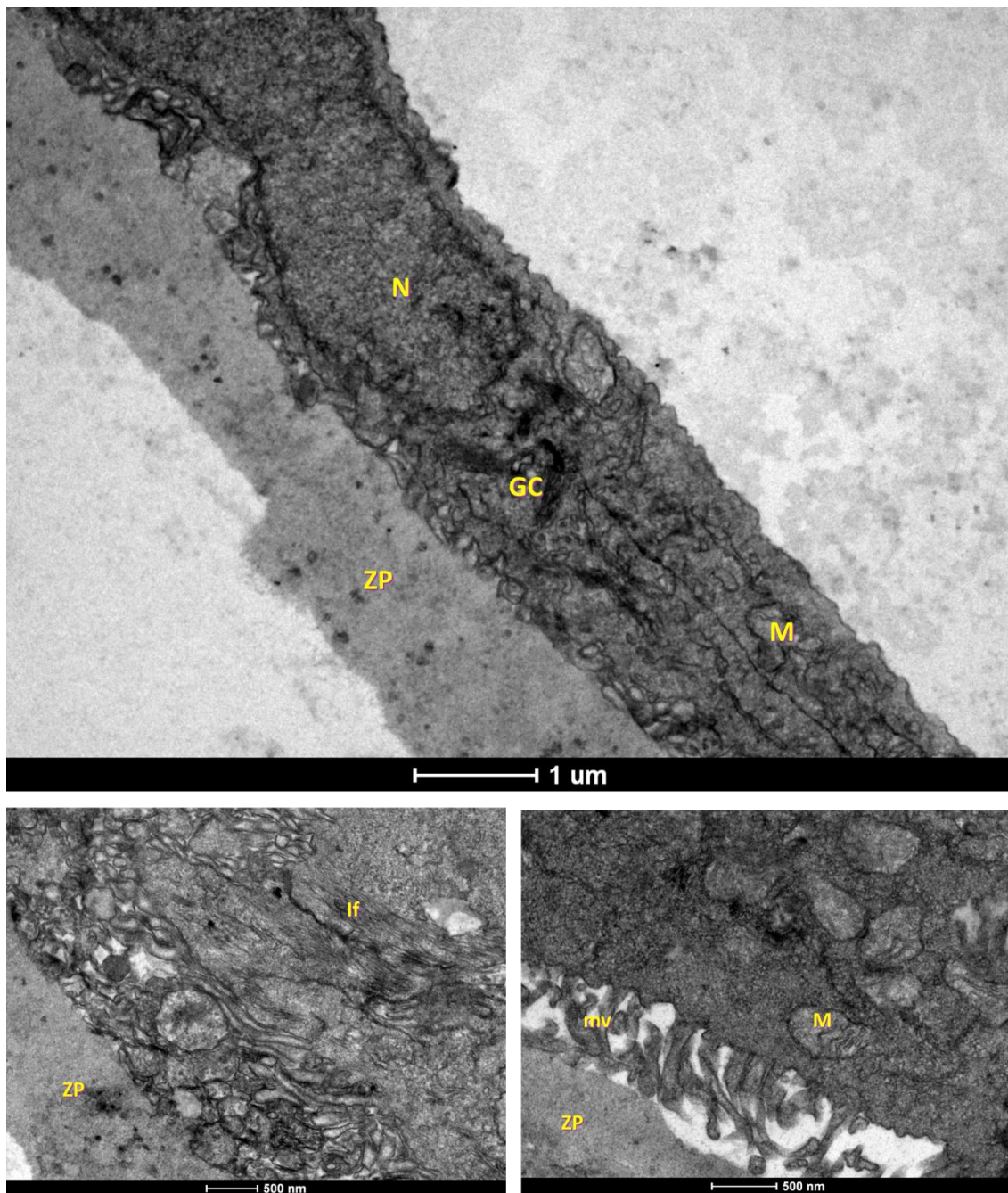


Figura 5. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados e aquecidos com suplementação de 500 ng/ml de *TmAFP* (Grupo 500 *TmAFP*). M – Mitocôndria; N – Núcleo; GC – Complexo de golgi; ZP – Zona pelúcida; If – Filamentos intermediários; mv – microvilosidades.

