



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRANSFERÊNCIA DE GENOMA EM OVÓCITOS BOVINOS
FRESCOS E VITRIFICADOS: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

**FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA
TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRANSFERÊNCIA DE GENOMA EM OVÓCITOS BOVINOS FRESCOS E
VITRIFICADOS: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA

ORIENTADOR: PhD. MARGOT ALVES NUNES DODE

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: NÚMERO DA DISSERTAÇÃO/TESE/ANO

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2020**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**TRANSFERÊNCIA DE GENOMA EM OVÓCITOS BOVINOS FRESCOS E
VITRIFICADOS: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

FELIPPE MANOEL COSTA CAIXETA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DOUTOR EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD. EMBRAPA- CENARGEN

RODRIGO OLIVEIRA ARRUDA, Dr. Universidade de Brasília – UnB.

**MAURICIO MACHAIM FRANCO, Dr. EMBRAPA- CENARGEM (EXAMINADOR
EXTERNO).**

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dra. Universidade de Brasília – UnB.
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 20 de Março de 2020

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAIXETA, F. M. C. **Transferência de genoma em ovócitos bovinos frescos e vitrificados: produção de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 80p. Tese de Doutorado.

Documento formal autorizando reprodução dessa tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivada na secretaria do programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte dessa tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CAIXETA, F. M. C. **Transferência de genoma em ovócitos bovinos frescos e vitrificados: produção de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 80p. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020.

1. Produção *in vitro* de embriões. 2. Cryotop. 3. micromanipulação.

CCD ou CDU
Agris / FAO

**Dedico esta conquista aos meus pais, Moacir dos Reis Caixeta e Marcia.
Alvina Costa Caixeta e meus irmãos, Ana Caroline e Lucas, pelo apoio e
compreensão em todos os momentos, pelas palavras de incentivo e carinho durante
todo o tempo e a minha namorada Fernanda, pela paciência, apoio e amor para
vencer mais essa fase.**

A vocês Dedico!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu alcançasse o que queria nos estudos. Vocês são meus exemplos, a razão do meu esforço, a quem devo essa conquista. Amo Vocês!

A minha namorada Fernanda Coelho, pela paciência, carinho, amor, compreensão, apoio e por sempre ter estado do meu lado.

Aos familiares que me apoiaram, torcerem e me incentivarem durante esta jornada. Muito obrigado!

A minha orientadora, Dra. Margot, pela atenção a mim cedida, pelos conhecimentos compartilhados, conselhos e incentivos. Você é um exemplo de pessoa tanto profissional quanto pessoal. Muito obrigado!

Ao Técnico Regivaldo, Pelos ensinamentos, paciência, atenção e confiança. Muito obrigado!

Aos que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho, aos frigoríficos Qualimáxima (Luziânia-GO) e Nipobras (Formosa- GO). Muito obrigado!

Aos meus colegas e amigos Andrey, Ligiane, Andrielle, Otávio, Luna, Paloma, Thaynara, Marcinha, Maurício Machaim, Bruno, Zé, Eleonora, Carolle, Renato, Nayara, Luzia, Belinha, pelas amizades, brincadeiras e ensinamentos. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de pós-graduação em ciências animais da UnB, pelos conhecimentos transmitidos. Muito obrigado!

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CERNARGEN pela confiança e pelos conhecimentos passados. Muito obrigado!

A todos os funcionários do LRA e Fazenda Sucupira, pelas ajudas quando mais precisei. Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
CAPITULO 1	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA	21
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Maturação Ovocitária	23
2.2 Organelas Citoplasmáticas	24
2.2.1 Mitocôndrias.....	24
2.2.2 Grânulos corticais.....	27
2.3 Conservação de ovócitos	27
2.4 Transferência de Genoma (TG).....	30
2.4.1 Transferência de Vesícula Germinativa (TG-VG)	31
2.4.2 Transferência de Placa Metafásica e Corpúsculo Polar (TG-PM e TG-CP)	33
CAPITULO 2	36

TRANSFERÊNCIA DE GENOMA EM OVÓCITOS BOVINOS FRESCOS E VITRIFICADOS: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES	37
RESUMO	38
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
1. Recuperação e seleção dos ovócitos.....	45
2. Maturação in vitro (MIV).....	45
3. Seleção e preparo dos ovócitos para micromanipulação.....	45
4. Transferência de placa metafásica (TG-PM) e corpúsculo polar (TG-CP).....	46
5. Ativação partenogenética (AP).....	47
6. Produção in vitro de embriões (PIVE)	47
7. Vitrificação e aquecimento de ovócitos.....	48
8. Teste paternidade de embriões	49
9. Coloração de grânulos corticais (GC)	49
10. Coloração de mitocôndrias	50
11. Quantificação de DNA mitocondrial (mtDNA)	51
12. Análise estatística	55
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	56
Experimento 1: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM)	56
Experimento 2: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de corpúsculo polar (TG-CP).....	57

Experimento 3: Efeito da transferência de genoma nos grânulos corticais, mitocôndrias e DNA mitocondrial (mtDNA).....	57
Experimento 4: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por TG-PM utilizando PM de ovócitos criopreservados	58
RESULTADOS	59
Experimento 1: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM)	59
Experimento 2: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de corpúsculo polar (TG-CP).....	61
Experimento 3: Efeito da Transferência de Genoma nos Grânulos Corticais (GC), Mitocôndrias e DNA mitocondrial (mtDNA).	63
Experimento 4: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por TG-PM utilizando PM de ovócitos criopreservados	65
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO.....	72
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	73

RESUMO

A transferência de genoma (TG), o qual permite substituir um citoplasma danificado por um íntegro, pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da criopreservação de ovócitos bovinos. Neste trabalho objetivou-se estabelecer a técnica de TG utilizando a placa metafásica (PM) e corpúsculo polar (CP) de ovócitos bovinos como fontes do material genético. Para isso foram realizados quatro experimentos. No primeiro foi estabelecida a TG utilizando a PM (TG-PM) avaliando a concentração espermática a ser utilizada, a taxa de fecundação, a de polispermia e a de embriões. Na avaliação da concentração espermática, a taxa de fecundação foi maior ($P < 0,05$) no grupo controle (76,1%) do que no TG-PM fecundados com 1×10^6 sptz/ml (46,9%) e com $0,5 \times 10^6$ sptz/ml (46%), que não diferiram entre si. Com relação à produção de embriões o grupo TG-PM apresentou taxas de clivagem (50%) e blastocisto (13,6%) inferiores ao grupo controle (80,2% e 32,6%,). No segundo experimento foram avaliados os mesmos parâmetros do primeiro, porém com estruturas submetidas à transferência de corpúsculo polar (TG-CP). Os resultados mostraram que o grupo TG-CP apresentou taxa de fecundação (82,3% x 96,2%) e de blastocisto (7,7% x 36,8%) inferiores, mas a taxa de clivagem (88,5% x 85,3%) semelhante ao grupo controle. No terceiro experimento foi avaliado o efeito da TG-PM e TG-CP na quantidade e distribuição de Grânulos Corticais (GC), Mitocôndrias (MT) e número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA). A quantificação do GC foi semelhante ($p > 0,05$) entre as estruturas reconstruídas GT-PM ($n = 22$) e GT-CP ($n = 20$). No entanto, ambos os grupos apresentaram menos GC ($p < 0,05$) que os grupos controle ($n = 22$) e enucleados ($n = 20$). Para distribuição do GC, o grupo GT-PM apresentou menos estruturas com distribuição periférica, diferente dos grupos controle e enucleado ($p < 0,05$), mas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo GT-CP ($p > 0,05$). Não foi observado diferença entre os grupos quanto a quantidade e distribuição de MT e quantidade de mtDNA. No quarto experimento foi realizada a TG-PM utilizando ovócitos vitrificados (TG-PMV) como fonte de material genético. Para isso, foram utilizados 3 grupos, TG-PMV, controle vitrificado (VIT) e controle PIVE. A taxa de clivagem do grupo TG-PMV (61,2%) foi semelhante ao grupo controle VIT (52,7%) e inferior ($p < 0,05$) ao grupo controle PIVE (81,25%). Já a taxa de blastocisto não se diferiu do grupo controle VIT (8,9% e 3,6%) porém foram menores que o grupo

controle PIVE (33,9%). Os resultados obtidos sugerem que as estruturas reconstruídas pela técnica de TG-PM e TG-CP são capazes de se desenvolver em embrião, e podem ser fecundados usando o mesmo protocolo utilizado na PIVE, sem aumento na taxa de polispermia. Além disso, os resultados mostraram que é possível produzir embriões por TG a partir de ovócitos vitrificados, possibilitando o uso de material genético armazenado em banco de germoplasma.

Palavras-Chaves: Produção *in vitro* de embriões, cryotop, micromanipulação.

ABSTRACT

Genome transfer (GT), which allows the replacement of a damaged cytoplasm by an intact cytoplasm, is an alternative to increase the efficiency of crypreservation of bovine oocytes. Therefore, we aim to establish the GT technique in bovine oocytes using metaphasic plate (MP) and polar body (PB) as sources of genetic material. To do that, four experiments were carried out. In the first experiment, GT was established using MP (GT-MP). In the evaluation of sperm concentration, the fertilization rate in the control group (76.1%) was higher ($p < 0.05$) than that of GT-MP fertilized with 1×10^6 spz/ml (46.9%) and GT-MP fertilized with 0.5×10^6 spz/ml (46%), which did not differ between them. However, the rate of polyspermia was similar ($p > 0.05$) between groups. Regarding embryo production, in GT-MP group cleavage (50%) and blastocyst rates (13.6%) were lower than the IVP control group (80.2% and 32.6%, respectively). In the second experiment, the same parameters as the first were evaluated, but instead of the metaphase II, the polar body (GT-PB) was used. The results showed that the GT-PB group had lower fertilization rate (82.3% x 96.2%) and a blastocyst (7.7% x 36.8%) than control group, but the cleavage rate (88.5% x 85.3%) was similar between them. . In the third experiment, the effect of micromanipulation on the amount and distribution of Cortical Granules (CG), Mitochondria (MT) and number of copies of mitochondrial DNA (mtDNA) was evaluated. For this, four groups were used, GT-MP, GT-PB, enucleated and control intact group. CG quantification was similar ($p > 0.05$) between the reconstructed structures GT-MP ($n = 22$) and GT-PB ($n = 20$). However, both groups had less CG ($p < 0.05$) than the control ($n = 22$) and enucleated ($n = 20$) groups. For CG distribution, the GT-MP group had fewer structures with peripheral distribution, different from the control and enucleated groups ($p < 0.05$), but there was no significant difference in relation to the GT-PB group ($p > 0.05$). There was no differences between groups regarding the amount and distribution of MT and the amount of mtDNA. In the fourth experiment, GT-MP was performed using vitrified oocytes (GT-VMP) as a source of genetic material. Cleavage rate of the TG-PMV group (61.2%) was similar to the VIT control group (52,7%) and lower ($p < 0.05$) than the control IVP group (81.25%). The blastocyst rate did not differ from the control VIT group (8.9% and 3.6%) but were lower than the control group PIVE (33.9%). The results obtained

suggested that the structures reconstructed by the TG-PM and TG-CP technique are capable of developing in embryo, and can be fertilized using the same protocol used in IVEP. In addition, the results showed that it is possible to produce embryos by TG from vitrified oocytes, which provides a new alternative to use genetic material stored in a germplasm bank.

Key-words: *in vitro* embryo production, cryotop, micromanipulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ILUSTRAÇÃO	PÁGINA
<p>Figura 1. Estrutura de uma DNA mitocondrial de <i>Bos taurus</i>, indicando a região de transcrição de cada gene do DNA mitocondrial: Gene (verde) sequência codificante (azul), RNA ribossomal (vermelho) e região D-Loop (amarelo). Fonte: Geneious v2020.0.5 (Biomatters, New Zealand)</p>	26
<p>Figura 2. Distribuição dos grânulos corticais (GC) em corte medial de imagem de microscopia confocal, de ovócitos submetidos à coloração com FITC-PNA. E classificadas em: (A) periféricos, GCs distribuídos adjacentes à membrana plasmática; (B) cortical, a maioria dos GCs localizados na região do córtex; (C) homogêneos, GCs espalhados por todo o citoplasma; (D) cluster, grandes agregados de GCs distribuídos no citoplasma.</p>	50
<p>Figura 3. Distribuição mitocondrial (MT) em corte medial de imagem de microscopia confocal, de ovócitos submetidos à coloração com MitoTracker® Green FM a base de carboxianina.: As estruturas foram classificadas como: (A) distribuição periférica, as mitocôndrias estavam localizadas abaixo da membrana plasmática.; (B) distribuição semi-periférica, as mitocôndrias foram distribuídas de maneira desigual no citoplasma; (C) distribuição difusa, as mitocôndrias foram dispersas por todo o citoplasma.</p>	51
<p>Figura 4. (A) Estrutura de uma DNA mitocondrial de <i>Bos taurus</i>. (B) par de primer utilizado para quantificação de mtDNA no gene ND1. Fonte: Geneious v2020.0.5 (Biomatters, New Zealand).</p>	53
<p>Figura 5. Alinhamento realizado no programa Clustal Omega entre a sequência referência (NCBI_ND1) e cinco produtos de sequenciamento (SEQ_1 a SEQ_5) para o gene ND1, mostrando 100% de identidade entre as sequências. Marcação em vermelho indica a sequência <i>Forward</i> e <i>Reverse</i> do primer OUT para o gene ND1.</p>	54

Figura 6. Quantificação de grânulos corticais (CG) em pixels, usando coloração FITC-PNA dos grupos: controle, de transferência de genoma do corpúsculo polar (TG-CP), de transferência de genoma da placa de metafásica (TG-PM) e enucleado.

63

Figura 7. Quantificação mitocondrial (MT) em pixels, de estruturas coradas com MitoTracker® Green FM a base de carboxianina: controle, grupo de transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP), grupo de transferência do genoma com placa metafásica (TG-PM) e grupo enucleado.

64

Figura 8. Quantificação do número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) por PCR em tempo real (RT q-PCR) d dos grupos: grupo controle, grupo de transferência de genoma do corpúsculo polar (TG-CP), transferência de genoma da placa metafásica (TG-PM) e enucleado.

65

LISTA DE TABELAS

TABELAS	PÁGINA
Tabela 1. Identificação do gene, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e número de acesso ao Genbank.	55
Tabela 2. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM) e submetidos à ativação partenogénica (AP), de ovócitos submetidos a AP e de ovócitos submetidos à produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).	59
Tabela 3. Taxa de ovócitos fecundados, não fecundados, polispérmicos e anormais que foram submetidos à transferência de genoma com placa metafásica (TG-PM) e inseminados com diferentes concentrações de espermatozoides (1×10^6 e 0.5×10^6 spz/ml) comparado ao grupo controle produzido <i>in vitro</i> (PIVE) e inseminado com 1×10^6 spz/ml.	60
Tabela 4. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com placa metafásica (TG-PM) submetidos à produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) comparado ao grupo controle PIVE.	61
Tabela 5. Taxa de fecundados, não fecundados, polispérmicos e anormais de ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP), comparado ao grupo controle produzido <i>in vitro</i> (PIVE).	62
Tabela 6. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) e submetidos à produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) comparado ao grupo controle PIVE.	62
Tabela 7. Distribuição de Grânulos Corticais (GC) em ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) ou placa metafásica (TG-PM) comparado com ovócitos não manipulados (controle) e ovócitos enucleados.	64

Tabela 8. Distribuição de mitocôndrias (MT) em ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) ou placa metafásica (TG-PM) comparado com ovócitos não manipulados (controle) e ovócitos enucleados. 65

Tabela 9. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com placa metafásica de ovócitos vitrificados (GT-PMV) submetidos à produção *in vitro* de embriões (PIVE) comparado a ovócitos vitrificados (controle VIT) e grupo controle PIVE. 66

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os avanços das técnicas de reprodução assistida (TRA) nas últimas décadas possibilitaram a utilização comercial da produção *in vitro* de Embriões (PIVE), da clonagem por transferência nuclear (TN) e da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em espécies domésticas. Com a utilização dessas técnicas a necessidade de criopreservar embriões e gametas se tornou evidente. O armazenamento de gametas femininos, por exemplo, é fundamental para o tratamento de infertilidade em humanos, para a conservação de espécies, para otimização do uso de fêmeas e de receptoras em programas comerciais de PIVE e, ainda para aumentar a disponibilidade de ovócitos para desenvolvimento e aprimoramento das TRAs.

