



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

DÉBORA FERNANDA SANTOS DE PINHO

Efeitos da proteína anticongelante tipo I (AFP I) sobre aspectos metabólicos e moleculares de complexos *cumulus*-oócitos ovinos vitrificados com Cryotop

Dissertação de mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense visando a obtenção do grau de Mestre em
Ciências e Biotecnologia

**Orientador(es): Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
Gabriela Ramos Leal**



Niterói
2025

DÉBORA FERNANDA SANTOS DE PINHO

Efeitos da proteína anticongelante tipo I (AFP I) sobre aspectos metabólicos e moleculares de complexos *cumulus*-oócitos ovinos vitrificados com Cryotop

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Reprodução Animal do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, Programa de Pós- Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Dissertação de mestrado submetido à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

**Orientadores: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
Gabriela Ramos Leal**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

P654e Pinho, Débora Fernanda Santos de
Efeitos da proteína anticongelante tipo I (AFP I) sobre aspectos metabólicos e moleculares de complexos cumulus-oócitos ovinos vitrificados com Cryotop / Débora Fernanda Santos de Pinho. - 2025.
74 f.: il.

Orientador: Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan.
Coorientador: Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Niterói, 2025.

1. Criopreservação. 2. Ovinos. 3. Proteína Anticongelante. 4. Produção intelectual. I. Souza-Fabjan, Joanna Maria Gonçalves de, orientadora. II. Batista, Ribrio Ivan Tavares Pereira, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

DÉBORA FERNANDA SANTOS DE PINHO

Efeitos da proteína anticongelante tipo I (AFP I) sobre aspectos metabólicos e moleculares de complexos *cumulus*-oócitos ovinos vitrificados com Cryotop

Dissertação de mestrado submetido à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando a obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:

**Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan – Departamento de Patologia e Clínica Veterinária – Universidade Federal Fluminense
(Orientadora/Presidente)**

Gutemberg Gomes Alves – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal Fluminense

Clara Ana Santos Monteiro - Departamento de Ciências Básicas - Universidade Federal Fluminense

Luciano de Rezende Carvalheira - Forschungsbereich Biotechnologie - Friedrich-Loeffler-Institut

“Porém, qualquer um, independentemente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na sua vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias por violência se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos reconhecer.” José Saramago

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter sido meu refúgio, por ter me dado forças para enfrentar todas as etapas do mestrado, sem ele em minha vida nada disso seria possível.

Aos meus pais, familiares e amigos por todo apoio desde a graduação até este momento, minha vitória também é a deles, pois estiveram me apoiando tanto mentalmente, quanto espiritualmente, e principalmente agradeço ao meu avô Milton Ozom, que não se encontra mais conosco, que me serviu como inspiração e incentivo em toda minha vida.

Ao meu namorado, João, que esteve comigo todos os dias sendo mais do que um namorado, meu melhor amigo, que me escutou, me incentivou e esteve sempre ao meu lado, sem o seu apoio isso também não seria possível.

A todos os meus colegas de laboratório e equipe GERAD, mas principalmente a Thais por ter me ajudado em praticamente todas as partes do meu mestrado, sou imensamente grata pela sua vida, agradeço ao Lucas e a Erlandia por me ensinarem com paciência, por aguentarem minhas muitas perguntas, vocês dois são pessoas incríveis, a Mariana por se disponibilizar toda sexta para me ajudar e agradeço pelos momentos que passei junto com todos vocês.

À minha orientadora Joanna, pelos ensinamentos, por ter me dado a oportunidade desde o início de estar no laboratório, por sempre encorajar e incentivar a buscarmos além. À minha coorientadora Gabriela, que é um ser humano iluminado, me incentivou em vários momentos que duvidei da minha capacidade, me escutou e entendeu meu jeito de pessoa ansiosa, além disso pelos momentos alegres nos dias de vitrificação com muita cantoria rs. E ao Ribrio meu coorientador, uma das pessoas mais geniais que já conheci, que além de ser uma pessoa muito divertida e que sempre me fazia soltar risadas, é um ótimo coorientador, agradeço pelos ensinamentos simples e didáticos que me motivaram a pensar fora da caixa muitas vezes.

Aos meus amigos da Igreja Metodista do Ingá, sou imensamente grata pelas orações, pelo apoio constante e por estarem sempre dispostos a ouvir meus desabafos e atender aos meus inúmeros pedidos de oração. A amizade e a fé de vocês foram pilares de força ao longo dessa jornada.