No grupo 1000*TmAFP* as células se apresentavam alongadas com núcleo proeminente e as mitocôndrias apresentaram-se morfológicamente semelhantes às aquelas observadas no grupo 500*TmAFP*. Nesse grupo foi observada a presença de corpúsculo intracelular multivesicular, assim como o aumento de unidades de membrana, como

observado no grupo de menor concentração, porém sem o aumento da densidade citoplasmática (Figura 6).

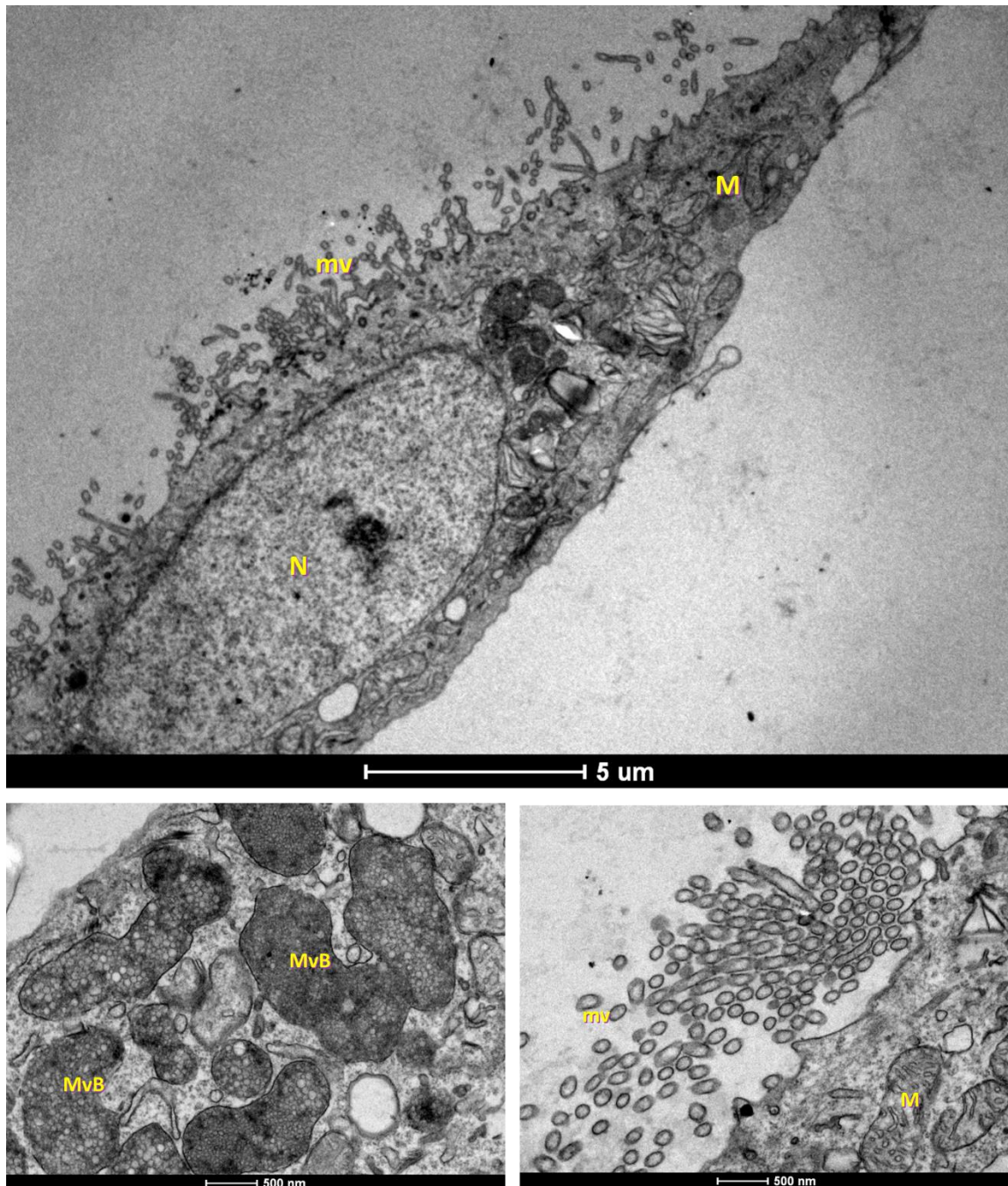


Figura 6. Características ultraestrutural de embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados e aquecidos com suplementação de 1.000 ng/mL de *TmAFP* (Grupo 1000*TmAFP*). M – Mitocôndria; N – Núcleo; mv – microvilosidades; MvB – Corpo multivesicular.