Enquanto a criopreservação de embriões PIVE tem avançado nos últimos anos, a criopreservação de ovócitos tem permanecido com baixas taxas de sobrevivência em bovinos, se mostrando um grande desafio para a pesquisa (Arcarons *et al.*, 2015). Vários estudos têm sido realizados utilizando diferentes métodos de criopreservação de ovócitos, sendo que atualmente o método mais utilizado é a vitrificação por *Cryotop*. Apesar dessa técnica apresentar bons resultados em ovócitos humanos (Cao *et al.*, 2009; Cobo *et al.*, 2015a; Iussig *et al.*, 2019), em animais domésticos os resultados ainda são insatisfatórios.

Estudos usando a metil- β -ciclodextrina (M β CD) na tentativa de mudar a composição da membrana plasmática do ovócito (Spricigo *et al.*, 2012), ou utilizando ovócitos maturados *in vivo* (Spricigo *et al.*, 2015) que seriam de melhor qualidade e, possivelmente, mais resistentes, não mostraram nenhuma melhora na resposta à vitrificação. Além disso, a vitrificação em diferentes estágios da meiose (Spricigo *et al.*, 2014), ou a exposição dos ovócitos a substâncias antioxidantes para melhorar a crioresistência (Arcarons *et al.*, 2015; Spricigo *et al.*, 2017), também não reduziram os danos causados por essa técnica. Possivelmente, isso se deve às características muito peculiares do ovócito bovino, tais como o tamanho da célula, o volume de água no citoplasma, a organização do citoesqueleto, entre outras. De fato, análises de microscopia eletrônica mostraram que as principais alterações nos ovócitos após a vitrificação se referem a danos estruturais do citoplasma (Spricigo *et al.*, 2014).

Considerando os severos danos do citoplasma causados pela criopreservação, uma possibilidade de aproveitar o material genético dos ovócitos seria a Transferência

de Genoma (TG), já utilizada em humanos, ratos e felinos (Tachibana, Sparman e Mitalipov, 2010; Graves-Herring, J. E., Wildt, D. E. e Comizzoli, P., 2013; Paull *et al.*, 2013; Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014; Otsuki, Nagai e Sankai, 2014; Wang *et al.*, 2014). Em humanos o principal objetivo para utilização dessa biotécnica é evitar a propagação de doenças causadas por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) e ou possibilitar que mulheres inférteis, devido a tratamentos quimioterápicos por exemplo, possam ter filhos após o tratamento. Em bovinos essa técnica seria uma alternativa para o melhor aproveitamento de ovócitos que tenham seu citoplasma comprometido tais como os oriundos de doadoras com idade avançada e aqueles submetidos à criopreservação.

A TG pode ser realizada utilizando os diversos estágios do material genético do ovócito, como por exemplo, a vesícula germinativa (VG), a placa metafásica e o corpúsculo polar. O uso da VG para realizar a TG em ovócitos bovinos já foi relatada, entretanto os estudos mostraram que os ovócitos reconstruídos apresentaram capacidade reduzida de concluir a maturação e de produzir embriões (Franciosi *et al.*, 2010). Além da VG, uma segunda alternativa seria a TG de Placa Metafásica (TG-PM), que vem apresentando resultados satisfatórios (Tachibana *et al.*, 2009; Zhang, J. *et al.*, 2017). Entretanto, os estudos relatados foram realizados com ovócitos de primatas e humanos, e, ainda não há relatos da utilização da TG-PM em ovócitos bovino. Outra alternativa seria a transferência de corpúsculo polar (TG-CP), sendo relativamente mais simples e que permite gerar dois ovócitos reconstruídos a partir de um único doador de DNA (uma PM e um CP). Já foi relatado que na TG-CP o CP é capaz de formar uma nova placa metafásica com características genéticas, epigenéticas e transcricionais semelhantes à de uma célula normal (Ma *et al.*, 2017).

Apesar de incipiente, os resultados da TG encontrados na literatura em humanos, primatas e murinos, mostram que essa técnica pode ser uma opção para o aproveitamento do material genético de ovócitos com citoplasmas danificados. Os relatos de seu uso em animais domésticos e silvestres são muito escassos, entretanto a possibilidade de utiliza-la nesses animais traz uma nova perspectiva para preservar e utilizar material genético importante. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer a técnica de TG em ovócitos bovinos e avaliar a viabilidade de seu uso em ovócitos afetados pela criopreservação.

1.1 PROBLEMÁTICA E RELEVÂNCIA

A criopreservação do gameta feminino tem inúmeras aplicações para conservação e produção animal, pois o uso dessa técnica permite preservar ovócitos de animais em risco de extinção, de fêmeas de alto valor genético e de animais que morrem subitamente. Além disso, pode ser fundamental para resolver problemas logísticos associados à recuperação de grande número de ovócitos por OPU e a disponibilidade de receptoras, assim como para a comercialização de genética. Apesar dos inúmeros esforços feitos nas últimas décadas para melhorar os resultados da criopreservação de ovócitos em animais domésticos, essa técnica ainda é ineficiente. Portanto, existe uma necessidade de se buscar alternativas que possam viabilizar o uso do material genético de ovócitos criopreservados de forma mais eficiente. A utilização da TG poderia ser uma possibilidade, considerando que os maiores danos da criopreservação ocorrem no citoplasma do ovócito. Desta forma, seria possível utilizar esse material com o suporte de um citoplasma fresco, o qual permitiria a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário dessas estruturas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a técnica da Transferência de Genoma e avaliar a viabilidade de seu uso em ovócitos bovinos frescos e vitrificados.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a técnica de Transferência de Placa Metafásica (TG-PM) em ovócitos bovinos e avaliar a capacidade de ovócitos reconstruídos de serem fecundados e de se desenvolver até o estágio de blastocisto;
- Estabelecer a técnica de Transferência de Corpúsculo Polar (TG-CP) em ovócitos bovinos e avaliar a capacidade de ovócitos reconstruídos de serem fecundados e de se desenvolver até o estágio de blastocisto;
- Avaliar o efeito da micromanipulação na disposição e disponibilidade de Grânulos Corticais (GC), Mitocôndrias (MT) e DNA Mitocondrial (mtDNA);
- Avaliar a viabilidade de realizar a TG de ovócitos vitrificados para ovócitos frescos enucleados, visando superar os danos citoplasmáticos e garantir a sobrevivência do material genético vitrificado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maturação Ovocitária

A maturação é o processo pelo qual o ovócito se prepara para a fecundação e, refere-se às mudanças nucleares e citoplasmáticas, que o torna capaz de originar uma nova vida. O processo da formação do ovócito é chamado de ovogênese a qual inicia durante a vida fetal (Fair, 2003), mas só termina na fecundação. Os ovócitos têm origem extragonadal e são formados a partir de células germinativas primordiais, que após chegarem ao local onde as gônadas vão se formar, se diferenciam em ovogônias. Antes do nascimento essas entram em meiose e ficam retidas no estágio de prófase I (Austin e Short, 1982). Durante todo o período de desenvolvimento folicular o ovócito permanece retido no estágio de diplóteno da prófase I, e só é estimulado a retomar e completar a primeira divisão meiótica, após o pico pré-ovulatório de LH. Portanto, quando liberado do folículo na ovulação, o ovócito encontra-se no estágio de metáfase da segunda divisão meiótica, fase em que é então retido pela segunda vez (Austin e Short, 1982). O término da maturação meiótica do ovócito só ocorre após a penetração do espermatozoide durante a fecundação.

A maturação ovocitária envolve várias mudanças nucleares e citoplasmáticas. A maturação nuclear está relacionada à segregação dos cromossomos, e envolve a progressão da meiose da fase de prófase I até o estágio de metáfase II. Durante o desenvolvimento folicular, os ovócitos encontram-se retidos em diplóteno da prófase I, com o núcleo em vesícula germinativa (VG), que tem como característica a cromatina descondensada e membrana nuclear íntegra (Liu *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2009). Quando ocorre a retomada da meiose, a membrana da VG se dissolve, comumente chamada de quebra da VG (VGBD - *vesicle germinal break down*), e inicia-se a condensação dos cromossomos, passando para as fases de metáfase I, anáfase I, e telófase I, finalizando a primeira divisão meiótica. A expulsão dos cromossomos homólogos é acompanhada por uma divisão desigual de citoplasma, formando o corpúsculo polar (CP), e o ovócito entra na segunda divisão meiótica chegando à metáfase II, onde fica retido pela segunda vez. A segunda divisão meiótica só se concluirá se houver fecundação.

A maturação citoplasmática, que inclui a maturação molecular, envolve a reorganização das organelas, acúmulo de mRNAs, síntese de proteínas e fatores de

transcrição que serão utilizados durante o processo de maturação, fecundação e desenvolvimento inicial do embrião (Ferreira *et al.*, 2009; Auclair *et al.*, 2013).

Moléculas e substâncias são transportadas através das células do cumulus (CC) para o ovócito pelas junções gap (GJ- *gap junctions*), permitindo uma troca bidirecional de pequenas moléculas como ATP, íons e suprimento energético pelo metabolismo de açúcares e lipídios fora do ovócito (Auclair *et al.*, 2013). À medida que o ovócito progride na configuração da cromatina, a produção e armazenamento de mRNA diminui até ocorrer a inativação genômica. Esses mRNAs serão utilizados para síntese de proteínas até o embrião atingir o estágio de 8-16 células, que é o momento em que ocorre a transição materno-zigótica em que as células embrionárias passam a transcrever seu próprio genoma (Lodde *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009).

2.2 Organelas Citoplasmáticas

Durante a maturação citoplasmática ocorre um deslocamento das organelas controladas pelos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto. O posicionamento dessas organelas vai depender da necessidade dos ovócitos em cada estágio da maturação (Ferreira *et al.*, 2009).

2.2.1 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas responsáveis por suprir os gastos energéticos dos ovócitos através da produção de ATP, sendo que durante a maturação seu posicionamento muda pela ação de microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto, para os locais de maior gasto energético (Ferreira *et al.*, 2009; Maziero *et al.*, 2019). Em ovócitos, as mitocôndrias são arredondadas ou ovais e composta por cristas e vacúolos, podendo apresentar diferentes níveis de atividade durante a maturação (Tarazona *et al.*, 2006). O padrão de atividade das mitocôndrias varia de acordo com a aquisição de competência ovocitária, crescimento e atresia (Jeseta *et al.*, 2014). No ovócito imaturo se posicionam periféricamente e sua grande maioria encontra-se imaturas e com baixa atividade, sendo o suprimento energético nessa fase fornecido em grande parte pelas células da granulosa (Fair, 2003; Tarazona *et al.*, 2006). Durante o crescimento e maturação ovocitária até quando atingem o estágio de

MII se tornam mais próximas do núcleo com um padrão de atividade elevado em consequência da maior demanda energética nesse período de síntese de mRNA e armazenamento de moléculas. Após a fecundação volta a se apresentar periféricamente (Tarazona *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2009; Maziero *et al.*, 2019). Acredita-se que em células germinativas pré-migratórias o número de mitocôndrias é de aproximadamente 10 atingindo 200 em fase de ovogônia e que durante a maturação esse número atinge mais de 50.000 (Ferreira *et al.*, 2009). É uma organela que possui seu próprio genoma, o DNA mitocondrial (mtDNA) e, alguns autores acreditam que cada mitocôndria possui de uma a duas cópias de mtDNA (Cummins, 1998; Trimarchi *et al.*, 2000; Cummins, 2004; Tarazona *et al.*, 2006; Van Blerkom, 2009; Reader *et al.*, 2015; Reader, Stanton e Juengel, 2017).

O mtDNA regula a produção de ATP, apoptose das células, a homeostase de Ca e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). É um DNA de fita dupla composto por 16338 pares de base (16,3kb), contendo uma região D-Loop altamente variável. É responsável por codificar 37 genes: 22 tRNAs, 2 RNAs e 13 proteínas polipeptídicas (Figura 1). Essas proteínas fazem parte da via de transporte de elétrons que facilita a produção de ATP por fosforilação oxidativa juntamente com as proteínas codificadas no DNA (Kim e Seli, 2019).

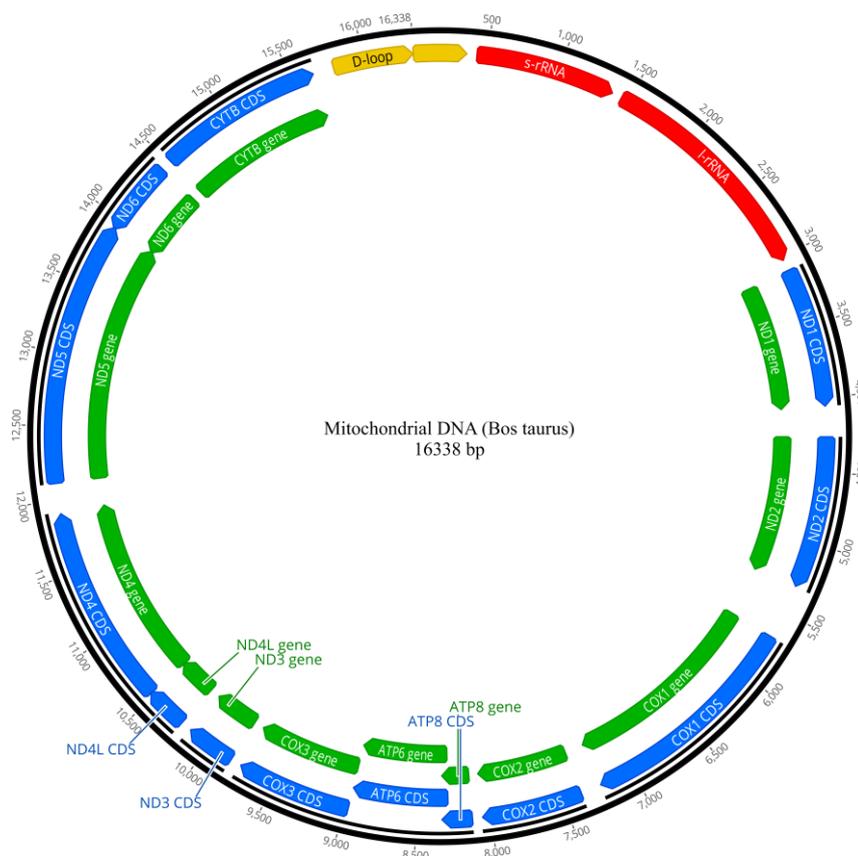


Figura 1. Estrutura de uma DNA mitocondrial de *Bos taurus*, indicando a região de transcrição de cada gene do DNA mitocondrial: Gene (verde) sequência codificante (azul), RNA ribossomal (vermelho) e região D-Loop (amarelo). Fonte: Geneious v2020.0.5 (Biomatters, New Zealand)

Estudos tem mostrado uma relação entre mtDNA e qualidade de ovócitos e embriões na PIVE (Iwata *et al.*, 2011; Cree *et al.*, 2015; Kim e Seli, 2019). Iwata e colaboradores observaram que a quantidade de cópias de mtDNA do ovócito e a quantidade de ATP diminuem à medida que a fêmea bovina envelhece. Partindo do princípio que ovócitos envelhecidos apresentam parâmetros inferiores aos esperados na PIVE, esses autores concluíram que essa característica tem relação com a diminuição na quantidade de mtDNA e aumento de ATP presentes nesses ovócitos envelhecidos (Iwata *et al.*, 2011). Em contraste, Cree e colaboradores mostraram não haver um efeito da idade do animal na quantidade de mtDNA. Esses autores observaram também um efeito negativo dos protocolos hormonais de sincronização no número de mtDNA de ovócito, o que suporta ideia de que ovócitos advindos de super estimulação hormonal são metabolicamente comprometidos em relação aos não estimulados, resultando na diminuição da capacidade de desenvolvimento após a fecundação (Cree *et al.*, 2015).

Pasquariello e colaboradores (2018) investigaram o papel das mitocôndrias na perda de qualidade de ovócitos de fêmeas com idade avançada. Mostraram em camundongos e mulheres que os ovócitos provenientes de fêmeas mais velhas apresentam menor quantidade de mtDNA e atividade mitocondrial. Foi demonstrado que ovócitos de camundongo com idade avançada os níveis de stress oxidativo são mais elevados em relação aos jovens, porém, quando foram tratados com antioxidantes a atividade mitocondrial melhorou e o nível de mtDNA aumentou, passando a ser semelhantes a ovócitos de camundongos mais jovens (Pasquariello *et al.*, 2018).

2.2.2 Grânulos corticais

Os grânulos corticais (GC) são vesículas derivadas do complexo de golgi que transportam diversos tipos de proteínas, enzimas, moléculas estruturais e glicosaminoglicanas. Os GC são responsáveis principalmente pela reação cortical que impede a entrada de mais de um espermatozoide no ovócito, promovendo assim o bloqueio à polispermia. Os GC são organelas utilizadas como importantes marcadores de maturação citoplasmática. Em ovócitos imaturos ou em estágio de GV, os GC se apresentam em grumos ou "clusters" dispersos pelo citoplasma do ovócito. Quando os ovócitos concluem a maturação e atinge a metáfase II os GC se apresentam próximos da membrana citoplasmática, em posição periférica em relação ao ovócito, onde aguarda a chegada do espermatozoide para que ocorra a reação cortical, onde o conteúdo desses grânulos é liberado modificando a zona pelúcida (Hyttel *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 2009; Jeseta *et al.*, 2014; Maziero *et al.*, 2019).

2.3 Conservação de ovócitos

A capacidade de criopreservar gametas femininos torna o uso da TRAs mais eficientes devido à flexibilidade que a criopreservação possibilita, sendo possível o uso desses gametas nos momentos e condições mais adequados. Outro setor que é beneficiado com a criopreservação de gametas femininos é o de conservação de recursos genéticos. Isso porque para a preservação/recuperação de espécies extintas ou em risco de extinção, se faz necessário o armazenamento não somente de espermatozoides como também a preservação dos gametas femininos para que haja a

recuperação das diversas características que compõe uma espécie (Kuwayama, M. *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010). Outra aplicação para a criopreservação de gametas femininos, e o uso como ferramenta em tratamentos reprodutivos de mulheres submetidas a tratamentos contra câncer com uso de fármacos e quimioterápicos.

Para gametas e embriões estão disponíveis dois métodos de criopreservação, a congelamento lento e a vitrificação. A congelamento lento consiste na utilização de solução com baixa concentração de crioprotetores e curva de resfriamento lenta, mas induz a formação de cristais de gelo intracelulares. Já a vitrificação tem a característica de passar para o estado vítreo sem a formação de cristais de gelo, porém utiliza altas concentrações de crioprotetores, podendo ser tóxicas as células (Carvalho, 2011).

Vários estudos foram realizados utilizando diferentes métodos para a criopreservação de ovócitos e os resultados indicam que a vitrificação é o mais indicado (Cao *et al.*, 2009; Luciano *et al.*, 2009), sendo o método mais utilizado para a criopreservação de ovócitos de várias espécies (Sprícigo *et al.*, 2017; Fathi, Moawad e Badr, 2018; Angel *et al.*, 2020; Dos Santos-Neto *et al.*, 2020). Entre os métodos mais utilizados para a vitrificação pode-se citar o *cryoloop* (Cao *et al.*, 2017), *OPS* (*open pulled straw*) e vitrificação em superfície sólida (El-Shalofy *et al.*, 2017; Mahesh *et al.*, 2017), porém, a que tem apresentado melhores resultados é a vitrificação por *Cryotop* (Kuwayama, Masashige *et al.*, 2005; Fathi, Moawad e Badr, 2018; Fisch e Abir, 2018a; Dos Santos-Neto *et al.*, 2020). Um estudo em humanos mostrou que de um total de 3.610 ovócitos vitrificados utilizando o *Cryotop*, 90,3% permaneciam viáveis após o aquecimento e quando transferidos apresentaram uma taxa de gestação de 46,7% (Cobo *et al.*, 2015a). Além disso, a comparação entre os métodos de vitrificação e congelamento lento em ovócitos humanos mostrou taxas de sobrevivência pós-descongelamento, clivagem, e blastocisto maiores no *Cryotop*, não havendo diferença na taxa de fecundação entre as duas técnicas (Cao *et al.*, 2009).

Entretanto em animais domésticos e, especialmente, em bovinos as taxas de blastocisto a partir de ovócitos vitrificados estão em torno de 5% a 10% (Sprícigo *et al.*, 2012; Sprícigo *et al.*, 2014; Sripunya *et al.*, 2014; Arcarons *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2015; Sprícigo *et al.*, 2015; Sprícigo *et al.*, 2016; Sprícigo *et al.*, 2017; Gutnisky *et al.*, 2020). Na tentativa de melhorar esses resultados, foi avaliado o melhor momento para vitrificação durante a maturação, e os resultados mostraram que a taxa de sobrevivência

pós-vitrificação não é afetada pelo estágio meiótico (Spricigo *et al.*, 2014; Mrowiec, Nowak, Kochan e Młodawska, 2019). Da mesma forma, a exposição do ovócito a substâncias antioxidantes com intuito de melhorar a crioresistência dos ovócitos (Arcarons *et al.*, 2015; Sprícigo *et al.*, 2017), não diminuiu os danos causados por essa técnica. O uso de methyl- β -ciclodextrina (M β CD) com intuito de provocar uma alteração na composição da membrana plasmática do ovócito (Spricigo *et al.*, 2012), e a utilização de ovócitos maturados *in vivo* (Spricigo *et al.*, 2015), também não foram capazes de melhorar a viabilidade pós-criopreservação de ovócitos bovinos. E, mais recentemente, o uso de uma nova técnica, a transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI), em que os ovócitos criopreservados foram injetados em um folículo de vacas ovuladoras para que pudessem ser maturados "*in vivo*", ovulados, fecundados e desenvolverem até o estágio de blastocisto em D7 (Sprícigo *et al.*, 2016) também não aumentou as taxas de produção de embriões. Essa alta sensibilidade dos ovócitos se deve provavelmente a suas características morfológicas e funcionais que o diferencia das outras células. Características como tamanho da célula, volume de água no seu interior entre outras características, o torna uma célula bastante diferenciada. Alguns estudos já mostraram que os danos citoplasmáticos são a principal causa da baixa viabilidade e baixa capacidade de desenvolvimento dos ovócitos após a vitrificação (Spricigo *et al.*, 2014; Hosseini *et al.*, 2015).

Outra alternativa para a preservação de material genético é a liofilização, que surge como uma opção para eliminar o custo associado com a estocagem de biomateriais em nitrogênio líquido, sendo possível armazenar material genético a temperaturas ambiente (Martins *et al.*, 2007). Quando espermatozoides de camundongos liofilizados e armazenados a 4°C foram utilizados na injeção intracitoplasmática, observaram que era possível produzir embriões e animais nascidos viáveis. Entretanto, quando os espermatozoides foram avaliados pós reidratação, não havia motilidade dos espermatozoides, além de um grande número de danos causados às estruturas dos mesmos (Wakayama e Yanagimachi, 1998). Martins e colaboradores mostraram em 2007 que a liofilização com meios contendo soluções a base etilenoglicol e trealose, protegem adequadamente o espermatozoide bovino, preservando a viabilidade de seu núcleo.

Em se tratando de gametas femininos, os estudos são mais escassos e poucos relatos são encontrados na literatura. Um dos poucos estudos relata a utilização de vesículas germinativas (VGs) de gatos que foram dissecadas na presença do dissacarídeo trealose e armazenados a 4°C por até 32 semanas. Após 1 a 4 semanas de armazenamento a integridade do DNA foi a mesma de ovócitos frescos, entretanto, o envelope nuclear apresentava fragmentação cujo grau de intensidade aumentou de acordo com o tempo de armazenamento, sendo maior naqueles armazenado por 32 semanas. Transferindo essas vesículas, que foram armazenadas por 2 a 4 semanas, para citoplasmas frescos após serem reidratadas, 73% delas retomaram a meiose após 24 horas de cultivo (Graves-Herring, Jennifer E., Wildt, David E. e Comizzoli, Pierre, 2013). Mais recentemente, Lee e Comizzoli em 2019, avaliaram o efeito da liofilização em vesícula germinativa (GV) comparado com VG vitrificadas. Concluíram que a incidência de danos à VG foi menor para aquelas liofilizadas em relação às vitrificadas (Lee e Comizzoli, 2019).

2.4 Transferência de Genoma (TG)

A TG consiste na transferência do material genético de ovócitos doadores maturo ou imaturo para um ovócito receptor previamente enucleado, tornando-o assim disponível para a PIVE e/ ou outras TRAs (Tachibana, Sparman e Mitalipov, 2010; Paull *et al.*, 2013; Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014). Entre as possibilidades da TG estão disponíveis a transferência de vesículas germinativas (VGs), pronúcleos (PN), corpúsculos polares (CPs) e placas metafásicas (PMs). Em humanos essa técnica vem sendo utilizada como tratamento para pessoas portadoras de mutações no mtDNA, impedindo a transmissão dessas doenças para seus descendentes através da substituição do citoplasma afetado por um saudável. Pode ser utilizada também por mulheres com idade avançada como uma forma de prevenção de problemas em ovócitos envelhecidos. Um estudo com camundongo mostrou que quando se transfere genoma de doadoras de 4 a 8 semanas em citoplasma de doadoras de 12 meses de idade e vice versa, ocorre uma melhora no desenvolvimento embrionário dessas estruturas após ativação, em relação ao grupo de ovócitos de doadoras de 12 meses de idade usado como controle (Yamada e Egli, 2017). E por fim, é também utilizada como uma possível ferramenta no tratamento

reprodutivo para mulheres que foram submetidas à quimioterapia e perderam sua fertilidade devido aos tratamentos com fármacos e/ou quimioterápicos.

Trabalhos com humanos e ratos, mostraram que as taxas de desenvolvimento embrionário da TG, utilizando VG, PM e PN foram similares às encontradas no grupo controle após a ICSI e/ou ativação partenogenética. Nesses estudos também foi mostrado que o mtDNA dos embriões produzidos pelas técnicas é realmente de seus doadores de citoplasma (Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Um estudo feito em camundongos com o objetivo de avaliar o transporte de mtDNA na TG utilizou VG, PM e PN como material genético. Seus resultados mostraram que a transferência de PM e PN proporcionaram uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário (90%/82% e 100%/86%, respectivamente) quando comparado com a TG de VG (0%/0%) e, que independente da forma do material genético utilizado, todas transportam quantidades insignificantes de mtDNA indesejado (Neupane *et al.*, 2014). Outro estudo feito em 2014 comparou as diferentes técnicas de TG (1° CP, 2° CP, PM, PN) quanto à produção de embriões e a quantidade de mtDNA transmitido do ovócito para as proles. Quanto ao desenvolvimento embrionário e a taxa de nascimento, a produção de embrião foi diferente apenas para as estruturas reconstruídas com 2°CP (55%), sendo menor que os demais grupos avaliados (87,5%, 85,7%, 81,3% respectivamente) e o controle (80%), que por sua vez não diferiram do grupo controle. O trabalho mostrou que qualquer forma de genoma é capaz de produzir embriões. Quanto à quantidade de mtDNA transferido do ovócito doador para o citoplasma receptor, as transferências de 1°CP, 2°CP e a PM apresentaram menor resqúcio de mtDNA, sendo o 1°CP com níveis não detectáveis de mtDNA doador nas proles. Sendo assim mostrou ser uma técnica eficiente para o tratamento de mulheres portadoras de mutação no mtDNA(Wang *et al.*, 2014).

2.4.1 Transferência de Vesícula Germinativa (TG-VG)

A maioria dos ovócitos encontrados nos ovários estão no estágio de diplóteno da prófase I, onde o material genético se apresenta dentro da Vesículas Germinativas (VG) e que durante a maturação vão sofrendo mudanças na organização até atingir o estágio

de metáfase II. A transferência de VGs é uma das formas de TG que tem sido utilizada para estudar a interação entre o núcleo e citoplasma, além de tratamento dos casos de mtDNA mutado (Zhang, 2015; Zhang e Liu, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Zhang e Liu (2015) mostraram em seu estudo que a TG-VG é um importante modelo de estudo para identificar fatores citoplasmáticos que possam restaurar a capacidade de maturação de ovócitos. Esses autores sugerem que a TG-VG seja capaz de restaurar a fertilidade de ovócitos mulheres mais velhas, transferindo a VG para citoplasmas de mulheres jovens. Wang e colaboradores (2016) transferindo VG de ratos em citoplasmas suíno e vice versa, e mostraram que o tempo de maturação da VG do suíno diminui quando inserida no citoplasma do rato, enquanto que a do rato inserida citoplasma suíno teve maior tempo de maturação. Esses autores concluíram que o citoplasma e seus componentes são os responsáveis tanto pela formação da placa metafásica no final da maturação quanto pelo tempo de duração da maturação *in vitro*.

A TG-VG também surge como uma alternativa para aproveitamento de material genético de ovócitos criopreservados ou desidratados/liofilizados. As VGs de ovócitos felinos submetidos à desidratação utilizando trealose, foram transferidas após a reidratação para citoplasmas frescos e foram maturados *in vitro*. Dos ovócitos reconstruídos e submetidos à maturação, 73% retomou a meiose e mais de 20% das estruturas completaram a maturação. Esses resultados mostram que é possível a associação da preservação de material genético com a técnica de reconstrução de ovócitos (Graves-Herring, J. E., Wildt, D. E. e Comizzoli, P., 2013). Em bovinos, Luciano e colaboradores em 2009, avaliaram o melhor método de criopreservação (congelamento lento ou vitrificação) para ovócitos bovinos imaturos desnudos, e posteriormente submeteram os ovócitos criopreservados a TG-VG. A vitrificação foi o método de eleição e, portanto, ovócitos vitrificados foram utilizados para a TG-VG. Os ovócitos reconstruídos com VG de ovócitos vitrificados apresentaram capacidade de maturação semelhante aos submetidos à TG-VG com VG de ovócitos frescos, mostrando que a técnica pode ser uma ferramenta para a preservação de animais raros ou em risco de extinção (Luciano *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram obtidos por Franciosi e colaboradores (2010), que observaram que a taxa de maturação de gametas reconstruídos com VG de ovócitos fresco e criopreservado não diferiu entre os grupos. Entretanto, esses autores também avaliaram a taxa de blastocisto após ativação

partenogenética (AP), que foi maior quando utilizaram ovócitos frescos reconstruídos comparados aos gametas criopreservados (30,8% e 8,1%). Esses resultados sugerem que apesar da produção de embriões ser menor quando se usa ovócitos vitrificados, a TG-VG é eficaz para obtenção do carioplasto com <5% de mtDNA, tornando-se uma possível ferramenta para o tratamento de mulheres com mutações no mtDNA e para viabilizar o uso de ovócitos com citoplasma danificado (Franciosi *et al.*, 2010).

2.4.2 Transferência de Placa Metafásica e Corpúsculo Polar (TG-PM e TG-CP)

Diferente de ovócitos imaturos, os ovócitos que completaram a primeira divisão meiótica apresentam material genético em duas formas diferentes: Placa Metafásica (PM) e Corpúsculo Polar (CP). O CP, que é expulso no final da maturação, contém a mesma informação genética do ovócito maduro, o que torna possível reconstruir dois ovócitos por TG a partir de um único ovócito maturado, multiplicando assim as possibilidades de sucesso da técnica.

O fato das estruturas reconstruídas com PM não necessitarem de uma maturação prévia a fecundação, elimina uma etapa do processo de produção de embriões que poderia comprometer os resultados. A TG de PM foi utilizada em macaco Rhesus para avaliar a possibilidade de sua utilização em mulheres portadoras de mutação no mtDNA. Os estudos mostraram que a técnica permite um transporte mínimo de mtDNA mutado sem afetar a capacidade dos ovócitos de serem fecundados, de se desenvolverem em embrião viável e, darem origem a novos indivíduos saudáveis (Tachibana *et al.*, 2009). Esses mesmos autores utilizando ovócitos humanos mostraram que a TG-PM apresentou taxas de blastocistos (43%) semelhantes ao grupo controle (67%) após serem submetidos à ICSI (Tachibana *et al.*, 2013). Além disso, mostraram que o mtDNA dos embriões produzidos pela técnica de TG-PM era, em sua totalidade, dos ovócitos doadores de citoplasmas, mostrando a capacidade da técnica em impedir a transmissão de mtDNA mutado para as proles. Após a obtenção desses resultados com ovócitos frescos, os autores propuseram a utilização da técnica com PM de ovócitos criopreservados, para superar a dificuldade de sincronização entre doadoras e receptoras. Utilizando ovócitos de macacos vitrificados, transferindo a PM de ovócitos frescos para citoplasmas vitrificados, verificaram que a vitrificação afetou o citoplasma

provocando baixas taxas de blastocisto. Entretanto, quando utilizaram PM de ovócito vitrificado transferido para citoplasma fresco, observaram que as taxas de produção de embrião (68%) foram semelhantes as do grupo controle (57%), resultando no nascimento de animais (Tachibana *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram relatados por Paull e colaboradores (2013), que mostraram que a TG-PM não afetou a capacidade dos ovócitos vitrificados reconstruídos de serem ativados e de se desenvolverem a blastocisto (37%). Também relataram que a quantidade de mtDNA detectada no início do processo foi de menos de 1% e que após a diferenciação das células esse mtDNA não foi mais detectável no embrião (Paull *et al.*, 2013).