4. Discussão

A vitrificação alcançou grande atenção para uso com embriões bovinos produzidos *in vitro*. A maioria dos estudos em embriões bovinos concentra-se na avaliação do sucesso e segurança da vitrificação nas taxas de sobrevivência (por avaliação de microscopia de luz) e resultados de taxas de prenhez após a transferência, no entanto, os resultados nem sempre foram consistentes [22, 23]. Neste estudo, foram investigadas diferenças na ultraestrutura de embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados utilizando o método *cryotop* em meios suplementados ou não com AFP derivada das larvas do besouro *Tenebrio molitor* (TmAFP).

Na avaliação por estereomicroscopia, entre 48 e 61% dos embriões vitrificados/aquecidos, mostraram morfologia aparentemente normal após 24 horas de cultivo, momento em que foram fixados para avaliação ultraestrutural. Como mostrado em estudos anteriores, a morfologia de embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados, após 24 ou 48 horas de cultura, foi normalizada e variou de aproximadamente 30 a 70%, dependendo do protocolo de vitrificação, meio de diluição do crioprotetor, entre outros fatores [2, 7, 24]. Ressalta-se, no entanto, que os resultados de sobrevivência pós-criopreservação são difíceis de comparar devido ao uso de diferentes condições experimentais.

As características ultraestruturais observadas em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, não vitrificados, foram essencialmente consistentes com aquelas relatadas por Crosier et al. [25], tais como, núcleos organizados, mitocôndrias maduras bem preservadas, embora mitocôndrias com cristas dilatadas também estavam presentes em quantidade escassa. Além disso, foi possível evidenciar, complexo de golgi, zona pelúcida e microvilosidades com aparência normal, e a presença de gotas lipídicas no citoplasma das células.

Contudo, a avaliação ultraestrutural dos blastocistos vitrificados revelou sinais de lesões osmóticas expressas como desorganização intracelular, dilatação do retículo endoplasmático rugoso, alterações do complexo de golgi e mitocôndrias dilatadas com perda da organização das cristas mitocondriais, em comparação com os blastocistos não vitrificados. Essas alterações foram semelhantes às características observadas em blastocistos de bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados [26]. Em conjunto, estes resultados indicam que embriões PIV suportam a vitrificação, conseguem se restabelecer, entretanto, apresentam danos celulares.

Os resultados deste estudo indicam que a *TmAFP* pode fornecer proteção às estruturas embrionárias durante o processo de vitrificação/aquecimento, como demonstrado pela maior porcentagem de blastocistos que restabeleceram a blastocele após 24 h de cultivo no grupo 500*TmAFP*. Em adição, a suplementação com *TmAFP* (500 ou 1000ng/mL), ao meio de vitrificação, permitiu mitigar as crioinjúrias, conforme avaliado pela ultraestrutura dos embriões que permaneceram vivos. Embora o tamanho da amostra neste estudo seja pequena, deve ser enfatizado que apenas embriões classificados como grau I foram incluídos, para minimizar quaisquer efeitos adversos no desenvolvimento prejudicado.

Alterações ultraestruturais nas mitocôndrias após a criopreservação foram relatadas em outros estudos em embriões bovinos, e foi sugerido que o dano mitocondrial pode levar à morte celular [26, 27]. As mitocôndrias em geral, bem como outras organelas e células de tais embriões reagem por distensão ou encolhimento, o que no caso de células inteiras (pelo menos de uma proporção delas) resulta em degeneração [28].