Ding e colaboradores (2014) compararam a capacidade de desenvolvimento embrionário de estruturas reconstruídas a partir de ovócitos humanos maturados *in vivo* e *in vitro* transferidas para citoplasma maturados *in vivo* e *in vitro*. Esse estudo mostrou que não houve diferença entre os grupos na sobrevivência, ativação e clivagem. Para a taxa de embrião com oito células no D3 e taxa de blastocisto no D6 não houve diferença quando o material genético maturado *in vivo* foi usado na TG-PM (50% e 35,7%) quando comparado ao respectivo grupo controle maturado *in vivo* (45,5%). O mesmo foi visto para material genético maturado *in vitro* utilizado na TG-PM (5,6% e 0%) quando comparado ao seu respectivo controle maturado *in vitro* (2,9%). Os autores concluíram que a TG-PM com PM de ovócitos vitrificados suportam o desenvolvimento *in vitro*, e que o citoplasma maturado *in vivo* apresenta melhor desempenho no desenvolvimento das estruturas reconstruídas, sendo recomendado como doadores de citoplasmas (Ding *et al.*, 2014).

Recentemente, foi relatado o nascimento de uma criança saudável após o uso da técnica de TG-PM (Zhang, J. *et al.*, 2017). Esse caso se tratava de uma paciente com histórico de perdas embrionárias e morte de indivíduos nascidos provocadas por doenças relacionadas a mutação do mtDNA. A PM de ovócitos maduros dessa paciente foi transferida para o citoplasma receptor de doadoras saudáveis e um blastocisto euplóide produzido foi transferido para a paciente, sendo que a criança nascida tinha menos de 10% seu mtDNA mutado. Esses estudos reforçam cada vez mais que é possível a utilização da TG-PM como alternativa para esses indivíduos portadores de mtDNA mutado assim como para outras situações de comprometimento do citoplasma.

A utilização do CP na TG apesar de menos utilizada, apresenta várias vantagens em relação as outras formas de material genético. Entre elas, pode-se citar o fato de que apesar de ser produto de uma meiose, apresenta uma quantidade mínima de organelas e mtDNA, é de fácil visualização na hora da remoção e reconstrução das estruturas, além de já ter sido expulsa do citoplasma e, por fim, por possibilitar a reconstrução de duas estruturas a partir de um único ovócito (Wang *et al.*, 2014). A comparação entre as diversas formas de TG em murinos mostrou que as estruturas submetidas à TG pelas diferentes formas de material genético (1°CP, 2°CP, PM e PN) possuem capacidade de serem fecundadas e de produzir nascimentos. Além disso, análises genéticas mostraram que os indivíduos F1 gerados a partir de CP apresentaram menor quantidade de mtDNA em relação as outras formas de material genético. A partir desses resultados, os autores concluíram que esse modelo de tratamento utilizando CP apresentou grande potencial para prevenir a transmissão de mtDNA mutado (Wang *et al.*, 2014).

Tem sido mostrado que o CP é capaz de se reprogramar de novo em placa metafásica em 60 minutos após a fusão e, que essa estrutura resultante é capaz de ser fecundada e se desenvolver em embrião sem nenhuma alteração nos seus perfis genômicos (Ma *et al.*, 2017). Além disso, quando ovócitos criopreservados foram utilizados, os embriões gerados foram capazes de chegar ao estágio de blastocisto (Zhang, S.-P. *et al.*, 2017). Apesar da semelhança com o 1°CP, quando se trata da transferência de 2°CP em substituição ao pronúcleo feminino, os resultados são insatisfatórios. Isso se dá pelo fato do pronúcleo gerado a partir do 2° corpúsculo ser menor e apresentar cromatina mais condensada do que um pronúcleo feminino normal, provocando uma assíncronia com ciclo celular do zigoto receptor (Wang *et al.*, 2014; Zhang, S.-P. *et al.*, 2017).

CAPITULO 2



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRANSFERÊNCIA DE GENOMA EM OVÓCITOS BOVINOS FRESCOS E
VITRIFICADOS: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES**

Caixeta F.M.C^a; Leme L.O^b; Vargas L. N^c; Kawamoto T.S^c; Fidelis A.A.G^a; Franco,
M.M^{c,d}.; Dode M.A.N^{a,d}.

^a Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brasil.

^b Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES, Brasil.

^c Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil.

^d Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias, Laboratório de Reprodução animal, Brasília-DF, Brasil.

**BRASÍLIA/DF
MARÇO DE 2020**

RESUMO

A transferência de genoma (TG), o qual permite substituir um citoplasma danificado por um íntegro, pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da criopreservação de ovócitos bovinos. Neste trabalho objetivou-se estabelecer a técnica de TG utilizando a placa metafásica (PM) e corpúsculo polar (CP) de ovócitos bovinos como fontes do material genético. Para isso foram realizados quatro experimentos. No primeiro foi estabelecida a TG utilizando a PM (TG-PM) avaliando a concentração espermática a ser utilizada, a taxa de fecundação, a de polispermia e a de embriões. Na avaliação da concentração espermática, a taxa de fecundação foi maior ($P < 0,05$) no grupo controle (76,1%) do que no TG-PM fecundados com 1×10^6 sptz/ml (46,9%) e com $0,5 \times 10^6$ sptz/ml (46%), que não diferiram entre si. Com relação à produção de embriões o grupo TG-PM apresentou taxas de clivagem (50%) e blastocisto (13,6%) inferiores ao grupo controle (80,2% e 32,6%,). No segundo experimento foram avaliados os mesmos parâmetros do primeiro, porém com estruturas submetidas à transferência de corpúsculo polar (TG-CP). Os resultados mostraram que o grupo TG-CP apresentou taxa de fecundação (82,3% x 96,2%) e de blastocisto (7,7% x 36,8%) inferiores, mas a taxa de clivagem (88,5% x 85,3%) semelhante ao grupo controle. No terceiro experimento foi avaliado o efeito da TG-PM e TG-CP na quantidade e distribuição de Grânulos Corticais (GC), Mitocôndrias (MT) e número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA). A quantificação do GC foi semelhante ($p > 0,05$) entre as estruturas reconstruídas GT-PM ($n = 22$) e GT-CP ($n = 20$). No entanto, ambos os grupos apresentaram menos GC ($p < 0,05$) que os grupos controle ($n = 22$) e enucleados ($n = 20$). Para distribuição do GC, o grupo GT-PM apresentou menos estruturas com distribuição periférica, diferente dos grupos controle e enucleado ($p < 0,05$), mas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo GT-CP ($p > 0,05$). Não foi observado diferença entre os grupos quanto a quantidade e distribuição de MT e quantidade de mtDNA. No quarto experimento foi realizada a TG-PM utilizando ovócitos vitrificados (TG-PMV) como fonte de material genético. Para isso, foram utilizados 3 grupos, TG-PMV, controle vitrificado (VIT) e controle PIVE. A taxa de clivagem do grupo TG-PMV (61,2%) foi semelhante ao grupo controle VIT (52,7%) e inferior ($p < 0,05$) ao grupo controle PIVE (81,25%). Já a taxa de blastocisto não se diferiu do grupo controle VIT (8,9% e 3,6%) porém foram menores que o grupo

controle PIVE (33,9%). Os resultados obtidos sugerem que as estruturas reconstruídas pela técnica de TG-PM e TG-CP são capazes de se desenvolver em embrião, e podem ser fecundados usando o mesmo protocolo utilizado na PIVE, sem aumento na taxa de polispermia. Além disso, os resultados mostraram que é possível produzir embriões por TG a partir de ovócitos vitrificados, possibilitando o uso de material genético armazenado em banco de germoplasma.

Palavras-Chaves: Produção *in vitro* de embriões, cryotop, micromanipulação.

ABSTRACT

Genome transfer (GT), which allows the replacement of a damaged cytoplasm by an intact cytoplasm, is an alternative to increase the efficiency of crypreservation of bovine oocytes. Therefore, we aim to establish the GT technique in bovine oocytes using metaphasic plate (MP) and polar body (PB) as sources of genetic material. To do that, four experiments were carried out. In the first experiment, GT was established using MP (GT-MP). In the evaluation of sperm concentration, the fertilization rate in the control group (76.1%) was higher ($p < 0.05$) than that of GT-MP fertilized with 1×10^6 sptz/ml (46.9%) and GT-MP fertilized with 0.5×10^6 sptz/ml (46%), which did not differ between them. However, the rate of polyspermy was similar ($p > 0.05$) between groups. Regarding embryo production, in GT-MP group cleavage (50%) and blastocyst rates (13.6%) were lower than the IVP control group (80.2% and 32.6%, respectively). In the second experiment, the same parameters as the first were evaluated, but instead of the metaphase II, the polar body (GT-PB) was used. The results showed that the GT-PB group had lower fertilization rate (82.3% x 96.2%) and a blastocyst (7.7% x 36.8%) than control group, but the cleavage rate (88.5% x 85.3%) was similar between them. . In the third experiment, the effect of micromanipulation on the amount and distribution of Cortical Granules (CG), Mitochondria (MT) and number of copies of mitochondrial DNA (mtDNA) was evaluated. For this, four groups were used, GT-MP, GT-PB, enucleated and control intact group. CG quantification was similar ($p > 0.05$) between the reconstructed structures GT-MP ($n = 22$) and GT-PB ($n = 20$). However, both groups had less CG ($p < 0.05$) than the control ($n = 22$) and enucleated ($n = 20$) groups. For CG distribution, the GT-MP group had fewer structures with peripheral distribution, different from the control and enucleated groups ($p < 0.05$), but there was no significant difference in relation to the GT-PB group ($p > 0.05$). There was no differences between groups regarding the amount and distribution of MT and the amount of mtDNA. In the fourth experiment, GT-MP was performed using vitrified oocytes (GT-VMP) as a source of genetic material. Cleavage rate of the TG-PMV group (61.2%) was similar to the VIT control group (52.7%) and lower ($p < 0.05$) than the control IVP group (81.25%). The blastocyst rate did not differ from the control VIT group (8.9% and 3.6%) but were lower than the control group PIVE (33.9%). The results obtained suggested that the structures reconstructed by the TG-PM and TG-CP technique are

capable of developing in embryo, and can be fertilized using the same protocol used in IVEP. In addition, the results showed that it is possible to produce embryos by TG from vitrified oocytes, which provides a new alternative to use genetic material stored in a germplasm bank.

Key-words: *in vitro* embryo production, cryotop, micromanipulation.

INTRODUÇÃO

O armazenamento de gametas femininos é uma técnica essencial para os programas de conservação, pois permite a preservação dos recursos genéticos de animais domésticos e selvagens. Além disso, a criopreservação de ovócitos é fundamental para a reprodução assistida em humanos e para gerenciamento de receptoras em programas comerciais de produção *in vitro* de embriões (PIVE.) Em alguns casos, a logística ou a distância dos centros reprodutivos podem limitar a utilização de material genético de animais domésticos ou mesmo selvagens. Com a criopreservação é possível armazenar e manter esse material por longos períodos, permitindo um melhor uso em biotecnologias reprodutivas ou bancos de germoplasma.

Embora a criopreservação de embriões PIVE de animais domésticos tenha avançado nos últimos anos, a criopreservação de ovócitos permaneceu com baixas taxas de sobrevivência, sendo um grande desafio para os pesquisadores da área de criobiologia (Arcarons *et al.*, 2015; Arav *et al.*, 2018; Mrowiec, Nowak, Kochan, Odawska, *et al.*, 2019). Vários estudos foram realizados usando diferentes métodos de criopreservação de ovócitos, e atualmente o método mais utilizado é a vitrificação pela técnica de Cryotop (Kuwayama, Masashige *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2009; Cobo *et al.*, 2015b; Fisch e Abir, 2018b). Embora essa técnica tenha bons resultados em ovócitos humanos e de camundongos (Cao *et al.*, 2009; Cobo *et al.*, 2015b; Arav *et al.*, 2018), em animais domésticos e selvagens que apresentam alto conteúdo lipídico no citoplasma, os resultados ainda são insatisfatórios.

Estudos em nosso laboratório usando metil- β -ciclodextrina (M β CD) na tentativa de alterar a composição da membrana plasmática dos ovócitos (Spricigo *et al.*, 2012), ou usando ovócitos maturados *in vivo* (Spricigo *et al.*, 2015), o qual seria de melhor qualidade, não mostrou melhora na resposta à vitrificação. Além disso, a vitrificação em diferentes estágios da meiose (Spricigo *et al.*, 2014), ou exposição de ovócitos a agentes antioxidantes que melhoram a resistência à criopreservação (Arcarons *et al.*, 2015; Spricigo *et al.*, 2017), também não reduziram os danos causados por essa técnica. Possivelmente, isso se deve a características únicas dos ovócitos, como tamanho da célula, volume de água no citoplasma e organização do citoesqueleto. De fato, a análise por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que os principais danos observados

nos ovócitos bovinos após a vitrificação estão localizados no citoplasma (Spricigo *et al.*, 2014).

Considerando os danos citoplasmáticos causados pela criopreservação, uma possibilidade de manter o material genético dos ovócitos criopreservados seria usar seu genoma, transferindo-o para um citoplasma novo. Esse procedimento é denominado Transferência de Genoma (TG) e já foi relatado em humanos, ratos e felinos (Tachibana, Sparman e Mitalipov, 2010; Graves-Herring, J. E., Wildt, D. E. e Comizzoli, P., 2013; Paull *et al.*, 2013; Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014; Otsuki, Nagai e Sankai, 2014; Wang *et al.*, 2014). Em humanos, o principal objetivo do uso dessa biotecnologia é impedir a transmissão de algumas doenças relacionadas a mutações no DNA mitocondrial (mtDNA). A TG pode ser realizado usando o material genético de ovócitos em diferentes formas de organização, como a vesícula germinativa (VG), placa metafásica (PM), corpúsculo polar (CP) e Pronucleos (PN). Estudos com ovócitos de humanos e ratos mostraram que as taxas de desenvolvimento embrionário de ovócitos de TG usando VG, PM e PN foram semelhantes às encontradas no grupo controle após ICSI e/ou ativação partenogenética (AP). Nesses estudos, também foi demonstrado que o mtDNA dos embriões produzidos pela técnica TG é realmente de seus doadores de citoplasma (Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Existem poucos relatos na literatura de TG com ovócito de animais selvagens ou domésticos. Já foi demonstrado que o uso da TG com VG de ovócitos felinos submetidos à desidratação com trealose (Graves-Herring, J. E., Wildt, D. E. e Comizzoli, P., 2013) e de bovinos (Luciano *et al.*, 2009; Franciosi *et al.*, 2010) é possível, mas a capacidade dos ovócitos reconstruídos de completar a maturação era reduzida. Entretanto, o uso de PM e CP em bovinos ainda não foi relatado e, considerando que o uso dessas estruturas envolve um ovócito já maturado é possível que os danos causados pela micromanipulação sejam menores, além de possibilitar a reconstrução de duas estruturas a partir de um único ovócito doador, e assim aumentar a eficiência da técnica.

É importante ressaltar também que muitas espécies comerciais, ameaçadas de extinção e selvagens têm ovócitos com características semelhantes aos ovócitos

bovinos, portanto essa técnica pode ser uma alternativa para evitar o desperdício de material genético também em outras espécies. Embora os relatos usando a técnica em animais sejam muito escassos, traz uma nova perspectiva para preservar e uso de material genético importante. Portanto, este trabalho tem como objetivo estabelecer diferentes técnicas de TG utilizando ovócitos bovinos como modelo e avaliar a viabilidade de seu uso em ovócitos submetidos à criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes utilizados neste estudo, ao menos que indicados, foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, USA).

1. Recuperação e seleção dos ovócitos

Ovários de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) foram coletados em abatedouro local imediatamente após o abate e, transportados até o laboratório, em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos (estreptomicina - 100µg/ml e penicilina G - 100UI/ml) à temperatura de 35-36°C. O tempo do abate até o início da aspiração dos folículos não ultrapassou o período de 6 horas.

Foram aspirados folículos de 3-8 mm de diâmetro com seringas de 10ml e agulhas 18G e, o conteúdo folicular foi depositado em tubos plásticos de 15ml (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça). Após a sedimentação do conteúdo, foram removidos 10mL de líquido folicular sobrenadante que foram centrifugados por 5 minutos à 700g e, utilizados para procura e seleção dos complexos cumulus ovócitos (CCOs). Foram utilizados no experimento apenas CCOs que possuíam quatro ou mais camadas de células do cumulus (CC) e citoplasma homogêneo.

2. Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs foram maturados em número de 30 a 35 em gotas de 200µl de meio de MIV, por um período 21 horas, à 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. O meio MIV consistiu de TCM 199 sais de Earl's (GIBCO® by Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO®), 0,01UI/ml de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), 0,1mg/ml de L-glutamina, 0,075mg/ml de Amicacina, 0,1µM/ml de Cisteamina e 0,2mM de Piruvato de Sódio. As gotas de cultivo eram cobertas com óleo siliconado (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING®, New York, Canton, USA).

3. Seleção e preparo dos ovócitos para micromanipulação

Após a MIV os CCOs foram removidos das gotas de maturação e transferidos para tubos tipo eppendorf contendo 1ml de solução de hialuronidase a 0,2% em

TCM199 Hank's. Os CCOs retornaram a estufa por 5 minutos e, posteriormente, foram agitados em vortex por 3 minutos, para completa remoção das CC. Somente os ovócitos que apresentavam corpúsculo polar (CP) e citoplasma homogêneo foram selecionados para a micromanipulação. Os ovócitos foram então, transferidos para gotas de 50µl de solução de meio MIV contendo Hoechst 3342 (3µg/ml) e Citocalasina D (5µg/ml), onde foram mantidos por 30 minutos à 38,5°C e 5% CO₂ em ar. Logo após, foram transferidos em grupos de cinco para gotas de 30µl de meio de lavagem (LAV), composto de TCM-199 com sais de Hank's, suplementado com 10% SFB, Amicacina 0,075mg/ml, cobertas com óleo mineral onde passaram por todo processo de enucleação e reconstrução durante a micromanipulação.

4. Transferência de placa metafásica (TG-PM) e corpúsculo polar (TG-CP)

Para a micromanipulação, os ovócitos foram fixados individualmente à pipeta holding, feita com capilar de vidro, de forma que o corpúsculo polar permanecesse na posição de 4h. Para obtenção do citoplasma receptor, foi realizada a enucleação de ovócitos maturados com auxílio de uma pipeta de aspiração de vidro com diâmetro de 15-20µm, com a qual foi aspirado o CP e uma porção do citoplasma adjacente, onde se encontra a placa metafásica (PM). Para a reconstrução, a PM ou o CP de um ovócito doador de material genético, foi injetada no espaço perivitelino (EP) do citoplasma receptor previamente enucleado. Após a injeção as estruturas foram então transferidas para solução de D- Manitol a 0,28M contendo 0,1mM de MgSO₄, e foram submetidas ao processo de eletrofusão em fonte ECM 200 (BTX®). A eletrofusão foi realizada em câmara de fusão através da geração de dois pulsos elétricos com carga de 2,1kVA/cm, com 30µs de duração. Logo após, os ovócitos retornaram ao meio MIV, onde foram mantidos por 30 minutos, para posterior avaliação da reconstrução. Aqueles ovócitos que receberam a PM foram considerados reconstruídos quando 30 minutos após a eletrofusão apresentavam a porção contendo a PM no citoplasma receptor e não no espaço perivitelínico.

Já para os que receberam o CP, a reconstrução foi avaliada de maneira diferente dos TG-PM. Isso porque o CP pode se romper durante a eletrofusão e ficar transparente, dificultando a avaliação da reconstrução. Portanto, a confirmação da reconstrução foi

observada durante a avaliação da fecundação ou da clivagem, ou seja, pela presença de pronúcleo masculino e feminino ou pela divisão celular.

5. Ativação partenogenética (AP)

Para a ativação partenogenética as estruturas fusionadas foram ativadas pela incubação por 5 min em solução LAV contendo Ionomicina ($5\mu\text{M}$) e, posteriormente, por 4 horas em meio de cultivo embrionário contendo $2\mu\text{M}$ de 6-Dimethylaminopurina (6DMAP). O meio de cultivo utilizado foi o fluido sintético de oviduto (SOFaaci), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, $0,34\text{mM}$ de sodium tri citrato $2,77\text{mM}$ de myo-inositol e 5% SFB (Gibco) (Holm *et al.*, 1999). No experimento em que foi realizada a AP, simultaneamente aos ovócitos micromanipulados, cerca de 20 a 30 ovócitos desnudos com presença de CP e citoplasma homogêneo, foram submetidos aos mesmos procedimentos de ativação, e utilizados como grupo controle (AP).

6. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Após a micromanipulação as estruturas reconstruídas foram transferidas para gotas de $200\mu\text{l}$ de meio de fecundação, que consistia de meio *Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate* (TALP), suplementado com $0,5\text{mM/ml}$ de penicilamina, $0,25\text{mM/ml}$ de hipotaurina, 25mM de epinefrina e $10\mu\text{g/ml}$ de heparina. Sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Nelore, previamente testado para o a produção *in vitro* de embriões, foi utilizado para todos os tratamentos e réplicas. Após o descongelamento, os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de Percoll (GE[®] Healthcare, Piscataway, NJ, EUA), utilizando 90% ($400\mu\text{l}$) e 45% ($400\mu\text{l}$) em microtubos de $1,5\text{ml}$, centrifugado por 5 minutos a 9000rpm . O pellet obtido foi resuspendido e adicionado na gota de fecundação de forma a se obter a concentração final de 1×10^6 espermatozoides móveis/ml e/ou $0,5 \times 10^6$ espermatozoides móveis/ml. Os ovócitos foram co-incubados com os espermatozoides a $38,5^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 em ar, por um período de 18 horas. O dia da inseminação foi considerado como dia 0 (D0).

Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de $200\mu\text{l}$ de meio de cultivo embrionário SOF em atmosfera de 5% de CO_2 5% de O_2 e 90% de N_2 , por sete dias. Em

todos os experimentos os embriões foram avaliados quanto à clivagem em D2 e a formação de blastocistos em D7.

Para avaliar a taxa de fecundação os ovócitos foram removidos do cultivo 18h após a inseminação, foram fixados com ácido acético: álcool (1: 3), e corados com uma solução de 1% de lacmóide em 45% de ácido acético glacial. Os ovócitos foram examinados sob um microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, x1000 de aumento) e classificadas como: (a) não fecundados - presença de cromatina do ovócito e ausência de cromatina do espermatozoide; (b) fecundados - presença de cromatina do ovócito e espermatozoide no citoplasma, cabeça do espermatozoide descondensada, pró-núcleos ou clivada; (c) polispérmicos- presença de mais de duas cromatinas ou duas cromatinas e presença de cabeça de espermatozoide; ou (d) anormal- cromatina desorganizada ou não identificável.

7. Vitrificação e aquecimento de ovócitos

A vitrificação de ovócitos foi realizada como descrito anteriormente (Kuwayama, Masashige *et al.*, 2005) com pequenas modificações. Uma solução de manutenção (SM), composta por TCM-199 tamponado com HEPES (Invitrogen® Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 20% de SFB, foi utilizado para manipular ovócitos durante os procedimentos de vitrificação e aquecimento. Para a vitrificação, os grupos foram lavados em uma solução de equilíbrio composta por 7,5% de etileno glicol e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e transferidos para uma solução de vitrificação consistindo de 15% de etileno glicol, 15% de DMSO e 0,5M de sacarose em SM. Em seguida, os ovócitos foram colocados em uma haste tipo *cryotop*, em grupos de 5 a 10 estruturas e foram imediatamente submersos em nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado no dia da micromanipulação, imergindo a extremidade do *cryotop* contendo as estruturas por 1 min em uma gota de SM suplementada com sacarose 1M a 37°C. Os ovócitos foram então, transferidos para o meio SM suplementado com sacarose 0,5M por 3 min e, finalmente, para a solução de manutenção original. Posteriormente, os ovócitos foram colocados em placas de micromanipulação ou fecundação *in vitro*.

8. Teste paternidade de embriões

Para realizar a TG, independentemente da forma de organização do material genético utilizada, os ovócitos tinham que ser submetidos à eletrofusão, para que o núcleo transferido pudesse ser incorporado ao citoplasma receptor. Portanto, para garantir que os embriões produzidos por essa técnica fossem realmente produto da interação ovócito-espermatozoide e não o resultado do processo de ativação induzido pela fusão, uma amostra de embriões produzidos em todos os experimentos foi usada para teste de paternidade. Embriões e sêmen usados para fecundação *in vitro* foram enviados a um laboratório comercial para realização desse teste.

9. Coloração de grânulos corticais (GC)

Ovócitos micromanipulados foram lavados 3 vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com Polivinilpirrolidona a 0,1% (PVP) e foram fixados em PBS contendo 3,7% de paraformaldeído (PFA) a 37°C por 30 min. Após três lavagens em solução de PBS-BSA [PBS com albumina sérica bovina a 0,3% (BSA)], os ovócitos foram permeabilizados com PBS contendo 0,1% de Triton X-100 e 10µg/ml de iodeto de propídio a 37°C por 15 min. Após três banhos em solução de PBS-PVP, os ovócitos foram transferidos para PBS contendo Triton X-100 a 0,1% e isotiocianato de fluoresceína conjugado com Lectina de *Arachis hypogaea* (amendoim) (FITC-PNA) a 20µg/ml por 30 minutos no escuro a 37°C. Após serem lavados três vezes em PBS-PVP, foram examinados em microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os ovócitos foram classificados em quatro padrões de distribuição de GC: (i) periféricos, GCs distribuídos adjacentes à membrana plasmática como em ovócitos maturados; (ii) cortical, a maioria dos GCs localizados na região do córtex como em ovócitos parcialmente maturados; (iii) GCs homogêneos espalhados por todo o citoplasma como em ovócitos imaturos; (iv) cluster, grandes agregados de GCs distribuídos no citoplasma como ovócito degenerado (Figura 2).

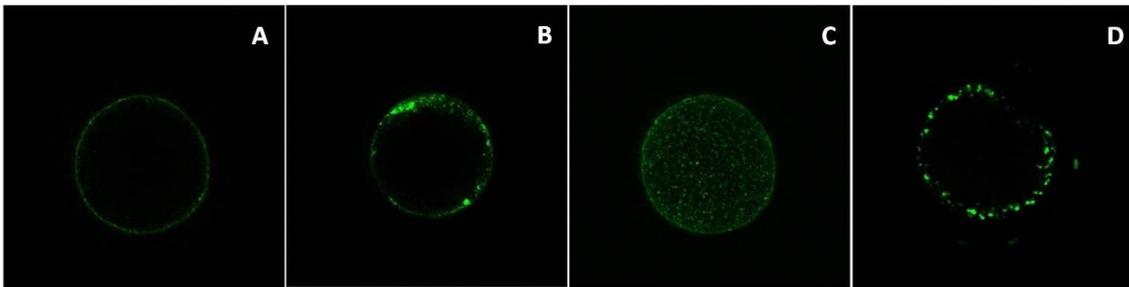


Figura 2. Distribuição dos grânulos corticais (GC) em corte medial de imagem de microscopia confocal, de ovócitos submetidos à coloração com FITC-PNA. E classificadas em: (A) periféricos, GCs distribuídos adjacentes à membrana plasmática; (B) cortical, a maioria dos GCs localizados na região do córtex; (C) homogêneos, GCs espalhados por todo o citoplasma; (D) cluster, grandes agregados de GCs distribuídos no citoplasma.

10. Coloração de mitocôndrias

Para determinar o padrão de distribuição mitocondrial e quantificação das mesmas, os ovócitos foram corados com MitoTracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) conforme descrito por Stojkovic e colaboradores (Stojkovic *et al.*, 2001). Resumidamente, ovócitos desnudados foram incubados em solução de triton x100 a 0,1% por 15 min a 38,5°C no escuro. Após três lavagens em solução de PBS-PVA [PBS com álcool polivinílico a 0,1% (PVA)], os ovócitos foram incubados em uma solução 200nM de MitoTracker Green com 10µg/ml de iodeto de propídio em PBS, por 30min a 38,5°C. Após três lavagens adicionais, as amostras foram examinadas em um microscópio confocal de varredura a laser (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os ovócitos foram classificados em três padrões de distribuição de mitocôndrias: (i) distribuição difusa, as mitocôndrias estavam dispersas por todo o citoplasma; (ii) distribuição semi-periférica, as mitocôndrias foram distribuídas de maneira desigual no citoplasma; (iii) distribuição periférica, as mitocôndrias estavam localizadas abaixo da membrana plasmática (Figura 3). A quantificação foi realizada no *software ImageJ* levando em consideração a quantidade de pixel detectada na imagem coletada em corte medial de imagens obtidas por microscópio confocal (Leica).

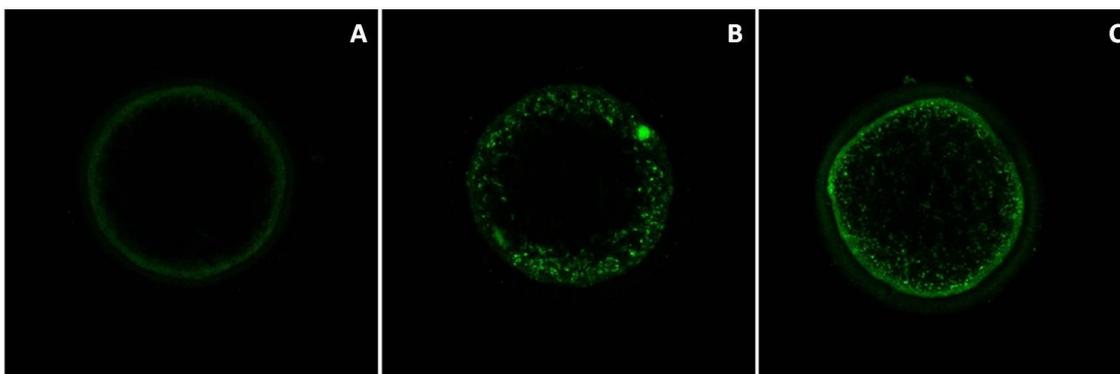


Figura 3. Distribuição mitocondrial (MT) em corte medial de imagem de microscopia confocal, de ovócitos submetidos à coloração com MitoTracker® Green FM a base de carboxianina.: As estruturas foram classificadas como: (A) distribuição periférica, as mitocôndrias estavam localizadas abaixo da membrana plasmática.; (B) distribuição semi-periférica, as mitocôndrias foram distribuídas de maneira desigual no citoplasma; (C) distribuição difusa, as mitocôndrias foram dispersas por todo o citoplasma.

11. Quantificação de DNA mitocondrial (mtDNA)

A quantificação do número de cópias de mtDNA foi realizada por PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI 7500 HT Fast PCR (Applied Biosystems). Para isso, dois conjuntos de primers (Tabela 1) foram desenhados para o gene MTND1 (número de acesso ao "GenBank" AF492351.1) do genoma mitocondrial bovino. Para realizar a quantificação absoluta do DNA mitocondrial nas amostras, uma curva padrão foi gerada como descrita no parágrafo abaixo.

Uma amostra de DNA genômico extraída de sangue de bovinos foi submetida amplificação por PCR para o gene MTND1, utilizando os "primers" ND1 OUT [(Tabela 1) ilustrado na figura 4 pelo fragmento vermelho no vetor]. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 20µl compreendendo 1 × Taq buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,8mM dNTPs, 1 U Platinum™ Taq polimerase (Invitrogen, CA, EUA), 0,5µM de cada "primer" (forward e reverse) e 2µl de DNA genômico. As reações foram realizadas com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4min, seguida por 38 ciclos a 95°C por 30s, 54°C por 49s e 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 15 min. Todo o volume da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% e os "amplicons" foram purificados a partir do gel de agarose usando o kit Wizard SV Gel end PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os "amplicons" purificados foram clonados usando o TOPO

TA Cloning vetor (pCR®2.1-TOPO®vector system, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transferidos para células DH5 α usando um protocolo de choque térmico. O DNA plasmidial foi isolado usando o Pureyield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e cinco amostras de plasmídeo contendo o inserto foram sequenciadas usando BigDye®cycle sequencing chemistry e um sequenciador automático ABI3100. Após o sequenciamento foi confirmado 100% de identidade do inserto clonado com a sequência depositada no "GenBank" do gene MTND1 (número de acesso AF492351.1) (Figura 5). Este DNA plasmidial sequenciado foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV – Vis e diluído em série para gerar curvas padrão para quantificação absoluta do número de cópias do mtDNA nas amostras.

Para avaliação da quantidade de mtDNA foram utilizados 20 ovócitos de cada tratamento, que foram individualmente analisados. O DNA total foi isolado de cada ovócito (n=20) usando o protocolo de lise descrito por Iwata e colaboradores (2011)(Iwata *et al.*, 2011). Resumidamente, os ovócitos foram lisados em 8 μ l de tampão de lise (Tris 20mM, 0,4mgmL⁻¹ de pronase K, 0,9% de triton X100 e 0,9% de Tween 20) a 55°C por 30 min, seguido por 95°C por 10 min. E então foi realizado o qPCR usando um ensaio GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) utilizando os primers ND1 INNER (Tabela 1 e Figura 4). As condições do qPCR foram de 95°C por 2:30 min, seguidos de 40 ciclos de amplificação com 5s de desnaturação a 95°C, 30s de anelamento a 61°C e 30s de extensão a 72°C. Cada reação de qPCR incluiu 0,1mM de cada primer (forward e reverse), 12,5 μ l de GoTaq Mix e 10 μ l de DNA em um volume final de 25 μ l. A especificidade dos ensaios de qPCR foi observada devido à presença de um único pico nas curvas de "melting".