Houve diferenças na extensão dos danos às mitocôndrias observados nos embriões vitrificados/aquecidos. Mitocôndrias bem preservadas mantendo estrutura intacta, foram observados nos embriões vitrificados nos grupos tratados com a *TmAFP*, quando

comparadas ao grupo controle. Além disso, foram observadas alterações na densidade citoplasmática no grupo 500*TmAFP*, sugerindo possíveis mudanças na dinâmica do citoesqueleto.

As microvilosidades estavam presentes em todos os embriões aqui estudados. Os embriões dos grupos *TmAFP* apresentaram aumento nas microvilosidades das células do trofoblasto. Estas estruturas são responsáveis pelo aumento na superfície de absorção das células e são próprias de tecidos onde há intenso transporte de fluidos e nutrientes [29]. A maior quantidade de microvilosidades nos embriões submetidos ao tratamento com *TmAFP* pode melhorar o procedimento da vitrificação, pois aumentaria as taxas de troca entre água e crioprotetores.

Além disso, quando se observou a ultraestrutura de embriões vitrificados no grupo 1000*TmAFP*, foi constatado a presença de corpos multivesiculares (MvB). Os MvB são endossomos de estágio avançado caracterizados pela presença de vesículas intraluminais dentro de uma grande vesícula. Fader et al. [30] afirmaram que os MvB reorientados a partir da via autofágica libera exossomos (EXs).

O consenso atual é que a autofagia é o principal protetor da morte celular, que contribui para aumentar a sobrevivência celular, presumivelmente através da remoção seletiva de endossomos tardios pela maquinaria de autofagia [31, 32] e redirecionando os corpos multivesiculares (MVB) para a autofagia embora esses mecanismos obstruam a liberação de EXs [30].

Os MvB têm sido identificados na ultraestrutura das células embrionárias de embriões bovinos produzidos *in vitro*, e tem sido sugerido que a presença dos MvB pode indicar que a maquinaria autofágica e secreção de EXs estão presentes em embriões

bovinos. [33]. No entanto, mais experimentos são necessários para elucidar os fatores específicos envolvidos na formação dos MvB após a vitrificação.

Embora o mecanismo pelo qual *TmAFP* regula as funções fisiológicas das células embrionárias sob estresse de congelamento não tenha sido investigado neste estudo, nossos resultados sugerem que a *TmAFP* pode prevenir a formação de gelo durante a vitrificação e, especialmente, a recristalização durante o aquecimento, ajudando assim a proteger as células embrionárias. Além disso, outra explicação possível é que as *TmAFP* podem se ligar à membrana celular e, como resultado, estabilizar as membranas do embrião. Yamauchi et al. [34] sugeriram que a *TmAFP* se liga à bicamada lipídica das células de insulinoma de rato (RIN-5F), para estabilizar sua integridade de membrana e manter a viabilidade celular a -5 °C, -2 °C e +4 °C. No entanto, se a *TmAFP* se liga à bicamada lipídica das células embrionárias permanece para ser esclarecida.

Em conclusão, as observações deste estudo proveem evidências ultraestruturais, que a extensão das alterações celulares, produzidas pela vitrificação/aquecimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, as quais envolvem organelas e componentes celulares essenciais para o funcionamento adequado e viabilidade celular, podem ser mitigadas pela adição da *TmAFP*, indicando o valor potencial da AFP da larva de *T. molitor* na inibição da formação de cristais de gelo e na preservação da qualidade de embriões vitrificados.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Brasil.

Interesses competitivos

Os autores declaram que não há conflito de interesse que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

Referências

- [1] Ferré, L.B. Kjelland, M.E. Taiyeb, A.M. Campos-Chillon, F. Ross, P.J. Recent progress in bovine *in vitro* -derived embryo cryotolerance: Impact of *in vitro* culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. *Reprod Domest Anim.* 55 (2020) 659-676. doi.org/10.1111/rda.13667.
- [2] Mogas, T. Update on the vitrification of bovine oocytes and *in vitro*-produced embryos. *Reprod Fertil Dev.* 31 (2018) 105-117. doi.org/10.1071/RD18345.
- [3] Vajta, G. Vitrification in ART: past, present, and future. *Theriogenology.* 150 (2020) 276-279. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.057.
- [4] Do, V.H. Catt, S. Kinder, J.E. Walton, S. Taylor-Robinson, A.W. Vitrification of *in vitro* -derived bovine embryos: targeting enhancement of quality by refining technology and standardising procedures. *Reprod Fertil Dev.* 31 (2019) 837-846. doi.org/10.1071/RD18352.
- [5] Valente, R.S. Almeida, T.G. Alves, M.F. Paschoal, D.M. Basso, A.C. Sudano, M.J. Cellular and apoptotic status monitoring according to the ability and speed to resume post-cryopreservation embryonic development. *Theriogenology.* 158 (2020) 290-296. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.09.026.