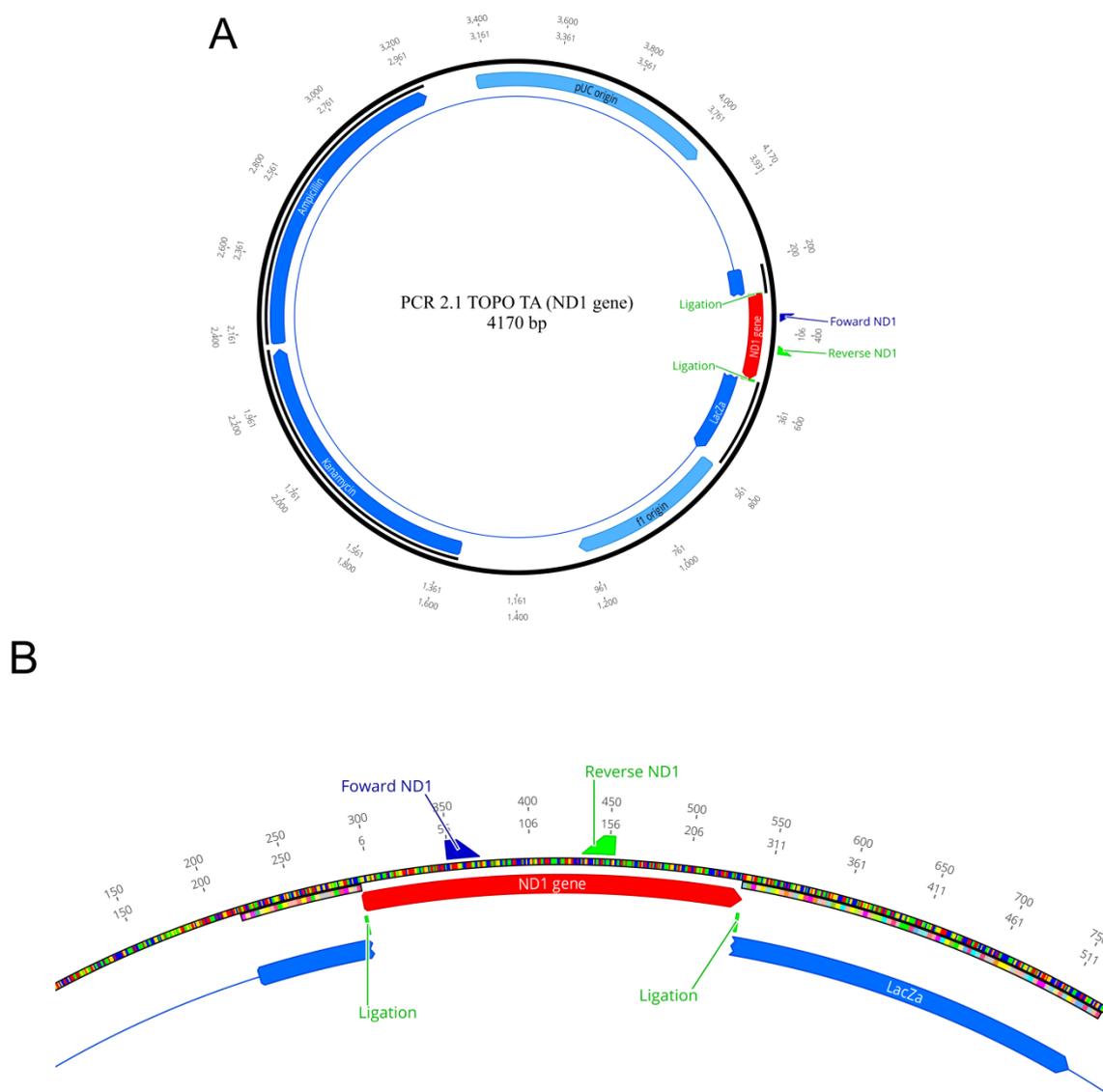


Figura 4. (A) Estrutura do DNA mitocondrial de *Bos taurus*. (B) localização dos "primers" utilizado para quantificação de mtDNA (gene ND1). Fonte: Geneious v2020.0.5 (Biomatters, New Zealand)

SEQ_2	AGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	60
NCBI_ND1	-----GGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	26
SEQ_1	AGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	60
SEQ_3	AGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	60
SEQ_4	AGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	60
SEQ_5	-----GCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGGCCGTAGCATTTCCTTACGTTAGTGG	53

	Foward	
SEQ_2	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	120
NCBI_ND1	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	86
SEQ_1	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	120
SEQ_3	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	120
SEQ_4	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	120
SEQ_5	AACGAAAAGTTCTAGGCTATATACAACCTCCGAAAAGGTCCAAATGTCGTAGGTCCATATG	113

SEQ_2	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	180
NCBI_ND1	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	146
SEQ_1	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	180
SEQ_3	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	180
SEQ_4	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	180
SEQ_5	GCCTACTTCAACCCATCGCCGATGCAATCAAACTTTTATTAAAGAACCACACTACGACCCG	173

SEQ_2	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	240
NCBI_ND1	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	206
SEQ_1	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	240
SEQ_3	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	240
SEQ_4	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	240
SEQ_5	CTACATCTTCAGCCTCAATATTTATCCTAGCACCTATCATAGCTTTAGGCCTAGCCTTAA	233

SEQ_2	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA	300
NCBI_ND1	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTC-----	239
SEQ_1	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA	300
SEQ_3	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA	300
SEQ_4	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA	300
SEQ_5	CCATGTGAAATCCCTACCAATACCCTATCCTCAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA	293

	Reverse	

Figura 5. Alinhamento realizado no programa Clustal Omega entre a sequência referência (NCBI_ND1) e cinco produtos do sequenciamento (SEQ_1 a SEQ_5) para o gene ND1, mostrando 100% de identidade entre as sequências. Marcação em vermelho indica a sequência *Forward* e *Reverse* do primer OUT para o gene ND1.

Tabela 1. Identificação do gene, sequência dos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) e número de acesso ao "GenBank".

Gene	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho amplicon (pb)	Número de acesso ao "GenBank"
ND1 OUT	F: GGCCGTAGCATTTCCTTACGTT R: GAGGATAGGGTATTGGTAGGGGA	239	AF492351.1
ND1 INNER	F: CGAAAAGGTCCAAATGTCGT R: CTGAAGATGTAGCGGGTCGT	103	AF492351.1

F (forward); R (reverse)

12. Análise estatística

Para os resultados de desenvolvimento embrionário, taxas de fecundação e distribuição de GC e mitocôndrias, os dados foram comparados pelo teste de Qui-Quadrado considerando $p < 0,05$ significativo. Para as análises de quantificação de GC, mitocôndrias e mtDNA os dados foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis considerando $p < 0,05$ significativo, pelo software GraphPad Prism.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM)

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade das estruturas reconstruídas por TG-PM de se desenvolverem em embriões. Para isso, foram executadas três etapas.

Inicialmente, os CCOs foram maturados *in vitro* por 21 horas e depois divididos em 3 grupos: 1) TG-PM: Ovócitos maturados *in vitro*, previamente enucleados, reconstruídos com a placa metafásica de outro ovócito (n=101) e submetidos à ativação partenogenética (AP); 2) CONTROLE AP: Ovócitos maturados *in vitro* submetidos à AP (n=141); e 3) CONTROLE PIVE: ovócitos maturados *in vitro* submetidos à fecundação *in vitro* (FIV) (n=204). Após AP e / ou PIVE, todas as estruturas foram cultivadas *in vitro* até D7. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em D2 e D7 do cultivo, respectivamente.

Após confirmar que ovócitos reconstruídos são capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto, foi avaliada capacidade dos mesmos de serem fecundando e de desenvolverem após FIV. Uma vez que o ovócito micromanipulado apresentava um dano (furo) na zona pelúcida, foi avaliada qual a melhor concentração de espermatozoides para fecundação *in vitro*. Para isso, os ovócitos reconstruídos foram divididos em 3 grupos: 1) TG-PM 1×10^6 sptz/ml: submetidos à fecundados com 1×10^6 sptz/ml (n=64); 2) TG-PM $0,5 \times 10^6$ sptz/ml: submetido à fecundação com $0,5 \times 10^6$ sptz/ml (n=64); 3) CONTROLE PIVE: submetido à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=93). Após 18 horas de co-incubação com espermatozoides, as estruturas foram fixadas e avaliadas quanto às taxas de fecundação.

Por fim, para avaliar a capacidade de produção embrionária de estruturas reconstruídas após a fecundação *in vitro*, foi utilizada a melhor concentração espermática determinada na etapa anteriormente. Foram utilizados dois grupos: 1) TG-PM 1×10^6 sptz/ml: ovócitos reconstruídos submetidos à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=154) e 2) CONTROLE PIVE: CCOs submetidos à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=433). Todas as estruturas foram cultivadas por sete dias. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em

D2 e D7 do cultivo, respectivamente. Onze blastocistos de D7 foram armazenados e enviados a um laboratório comercial para testes de paternidade para confirmação se eram produtos de fecundação *in vitro* ou embriões partenogênicos.

Experimento 2: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de corpúsculo polar (TG-CP)

Este experimento teve como objetivo avaliar a capacidade de ovócitos submetidos ao TG, utilizando o Corpúsculo Polar (CP), de serem fecundados e desenvolverem até o estágio de blastocisto. Os CCOs foram maturados por 21 horas, desnudados e selecionados pela presença de CP. Somente o CP de um ovócito previamente maturado foi transferido para o citoplasma de outro ovócito previamente enucleado. Neste experimento, foram utilizados os seguintes grupos: 1) TG-CP: submetido à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=62) e 2) CONTROLE PIVE: submetido à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=132) e avaliadas quanto às taxas de fecundação e polispermia.

Para avaliar a capacidade de se desenvolver até blastocisto após a fecundação *in vitro* foram utilizados dois grupos: 1) TG-CP 1×10^6 sptz/ml: submetido à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=59) e 2) CONTROLE PIVE: submetido à fecundação com 1×10^6 sptz/ml (n=95). Todas as estruturas foram cultivadas por sete dias. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em D2 e D7 do cultivo, respectivamente. Cinco embriões foram armazenados e enviados ao laboratório comercial para testes de paternidade para confirmar se são produtos de PIVE ou embriões partenogênicos.

Experimento 3: Efeito da transferência de genoma nos grânulos corticais, mitocôndrias e DNA mitocondrial (mtDNA).

Neste experimento, avaliamos se a micromanipulação para TG causaria um distúrbio na quantidade e distribuição de grânulos corticais e mitocôndrias e no número de cópias do mtDNA.

Foram utilizados quatro grupos: 1) Controle - ovócito intacto; 2) TG-PM - ovócitos submetidos ao TG com PM; 3) TG-CP - ovócitos submetidos ao TG com CP; e 4) Enucleados: ovócitos previamente enucleados. Aproximadamente 30 ovócitos por grupo

foram submetidos coloração dos grânulos corticais com FITC-PNA (Sigma-Aldrich) e coloração mitocondrial por MitoTracker® Green FM (Molecular Probes) imediatamente após a micromanipulação. A quantificação e distribuição foram avaliadas por microcópia confocal (Leica) e analisadas pelo software ImageJ.

Para quantificação do número de cópias do mtDNA, os ovócitos foram armazenados, imediatamente após a micromanipulação à -20°C. O número de cópias do mtDNA foi avaliado individualmente em 20 ovócitos/grupos por qPCR. Para cada corrida, uma curva padrão foi gerada a partir do DNA plasmidial usando cinco diluições em série elevadas a décima potência. Essa curva permitiu a determinação do número de cópias do mtDNA em cada amostra.

Experimento 4: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por TG-PM utilizando PM de ovócitos criopreservados

O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade de estruturas reconstruídas com placas metafásicas criopreservadas (TG-PMV) de se desenvolverem em embrião. A escolha da PM para ser utilizada com ovócitos criopreservados foi baseada nos resultados de produção de embrião. Para isso, ovócitos em MII foram vitrificado pelo método de *Cryotop* e, posteriormente foram utilizados como doadores de PM para a TG-PM em citoplasma fresco.

Para avaliar a capacidade das estruturas reconstruídas utilizando PM de ovócitos vitrificados, de se desenvolverem em embriões foram utilizados dois grupos: 1) TG-PMV 1×10^6 sptz/ml: citoplastos reconstruídos com PM de ovócitos vitrificados e reaquecidos, posteriormente submetidos à fecundação com 1×10^6 sptz/ml e 2) CONTROLE PIVE: CCOs submetidos à fecundação com 1×10^6 sptz/ml e 3) CONTROLE VIT: ovócitos MII vitrificados / aquecidos submetidos fecundação com 1×10^6 sptz/ml. Todas as estruturas foram cultivadas por sete dias. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em D2 e D7 do cultivo, respectivamente.

RESULTADOS

Experimento 1: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM)

Para determinar se ovócitos micromanipulados eram capazes de se desenvolver em embriões, eles foram submetidos a AP. O grupo micromanipulado apresentou taxas de clivagem ($p < 0,05$) e de blastocisto ($p < 0,05$) menores que os grupos controle AP e PIVE (Tabela 2).

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de placa metafásica (TG-PM) e submetidos a ativação partenogenética (AP), de ovócitos submetidos a AP e de ovócitos submetidos a produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Tratamentos	Ovócitos n	Clivagem no D2 n (%)	Blastocisto no D7 n(%)
TG-PM (AP)	101	64 (63.4) ^a	19 (18.8) ^a
AP	141	117 (83.0) ^b	65 (46.1) ^b
Controle PIVE	204	164 (80.4) ^b	79 (38.7) ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Quando a fecundação *in vitro*, com diferentes concentrações de espermatozoides, foi avaliada, observou-se que as estruturas reconstruídas apresentaram uma menor taxa de fecundação ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle da PIVE (Tabela 3). No entanto, a concentração espermática utilizada não afetou a taxa de fecundação nem a taxa de polispermia, que foi semelhante ($p > 0,05$) entre todos os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de ovócitos fecundados, não fecundados, polispérmicos e anormais que foram submetidos à transferência de genoma com placa metafásica (TG-PM) e inseminados com diferentes concentrações de espermatozoides (1×10^6 e 0.5×10^6 sptz/ml) comparado ao grupo controle produzido *in vitro* (PIVE) e inseminado com 1×10^6 sptz/ml.

Tratamentos	Ovócitos n	Fecundado n(%)	Não fecundado n(%)	Polispérmico n(%)	Anormal n(%)
Controle PIVE	93	70 (75.3) ^a	19 (20.4) ^a	17 (18.5)	4 (4.3)
TG-PM 1×10^6	64	30 (46.9) ^b	32 (50) ^b	11 (17.2)	2 (3.1)
TG-PM $0,5 \times 10^6$	64	29 (45.3) ^b	32 (50) ^b	11 (17.5)	3 (4.7)

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Em relação à capacidade de desenvolvimento embrionário do grupo micromanipulado (TG-PM), os resultados mostraram que as taxas de clivagem e blastocisto no grupo TG-PM foram menores ($p < 0,05$) do que no grupo controle de PIVE (Tabela 4).

Tabela 4. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com placa metafásica (TG-PM) submetidos à produção *in vitro* de embriões (PIVE) comparado ao grupo controle PIVE.

Tratamento	Ovócitos n	Fusionados n	Clivagem em D2 n(%)	Blastocisto em D7 n(%)
Controle PIVE	433	-	355 (82) ^a	151 (34.9) ^a
TG-PM	402	154 (38.3) ^a	77 (50) ^b	21 (13.6) ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Experimento 2: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por transferência de corpúsculo polar (TG-CP)

Para avaliar a capacidade de fecundação de ovócitos submetidos à TG-CP, a concentração espermática utilizada foi de 1×10^6 sptz/ml, conforme definido no primeiro experimento. Os ovócitos reconstruídos apresentaram menor taxa de fecundação ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle de PIVE, entretanto as taxas de polispermia e de anormais não diferiu ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de fecundados, não fecundados, polispérmicos e anormais de ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP), comparado ao grupo controle produzido *in vitro* (PIVE).

Tratamentos	Ovócitos n	Fecundados n(%)	Não fecundados n(%)	Polispérmicos n(%)	Anormal n(%)
Controle PIVE	132	127 (96.2) ^b	4 (3.1) ^b	16 (12.1)	1 (0.8)
TG-CP	62	51 (82.3) ^a	10 (16.1) ^a	8 (12.9)	0 (0.0)

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Para avaliar o desenvolvimento embrionário, o TG-CP e o grupo controle (PIVE) foram submetidos à fecundação com 1×10^6 spz/ml e cultivados até D7. Embora a taxa de clivagem tenha sido semelhante ($p > 0,05$) entre os grupos, a taxa de blastocistos no grupo TG-CP foi menor ($p < 0,05$) do que no grupo controle PIVE (Tabela 6).

Tabela 6. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) e submetidos à produção *in vitro* de embriões (PIVE) comparado ao grupo controle PIVE.

Tratamentos	Ovócitos n	Fusionados n	Clivagem em D2 n(%)	Blastocisto em D7 n(%)
Controle PIVE	95	-	81 (85.3)	35 (36.8) ^b
TG-CP	59	26 (44.1)	23 (88.5)	2 (7.7) ^a

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Experimento 3: Efeito da Transferência de Genoma nos Grânulos Corticais (GC), Mitocôndrias e DNA mitocondrial (mtDNA).

Não foram observadas diferenças entre as estruturas reconstruídas TG-PM (n = 22) e TG-CP (n = 20) ($p > 0,05$) na quantificação do GC (Figura 6). No entanto, ambos os tratamentos apresentaram menos GC ($p < 0,05$) do que os grupos controle (n = 22) e enucleados (n = 20).

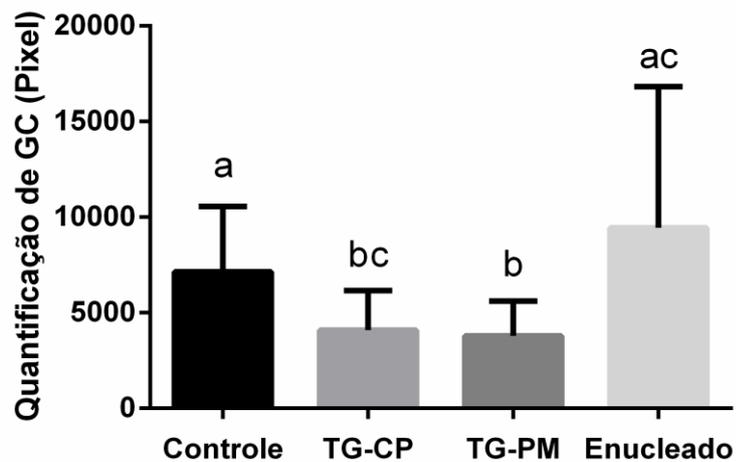


Figura 6. Quantificação de grânulos corticais (CG) em pixels, usando coloração FITC-PNA dos grupos: controle, de transferência de genoma do corpúsculo polar (TG-CP), de transferência de genoma da placa de metafásica (TG-PM) e enucleado.

^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal - Wallis ($p < 0,05$).

Para distribuição dos GC (Tabela 7), o grupo TG-PM apresentou menos estruturas com distribuição periférica diferente dos grupos controle e enucleado ($p < 0,05$), mas não apresentou diferença em relação ao grupo TG-CP ($p > 0,05$). O TG-CP foi o único grupo que não diferiu dos demais ($p > 0,05$).

Tabela 7. Distribuição de Grânulos Corticais (GC) em ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) ou placa metafásica (TG-PM) comparado com ovócitos não manipulados (controle) e ovócitos enucleados.

Grupos	n	Periférico n (%)	Cortical n (%)	Homogêneo n (%)	Cluster n (%)
Controle	22	16 (72,7) ^a	6 (27,3) ^{ab}	0	0
TG-CP	20	10 (50) ^{ab}	10 (50) ^{ab}	0	0
TG-PM	22	9 (40,9) ^b	12 (54,5) ^a	1 (4,6)	0
Enucleados	20	15 (75) ^a	5 (25) ^b	0	0

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Com relação à quantificação mitocondrial (MT) (Figura 7) e distribuição (Tabela 8), não foram observadas diferenças entre os grupos.

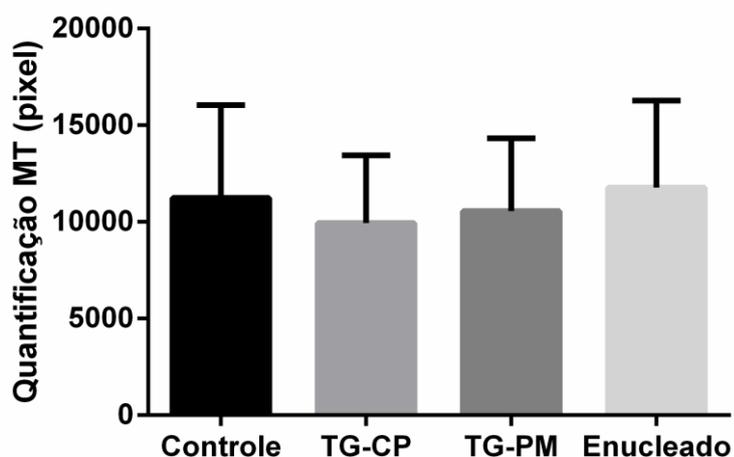


Figura 7. Quantificação mitocondrial (MT) em pixels, de estruturas coradas com MitoTracker® Green FM a base de carboxianina: controle, grupo de transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP), grupo de transferência do genoma com placa metafásica (TG-PM) e grupo enucleado.

Tabela 8. Distribuição de mitocôndrias (MT) em ovócitos submetidos à transferência de genoma com corpúsculo polar (TG-CP) ou placa metafásica (TG-PM) comparado com ovócitos não manipulados (controle) e ovócitos enucleados.

Grupos	n	Periférico n (%)	Semi-Periférico n (%)	Difuso n (%)
Controle	26	7 (26.9)	17 (65.4)	2 (7.7)
TG-CP	29	8 (27.6)	17 (58.6)	4 (13.8)
TG-PM	27	4 (17.8)	18 (66.7)	5 (18.5)
Enucleados	26	5 (19.2)	19 (73.1)	2 (7.7)

Em relação ao número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA), não foram observadas diferenças entre os grupos.

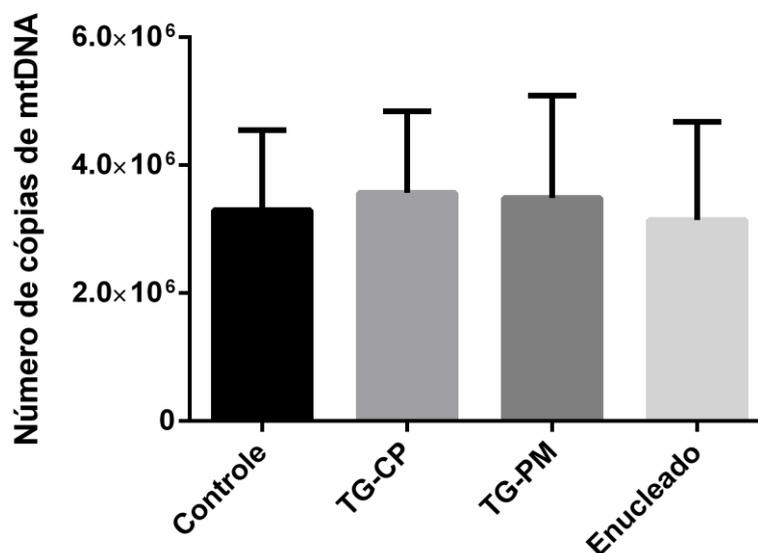


Figura 8. Quantificação do número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) por PCR em tempo real (RT q-PCR) dos grupos: grupo controle, grupo de transferência de genoma do corpúsculo polar (TG-CP), transferência de genoma da placa metafásica (TG-PM) e enucleado.

Experimento 4: Capacidade de desenvolvimento de ovócitos reconstruídos por TG-PM utilizando PM de ovócitos criopreservados

Neste experimento a PM de ovócitos vitrificados foram utilizados para TG em citoplasma fresco (TG-PMV). A taxa de clivagem do grupo TG-PMV foi semelhante ao

grupo controle VIT é inferior ($p < 0,05$) ao grupo controle PIVE. A taxa de blastocisto do grupo TG-PMV semelhante ao Controle vitrificado (Controle VIT) (Tabela 9).

Tabela 9. Desenvolvimento embrionário de ovócitos reconstruídos por transferência de genoma com placa metafásica de ovócitos vitrificados (GT-PMV) submetidos à produção *in vitro* de embriões (PIVE) comparado a ovócitos vitrificados (controle VIT) e grupo controle PIVE.

Tratamentos	Ovócitos n	Fusionados n	Clivagem em D2 n(%)	Blastocisto em D7 n(%)
TG-PMV	104	67	41 (61.2) ^b	6 (8.9) ^b
Controle VIT	55	-	29 (52.7) ^b	2 (3.6) ^b
Controle PIVE	112	-	91 (81.25) ^a	38 (33,9) ^a

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Ovócitos de várias espécies animais são extremamente sensíveis ao resfriamento, várias estratégias de criopreservação tem sido testadas mas nenhuma delas apresenta resultados satisfatórios (Spricigo *et al.*, 2012; Spricigo *et al.*, 2014; Sripunya *et al.*, 2014; Spricigo *et al.*, 2015; Spricigo *et al.*, 2016; Spricigo *et al.*, 2017). O uso da TG de um ovócito criopreservado para um citoplasma fresco surge como mais uma alternativa para o seu uso, já que o maior dano causado por esse procedimento ocorre no seu citoplasma. Dessa forma, foi proposto avaliar a viabilidade da TG em ovócitos bovinos frescos e vitrificados para serem utilizados na PIVE.

No primeiro experimento, a TG foi avaliada usando PM como material genético. Considerando a ausência de relatos usando TG-PM em bovinos, foi realizada a AP para verificar se as estruturas reconstruídas teriam a capacidade de se desenvolver em embriões. Apesar das taxas mais baixas de clivagem e desenvolvimento embrionário, os resultados mostraram que estruturas reconstruídas são capazes de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Estudos usando TG-PM em ovócitos humanos e camundongos que avaliam a capacidade de desenvolvimento embrionário por AP mostraram taxas embrionárias semelhantes aos controles, concluindo que o AP é um método confiável para avaliar a capacidade de desenvolvimento embrionário dessas estruturas (Paull *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2014; Neupane *et al.*, 2014). Os resultados encontrados nesse trabalho nos mostra a capacidades dessa técnica de produzir embriões, viabilizando seu uso em programas de reprodução assistida ou aplicação em programas de recuperação ou reprodução de animais silvestres ou em risco de extinção.

O próximo passo foi fazer a FIV dos ovócitos reconstruídos. Nessa etapa a principal preocupação era o dano da zona pelúcida decorrente da micromanipulação, que poderia afetar o bloqueio da polispermia. Portanto, foi testada a concentração de espermatozoides a ser utilizada na fecundação dos ovócitos micromanipulados. Considerando que em todos os relatos na literatura que usaram a TG não foi feita a FIV, mas sim a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), não havia indicação do efeito concentração espermática na taxa de fecundação e polispermia. Com base nisso, duas concentrações diferentes foram testadas, 1×10^6 sptz/ml na TG-PM, concentração usada rotineiramente, e $0,5 \times 10^6$ sptz/ml, uma concentração mais baixa, para evitar uma

possível polispermia devido à ruptura da zona pelúcida (ZP). Embora a taxa de fecundação tenha sido menor no grupo reconstruído do que no grupo controle PIVE, as diferentes concentrações de espermatozoides na não afetaram a taxa de fecundação e de polispermia. Assim, foi demonstrado que o mesmo protocolo usado para PIVE pode ser usado para estes ovócitos oriundas do TG. É possível que o rompimento da ZP durante a micromanipulação não afete o bloqueio a polispermia (Bianchi e Wright, 2016), mas afete outras características do ovócito que ocasionaram a menor taxa de fecundação. Uma possibilidade é que no momento da reconstrução, as membranas citoplasmáticas tanto do fragmento contendo a PM quanto do citoplasma receptor tenham se fundido, assim como ocorre com espermatozoide e ovócito na fecundação. Com essa fusão de membranas, uma ativação pode ter ocorrido induzindo uma falsa fecundação, que impediria a entrada de espermatozoides durante a fecundação. Isso poderia justificar essa diminuição na taxa de fecundação.

Quando a produção embrionária de ovócitos reconstruídos pelo TG-PM foi avaliada após a FIV, observou-se que, apesar das taxas mais baixas de clivagem e blastocisto em comparação ao controle, eles têm a capacidade de serem fecundados e evoluir para o estágio de blastocisto. Resultados semelhantes foram relatados em estudos com ovócitos humanos e primatas submetidos ao TG-PM, que também mostraram diminuição na taxa de produção de blastocistos após ICSI (Tachibana *et al.*, 2009; Tachibana *et al.*, 2013). Essa redução na produção de embriões possivelmente se deve aos danos causados pela micromanipulação e/ou pela eletrofusão. De fato, um estudo comparando a taxa de fusão usando eletrofusão ou extrato inativado do vírus Sendai (SeV) mostrou que, quando o SeV era usado, as taxas de blastocistos eram semelhantes ao grupo controle, mas diminuía quando o utilizavam da eletrofusão (Tachibana *et al.*, 2009). Para confirmar se os embriões produzidos pelo TG-PM eram produtos de PIVE e não por outro tipo de ativação, foi realizado o teste de paternidade, que confirmou que embriões foram originados pelo processo de PIVE.

No segundo experimento, foi avaliada a técnica de TG usando CP como fonte de material genético e os resultados foram semelhantes ao do primeiro experimento, ou seja, menor taxa de fecundação e taxas de polispermia semelhante. Esses resultados reforçam a ideia de que, apesar da perturbação da zona pelúcida, o bloqueio à

polispermia não havia mudado (Bianchi e Wright, 2016). Devido ao grande número de ovócitos necessários para a realização dos dois métodos simultaneamente, os dois experimentos não foram realizados ao mesmo tempo. Portanto, não se pode comparar os dados do desenvolvimento embrionário. No entanto, analisando esses resultados, fica claro que no grupo controle o desenvolvimento embrionário teve o mesmo padrão em ambos os experimentos, enquanto os grupos TG têm perfil diferente. Apesar dos resultados terem sido menores, mostram que o CP tem capacidade de se reorganizar novamente em uma PM (Ma *et al.*, 2017), viabilizando essa estrutura como um ovócito maduro intacto. Desta forma, um único ovócito vitrificado pode doar 2 estruturas em programas de conservação de espécies ou tratamentos reprodutivos para mulheres. Por outro lado, o perfil distinto dos grupos, com menor produção de embrião no TG-CP leva a hipótese de que, apesar da obtenção do CP ser menos agressiva do que a da PM, a TG-PM transfere junto com a PM um pouco de citoplasma que seria incorporado ao citoplasma receptor. Isso poderia ser uma vantagem desse tipo de TG, pois, supostamente, estaria repondo alguma porção do citoplasma que foi perdido na enucleação, o que justificaria o melhor resultado aparente da TG-PM. Quanto à menor taxa de blastocistos nos grupos TG comparado ao grupo controle, pode ser um efeito negativo da micromanipulação ou até a possibilidade de a eletrofusão prejudicar o desenvolvimento de estruturas conforme relatado também por Tachibana e colaboradores em (2009).

Para tentar identificar quais estruturas dos ovócitos são mais afetadas pelo TG com PM ou CP, foram analisadas a quantificação e distribuição de grânulos corticais (GC) e mitocôndrias (MT). Os resultados mostraram que os ovócitos submetidos ao TG (PM ou CP) apresentaram menos GC que o grupo controle ou enucleado e mais estrutura com distribuição semi-periférica que o grupo enucleado (Tabela 7). Esses resultados não suportam a hipótese levantada de que a quebra de ZP durante a micromanipulação não afetaria os grânulos corticais e, por isso a taxa de polispermia não foi afetada, mas a de fecundação sim. Ao contrário, esses dados sugerem que a desorganização e provável exocitose parcial dos GC pode ter ocorrido quando essas estruturas foram submetidas ao TG, especificamente à eletrofusão, o que explicaria a menor taxa de fecundação observada para ambos os grupos TG. Da mesma forma

justifica a menor taxa de clivagem e blastocisto corroborando com a literatura (Tachibana *et al.*, 2009).

Quando foram avaliadas a quantificação e distribuição das mitocôndrias pela coloração Mitotracker® Green FM, observou-se que nem a micromanipulação nem a eletrofusão afetam a quantidade e distribuição de MT. Em se tratando de número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) também não houve diferença entre os tratamentos. O fato da PM ser transferida com uma porção de citoplasma no momento da reconstrução poderia justificar a aparente “melhor” taxa de produção de embriões nesse grupo. Porém, os resultados mostraram que não houve alteração na quantidade de mtDNA, corroborando com a literatura que usa essa técnica pra impedir que mtDNA mutado possa ser herdado pela progênie/filhos (Tachibana *et al.*, 2013; Neupane *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Zhang e Liu, 2015; Wang *et al.*, 2016; Zhang, S.-P. *et al.*, 2017).