- [6] Yodrug, T. Parnpai, R. Hirao, Y. Somfai, T. Effect of vitrification at different meiotic stages on epigenetic characteristics of bovine oocytes and subsequently developing embryos. *Anim Sci J.* 92 (2021) e13596, doi.org/10.1111/asj.13596.
- [7] Martínez-Rodero, I. García-Martínez, T. Ordóñez-León, E.A. Vendrell-Flotats, M. Olegario Hidalgo, C. Esmoris, J. Mendibil, X. Azcarate, S. López-Béjar, M. Yeste, M. Mogas, T. A Shorter Equilibration Period Improves Post-Warming Outcomes after Vitrification and in Straw Dilution of *In vitro*-Produced Bovine Embryos. *Biology (Basel)*. 10 (2021) 142. doi.org/10.3390/biology10020142.
- [8] Sidrat, T. Khan, A.A. Joo, M.D. Xu, L. El-Sheikh, M. Ko, J.H. Kong, I.K. Extracellular vesicles improve embryo cryotolerance by maintaining the tight junction integrity during blastocoel re-expansion. *Reproduction*. 163 (2022) 219-232. doi.org/10.1530/REP-21-0320.
- [9] Robles, V. Valcarce, D.G. Riesco, M.F. The Use of Antifreeze Proteins in the Cryopreservation of Gametes and Embryos. *Biomolecules*. 9 (2019) 181. doi.org/10.3390/biom9050181.
- [10] Ekpo, M. D. Xie, J. Hu, Y. Liu, X. Liu, F. Xiang, J. Zhao, R. Wang, B. Tan, S. Antifreeze Proteins: Novel Applications and Navigation towards Their Clinical Application in Cryobanking. *Int J Mol Sci*. 23 (2022) 2639. doi.org/10.3390/ijms23052639
- [11] Jia, Z. Davies, P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem Sci*. 27 (2002) 101-106. doi.org/10.1016/s0968-0004(01)02028-x.
- [12] Davies, P.L. Graham, L.A. Protein evolution revisited. *Systems biology in reproductive medicine*. 64 (2018) 403–416. doi.org/10.1080/19396368.2018.1511764

- [13] Ideta, A. Aoyagi, Y. Tsuchiya, K. Nakamura, Y. Hayama, K. Shirasawa, A. Sakaguchi, K. Tominaga, N. Nishimiya, Y. Tsuda, S. Prolonging hypothermic storage (4 °C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. *J Reprod Dev.* 61 (2015) 1-6. doi.org/10.1262/jrd.2014-073.
- [14] Liang, S. Yuan, B. Jin, Y.X. Zhang, J.B. Bang, J.K. Kim, N.H. Effects of antifreeze glycoprotein 8 (AFGP8) supplementation during vitrification on the *in vitro* developmental capacity of expanded bovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev.* 29 (2017) 2140-2148. doi.org/10.1071/RD16426.
- [15] Davies, P.L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem Sci.* 39 (2014) 548-55. doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.005.
- [16] Tomalty, H.E. Graham, L.A. Eves, R. Gruneberg, A.K. Davies, P.L. Laboratory-Scale Isolation of Insect Antifreeze Protein for Cryobiology. *Biomolecules.* 9 (2019) 180. doi.org/10.3390/biom9050180.
- [17] Tomalty, H.E. Hamilton, E.F. Hamilton, A. Kukal, O. Allen, T. Walker, V.K. Kidney preservation at subzero temperatures using a novel storage solution and insect ice-binding proteins. *Cryo Letters.* 38 (2017) 100-107.
- [18] Song, D.H. Kim, M. Jin, E.S. Sim, D.W. Won, H.S. Kim, E.K. Jang, S. Choi, Y.S. Chung, K.H. An, J.H. Cryoprotective effect of an antifreeze protein purified from *Tenebrio molitor* larvae on vegetables. *Food Hydrocoll.* 94 (2019) 585–591. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.007.
- [19] Arshad, U. Sagheer, M. González-Silvestry, F.B. Hassan, M. Sosa, F. Vitrification improves in-vitro embryonic survival in *Bos taurus* embryos without increasing

pregnancy rate post embryo transfer when compared to slow-freezing: A systematic meta-analysis. *Cryobiology*. 101 (2021) 1-11. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.06.007.

[20] Bó, G.A. Mapletoft, R.J. Evaluation and classification of bovine embryo. *Animal Reproduction*. 10 (2013) 344-348.

[21] Barroso, P. Paulino, L. Silva, B.R. Vasconcelos, G.L. Gomes, D.S. Lima Neto, M.F. Silva, A. Souza, A. Donato, M. Peixoto, C.A. Silva, J. Effects of dexamethasone on growth, viability and ultrastructure of bovine secondary follicles cultured in vitro. *Zygote*. 28 (2020) 504–510. doi.org/10.1017/S0967199420000416.

[22] Sanches, B.V. Lunardelli, P.A. Tannura, J.H. Cardoso, B.L. Pereira, M.H. Gaitkoski, D. Basso, A.C. Arnold, D.R. Seneda, M.M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*. 85 (2016) 1147–1151. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.029.

[23] Do, V.H. Walton, S. Catt, S. Taylor-Robinson, A.W. A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology*. 77 (2017) 58–63. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.05.007.

[24] Morató, R. Izquierdo, D. Paramio, M.T. Mogas, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reproduction, fertility, and development*. 22 (2010) 1141–1147. doi.org/10.1071/RD10013.

[25] Crosier, A.E. Farin, P.W. Dykstra, M.J. Alexander, J.E. Farin, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of reproduction*. 64 (2001) 1375–1385. doi.org/10.1095/biolreprod64.5.1375.

- [26] Najafzadeh, V. Bojsen-Møller Secher, J. Pihl, M. Ærenlund, A. Jørgensen, N. Jensen, K.K. Jensen, M.T. Fenner, M.F. Strøbech, L. Hyttel, P. Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine in vitro produced blastocysts. *Theriogenology*. 171 (2021) 44–54. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.020.
- [27] Ohboshi, S. Fujihara, N. Yoshida, T. Tomagane, H. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote*. 6 (1998) 17-26. doi.org/10.1017/s0967199400005049.
- [28] Vajta, G. Hyttel, P. Callesen, H. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Molecular reproduction and development*. 48 (1997) 9–17. doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199709)48:1<9::AID-MRD2>3.0.CO;2-N.
- [29] Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, fifth ed., Garland Science, New York, 2008.
- [30] Fader, C.M. Sánchez, D. Furlán, M. Colombo, M.I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic*. 9 (2008) 230–250. doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x.
- [31] Levine, B. Yuan, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation*. 115 (2005) 2679–2688. doi.org/10.1172/JCI26390.
- [32] Yonekawa, T. Thorburn, A. Autophagy and cell death. *Essays in biochemistry*. 55 (2013) 105–117. doi.org/10.1042/bse0550105.
- [33] Mellisho, E.A. Velásquez, A.E. Nuñez, M.J. Cabezas, J.G. Cueto, J.A. Fader, C. Castro, F.O. Rodríguez-Álvarez, L. Identification and characteristics of extracellular

vesicles from bovine blastocysts produced in vitro. PLoS one 12 (2017): e0178306, doi.org/10.1371/journal.pone.0178306.

[34] Yamauchi, A. Miura, A. Kondo, H. Arai, T. Sasaki, Y.C. Tsuda, S. Subzero Nonfreezing Hypothermia with Insect Antifreeze Protein Dramatically Improves Survival Rate of Mammalian Cells. International journal of molecular sciences. 22 (2021) 12680. doi.org/10.3390/ijms222312680.