Finalmente, foi avaliada a possibilidade de produzir embriões com TG utilizando material genético de ovócitos vitrificados. Apesar de não ser possível comparar as duas técnicas utilizadas, já que foram avaliadas em momentos diferentes, a TG-PM apresentou melhor desenvolvimento embrionário quando comparado ao controle. Sendo assim a TG-PM foi escolhida para ser utilizada no último experimento em que ovócitos vitrificados foram testados como doadores de material genético. Os resultados encontrados mostraram que o TG-PM pode ser mais eficiente que a PIVE quando ovócitos vitrificados são utilizados. A melhor taxa de embrião do TG vitrificado comparado ao PIVE vitrificado era esperada já que a TG-PM permite a substituição do citoplasma danificado pela criopreservação por um fresco, possibilitando melhores condições para o desenvolvimento embrionário. Mostrando que a TG é uma melhor estratégia para a utilização de ovócitos vitrificados do que a PIVE. Talvez não tenha ocorrido diferença entre os grupos TG-PMV e controle com ovócitos vitrificados pelo fato de que para os dois grupos foram utilizados somente ovócitos que não romperam durante o aquecimento, ocorrendo assim uma pré-seleção dos ovócitos reaquecidos, superestimando os resultados do controle vitrificado.

Embora o trabalho tenha sido realizado em bovinos, ele tem uma ampla aplicação na conservação de animais, inclusive para animais silvestres, oferecendo a

chance de conservar e utilizar melhor o material genético que corre o risco de ser perdido em bancos de germoplasma animal. Outra possibilidade é o uso dessa técnica em bovinos como modelo de estudos para avaliar novas biotecnologias em reprodução humana, visto que, alguns resultados corroboram com a literatura. Pode servir também como modelos de estudos para interações citoplasma núcleo, bem como estudos de ciência básica.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode se concluir que a TG com PM ou CP são alternativas para produzir embriões a partir de ovócitos que sofreram algum tipo de comprometimento ou de baixa disponibilidade. Essas informações podem ser usadas como suporte a outros trabalhos para aperfeiçoar a utilização de gametas femininos criopreservados.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ANGEL, D. et al. Embryo development after vitrification of immature and in vitro-matured equine oocytes. *Cryobiology*, 2020. ISSN 0011-2240.

ARAV, A. et al. A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 35, n. 7, p. 1161-1168, July 01 2018. ISSN 1573-7330. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1210-9> >.

ARCARONS, N. et al. Spindle configuration and developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes exposed to NaCl or sucrose prior to Cryotop vitrification. *Reproduction, fertility, and development*, Apr 22 2015. ISSN 1031-3613 (Print)

1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897945> >.

AUCLAIR, S. et al. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 304, n. 6, p. E599-E613, 2013-03-15 00:00:00 2013. Disponível em: < <http://ajpendo.physiology.org/ajpendo/304/6/E599.full.pdf> >.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. *Reproduction in mammals*. 2nd ed. Cambridge University Press, 1982. ISBN 0521246288.

BIANCHI, E.; WRIGHT, G. J. Sperm Meets Egg: The Genetics of Mammalian Fertilization. *Annual Review of Genetics*, v. 50, n. 1, p. 93-111, 2016. Disponível em: < <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-121415-121834> >.

CAO, X. et al. Effect of vitrification on meiotic maturation, mitochondrial distribution and glutathione synthesis in immature silver fox cumulus oocyte complexes.

Theriogenology, v. 91, p. 104-111, 2017/03/15/ 2017. ISSN 0093-691X. Disponível em:
< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16306227> >.

CAO, Y. X. et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. Fertility and sterility, v. 92, n. 4, p. 1306-11, Oct 2009. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930218> >.

CARVALHO, A. A. F., L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P. R. Vitriificação: Uma Alternativa Para a Preservação de Embriões e Material Genético de Fêmeas Mamíferas em Criobancos. Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.

COBO, A. et al. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. Fertility and sterility, Sep 6 2015a. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26353081> >.

_____. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. Fertility and sterility, v. 104, n. 6, p. 1426-34 e1-8, Dec 2015b. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26353081> >.

CREE, L. M. et al. Maternal age and ovarian stimulation independently affect oocyte mtDNA copy number and cumulus cell gene expression in bovine clones. *Human reproduction*, v. 30, n. 6, p. 1410-1420, 2015. ISSN 1460-2350.

CUMMINS, J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of reproduction*, v. 3, n. 3, p. 172-182, 1998.

CUMMINS, J. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 115, p. S23-S29, 2004. ISSN 0301-2115.

DING, C. et al. Effects of in-vitro or in-vivo matured ooplasm and spindle-chromosome complex on the development of spindle-transferred oocytes. *Reprod Biomed Online*, v. 29, n. 6, p. 708-16, Dec 2014. ISSN 1472-6491 (Electronic)

1472-6483 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444504> >.

DOS SANTOS-NETO, P. C. et al. Cumulus cells during in vitro fertilization and oocyte vitrification in sheep: Remove, maintain or add? *Cryobiology*, 2020/01/07/ 2020. ISSN 0011-2240. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122401930241X> >.

EL-SHALOFY, A. S. et al. Effect of different vitrification solutions and cryodevices on viability and subsequent development of buffalo oocytes vitrified at the germinal vesicle (GV) stage. *Cryobiology*, v. 74, p. 86-92, 2017/02/01/ 2017. ISSN 0011-2240. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224016303698> >.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal reproduction science*, v. 78, n. 3, p. 203-216, 2003. ISSN 0378-4320.

FATHI, M.; MOAWAD, A. R.; BADR, M. R. Production of blastocysts following in vitro maturation and fertilization of dromedary camel oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *PLOS ONE*, v. 13, n. 3, p. e0194602, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194602>>.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009. ISSN 0093-691X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>>. Acesso em: 2015/12/20.

FISCH, B.; ABIR, R. Female fertility preservation: past, present and future. *Reproduction*, v. 156, n. 1, p. F11-F27, 2018a. ISSN 1741-7899. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/early/2018/03/26/REP-17-0483.abstract>>.

FRANCIOSI, F. et al. Developmental competence of gametes reconstructed by germinal vesicle transplantation from fresh and cryopreserved bovine oocytes. *Fertility and sterility*, v. 93, n. 1, p. 229-38, Jan 2010. ISSN 1556-5653 (Electronic)

0015-0282 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976992>>.

GRAVES-HERRING, J. E.; WILDT, D. E.; COMIZZOLI, P. Retention of structure and function of the cat germinal vesicle after air-drying and storage at suprazero temperature. *Biology of reproduction*, v. 88, n. 6, p. 139, Jun 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic)

0006-3363 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575153>>.

GRAVES-HERRING, J. E.; WILDT, D. E.; COMIZZOLI, P. Retention of Structure and Function of the Cat Germinal Vesicle after Air-Drying and Storage at Suprazero Temperature. *Biology of Reproduction*, v. 88, n. 6, p. 139, 1-7, June 1, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/88/6/139.abstract> >.

GUTNISKY, C. et al. Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*, v. 143, p. 18-26, 2020/02/01/ 2020. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X19305369> >.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999/09/01/ 1999. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X99001624> >.

HOSSEINI, S. M. et al. Cytoplasmic, rather than nuclear-DNA, insufficiencies as the major cause of poor competence of vitrified oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 30, n. 5, p. 549-52, May 2015. ISSN 1472-6491 (Electronic) 1472-6483 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25773526> >.

HYTTEL, P. et al. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. v. 78, n. 2, p. 615, 1986. ISSN 0022-4251. Disponível em: < https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/78/2/jrf_78_2_033.xml >.

IUSSIG, B. et al. A brief history of oocyte cryopreservation: Arguments and facts. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 98, n. 5, p. 550-558, 2019. ISSN 0001-

6349. Disponível em: <
<https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/aogs.13569> >.

IWATA, H. et al. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 3, p. 424-432, 2011. ISSN 1448-5990.

JESETA, M. et al. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic competence related to their in vitro maturation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 49, n. 3, p. 469-75, Jun 2014. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24716726> >.

KIM, J.; SELI, E. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. *Reproduction*, v. 1, n. aop, 2019. ISSN 1741-7899.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 11, n. 3, p. 300-308, 2005/01/01/2005. ISSN 1472-6483. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310608371> >.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 11, n. 3, p. 300-8, Sep 2005. ISSN 1472-6483 (Print)

1472-6483 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176668> >.

LEE, P.-C.; COMIZZOLI, P. Desiccation and supra-zero temperature storage of cat germinal vesicles lead to less structural damage and similar epigenetic alterations

compared to cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 86, n. 12, p. 1822-1831, 2019. ISSN 1040-452X. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mrd.23276> >.

LIU, Y. et al. Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. *Microscopy research and technique*, v. 69, n. 10, p. 799-807, Oct 2006. ISSN 1059-910X (Print)

1059-910X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886230> >.

LODDE, V. et al. Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Molecular reproduction and development*, v. 75, n. 5, p. 915-24, May 2008. ISSN 1098-2795 (Electronic)

1040-452X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948251> >.

LUCIANO, A. M. et al. Cryopreservation of immature bovine oocytes to reconstruct artificial gametes by germinal vesicle transplantation. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 44, n. 3, p. 480-8, Jun 2009. ISSN 1439-0531 (Electronic)

0936-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992089> >.

MA, H. et al. Functional Human Oocytes Generated by Transfer of Polar Body Genomes. *Cell Stem Cell*, v. 20, n. 1, p. 112-119, 2017. ISSN 1934-5909. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.001> >. Acesso em: 2018/06/11.

MAHESH, Y. U. et al. Effect of different cryo-devices on in vitro maturation and development of vitrified-warmed immature buffalo oocytes. *Cryobiology*, v. 75, p. 106-

116, 2017/04/01/ 2017. ISSN 0011-2240. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224016303844> >.

MARTINS, C. F. et al. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*, v. 67, n. 8, p. 1307-1315, 2007. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.015> >. Acesso em: 2017/11/28.

MATOS, J. E. et al. Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, v. 13, p. 60, Jun 12 2015. ISSN 1477-7827 (Electronic)

1477-7827 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26066493> >.

MAZIERO, R. R. D. et al. Effects of the addition of oocyte meiosis-inhibiting drugs on the expression of maturation-promoting factor components and organization of cytoplasmic organelles. *Reproductive Biology*, 2019/12/27/ 2019. ISSN 1642-431X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1642431X19303146> >.

MROWIEC, P. et al. USING RAPID I METHOD FOR VITRIFICATION OF BOVINE OOCYTES. *Cryoletters*, v. 40, n. 2, p. 123-128, 2019. ISSN 0143-2044.

MROWIEC, P. et al. USING RAPID I METHOD FOR VITRIFICATION OF BOVINE OOCYTES. *Cryoletters*, v. 40, n. 2, p. 123-128, 2019. Disponível em: <
<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2019/00000040/00000002/art00007> >.

NEUPANE, J. et al. Assessment of nuclear transfer techniques to prevent the transmission of heritable mitochondrial disorders without compromising embryonic development competence in mice. *Mitochondrion*, v. 18, p. 27-33, Sep 2014. ISSN 1872-8278 (Electronic)

1567-7249 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25229667> >.

OTSUKI, J.; NAGAI, Y.; SANKAI, T. Aggregated chromosomes transfer in human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 28, n. 3, p. 401-4, Mar 2014. ISSN 1472-6491 (Electronic)

1472-6483 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316045> >.

PASQUARIELLO, R. et al. Alterations in oocyte mitochondrial number and function are related to spindle defects and occur with maternal aging in mice and humans†. *Biology of Reproduction*, v. 100, n. 4, p. 971-981, 2018. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy248> >. Acesso em: 2/18/2020.

PAULL, D. et al. Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature*, v. 493, n. 7434, p. 632-7, Jan 31 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254936> >.

READER, K. L. et al. Mitochondria and vesicles differ between adult and prepubertal sheep oocytes during IVM. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 3, p. 513-522, 2015. ISSN 1448-5990.

READER, K. L.; STANTON, J.-A. L.; JUENGEL, J. L. The role of oocyte organelles in determining developmental competence. *Biology*, v. 6, n. 3, p. 35, 2017.

SPRICIGO, J. F. et al. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. *PloS one*, v. 10, n. 6, p. e0130164, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26107169> >.

SPRICIGO, J. F. et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*, v. 69, n. 2, p. 256-65, Oct 2014. ISSN 1090-2392 (Electronic)

0011-2240 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106744> >.

SPRICIGO, J. F. et al. Effect of the exposure to methyl-beta-cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. *Cryobiology*, v. 65, n. 3, p. 319-25, Dec 2012. ISSN 1090-2392 (Electronic)

0011-2240 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981976> >.

SPRÍCIGO, J. F. et al. Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes. *Theriogenology*, v. 89, p. 47-57, 2017. ISSN 0093-691X. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035> >. Acesso em: 2018/06/11.

SPRÍCIGO, J. F. W. et al. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 86, n. 8, p. 2054-2062, 2016. ISSN 0093-691X. Disponível

em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.003> >. Acesso em: 2018/06/11.

SRIPUNYA, N. et al. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. *Cryobiology*, v. 69, n. 3, p. 496-9, Dec 2014. ISSN 1090-2392 (Electronic)

0011-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25224047> >.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture1. *Biology of reproduction*, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904> >. Acesso em: 1/23/2020.

TACHIBANA, M. et al. Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, v. 493, n. 7434, p. 627-31, Jan 31 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103867> >.

TACHIBANA, M.; SPARMAN, M.; MITALIPOV, S. Chromosome transfer in mature oocytes. *Nature protocols*, v. 5, n. 6, p. 1138-47, Jun 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic)

1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539289> >.

TACHIBANA, M. et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, v. 461, p. 367, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature08368> >.

TAN, J. H. et al. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular human reproduction*, v. 15, n. 1, p. 1-9, Jan 2009. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019837> >.

TARAZONA, A. et al. Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2006. ISSN 0936-6768. Disponível em: <
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2006.00615.x> >.

TRIMARCHI, J. R. et al. Oxidative Phosphorylation-Dependent and -Independent Oxygen Consumption by Individual Preimplantation Mouse Embryos¹. *Biology of reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1866-1874, 2000. ISSN 0006-3363. Disponível em: <
<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1866> >. Acesso em: 1/24/2020.

VAN BLERKOM, J. Mitochondria in early mammalian development. *Seminars in cell & developmental biology*, 2009, Elsevier. p.354-364.

WAKAYAMA, T.; YANAGIMACHI, R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotech*, v. 16, n. 7, p. 639-641, 07//print 1998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0798-639> >.

WANG, T. et al. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, v. 157, n. 7, p. 1591-604, Jun 19 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24949971> >.

WANG, Z.-W. et al. Cytoplasmic Determination of Meiotic Spindle Size Revealed by a Unique Inter-Species Germinal Vesicle Transfer Model. *Scientific Reports*, v. 6, p. 19827, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728387/> >.

YAMADA, M.; EGLI, D. Genome Transfer Prevents Fragmentation and Restores Developmental Potential of Developmentally Compromised Postovulatory Aged Mouse Oocytes. *Stem Cell Reports*, v. 8, n. 3, p. 576-588, 2017. ISSN 2213-6711. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.020> >. Acesso em: 2020/01/24.

ZHANG, J. Revisiting Germinal Vesicle Transfer as a Treatment for Aneuploidy in Infertile Women with Diminished Ovarian Reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Boston, v. 32, n. 2, p. 313-317, 2015. ISSN 1058-0468 1573-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354183/> >.

ZHANG, J.; LIU, H. Cytoplasm replacement following germinal vesicle transfer restores meiotic maturation and spindle assembly in meiotically arrested oocytes. *Reproductive biomedicine online*, v. 31, n. 1, p. 71-78, 2015. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.012> >. Acesso em: 2018/06/12.

ZHANG, J. et al. Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reproductive biomedicine online*, v. 34, n. 4, p. 361-368, 2017. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.01.013> >. Acesso em: 2017/11/27.

ZHANG, S.-P. et al. Polar body transfer restores the developmental potential of oocytes to blastocyst stage in a case of repeated embryo fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 34, n. 5, p. 563-571, 2017. ISSN 1058-0468

1573-7330. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5427653/> >.

ZHOU, X. L. et al. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*, v. 61, n. 1, p. 66-72, Aug 2010. ISSN 1090-2392 (Electronic)

0011-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20510225> >.