À Universidade Federal Fluminense e ao PPBI e todos os ensinamentos que adquiri ao longo do mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos (código 001). E aos demais órgãos de fomento FAPERJ, CNPq e FINEP, pelo necessário apoio financeiro, que possibilitou a realização deste estudo. Reconhecemos a importância dessas instituições no incentivo à pesquisa científica no Brasil.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	IX
Lista de ilustrações.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ovinocultura.....	2
1.2 Biotecnologias reprodutivas.....	3
1.3 Criopreservação.....	5
1.3.1 Vitrificação.....	6
1.3.2 Crioprotetores.....	11
1.3.3 Criopreservação de complexos cumulus-oócitos.....	11
1.3.4 Danos estruturais provocados pela criopreservação.....	13
1.3.5 Indicadores de competência oocitária.....	15
1.3.5.1 Glutathiona (GSH).....	15
1.3.5.2 ZAR1.....	15
1.3.5.3 MATER.....	16
1.3.5.4 GDF9 e BMP15.....	16
1.3.5.5 HSP70.....	16
1.3.5.6 PRDX1.....	17
1.3.5.7 SIRT2.....	17
1.3.5.8 BCL-2.....	17
1.3.5.9 BAX.....	17
1.4 Proteínas anticongelantes.....	18
2. OBJETIVO.....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Desenho experimental.....	24
3.2 Recuperação e classificação de complexos cumulus-oócitos.....	24
3.3 Vitrificação.....	25
3.4 Aquecimento.....	26
3.8 Microscopia de fluorescência.....	26

3.8.1 Atividade mitocondrial.....	26
3.8.2 Mensuração dos níveis de glutathiona (GSH) e das espécies reativas de oxigênio (EROs).....	27
3.9 Integridade da actina.....	27
3.10 Expressão gênica.....	27
3.10.1 Extração de RNA.....	28
3.10.2 Transcrição reversa.....	28
3.10.3 Amplificação.....	28
3.11 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Atividade mitocondrial.....	32
4.2 Mensuração dos níveis de glutathiona (GSH) e das espécies reativas de oxigênio (EROs).....	33
4.3 Razão entre EROs e GSH.....	34
4.4 Integridade da Actina.....	35
4.5 Expressão gênica.....	37
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
6.1 Conclusão.....	45
6.2 Perspectivas.....	45
7. REFERÊNCIAS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
µL	Microlitros
µG	Miligramas
AFP	Antifreeze protein (Proteína anticongelante)
AFGP	Glicoproteína anticongelante
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	Bcl-2-associated X protein (proteína associada a Bcl-2 tipo X)
BCL	B-cell lymphoma 2 (linfoma de células B 2)
BMP15	Bone morphogenetic protein (proteína morfogenética óssea)
BSA	Soroalbumina bovina
CAT	Catalase
CC	Célula do <i>cumulus</i>
COCs	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos
DMPBS	Solução tampão fosfato salino modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
AFP-	Grupo 0 ng/mL
AFP+	Grupo 0,25 ng/mL
Fresco	Grupo fresco
GDF9	Growth differentiation factor (fator de crescimento e diferenciação)
GSH	Glutathiona
HSP	Heat shock protein (proteína de choque térmico)
LH	Hormônio luteinizante
L	Litros
MATER	Maternal antigen that embryo requires (Antígeno Materno Requerido pelo Embrião)
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MII	Metáfase II
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos

Mg	Miligramas
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
MPF	Fator promotor de maturação
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
N ₂	Nitrogênio líquido
Ng	Nanogramas
PBS	Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada fosfatada)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRDX	Peroxiredoxin (Peroxiredoxina)
QVG	Quebra de vesícula germinativa
RNA	Ácido ribonucleico
SIRT	Sirtuin (sirtuina)
SOD	superóxido dismutase
TCM	Meio de cultura de tecidos
VG	Vesícula germinativa
V/V	Porcentagem em volume
ZAR1	Zygote arrest 1 (bloqueio zigótico 1)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 1. Uso de diferentes técnicas de criopreservação - vitrificação e congelamento lento - em oócitos de diferentes espécies na literatura	08
Tabela 2. Métodos de vitrificação de oócitos de diferentes espécies utilizando diferentes criodispositivos, com foco nas taxas de sobrevivência ou viabilidade pós-aquecimento na literatura.....	09
Tabela 3. Utilização de proteínas anticongelantes (AFP) na criopreservação de oócitos de diferentes espécies na literatura.....	21
Tabela 4. Número de complexos-cumulus oócitos (COCs) de ovelhas frescos e vitrificados com e sem proteína anticongelante tipo I (AFP I) de cada grupo experimental utilizado em cada análise.....	24
Tabela 5. Sequências, tamanhos e referências dos primers utilizados para a realização do PCR em tempo real dos <i>complexos cumulus</i> -oócitos frescos e vitrificados com e sem proteína anticongelante tipo I (AFP I) de ovinos.....	30
 LISTA DE FIGURAS	 Página
Figura 1. Oócitos imaturos de ovinos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com MitoTracker Red para avaliação de nível de atividade mitocondrial.....	32
Figura 2. Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação sobre a atividade mitocondrial, mensurada pela intensidade de fluorescência/ μm^2 , em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados com MitoTracker Red.....	32

Figura 3. Oócitos imaturos de ovinos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com 2',7'- 932 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Invitrogen™, D399) e 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CMF2HC, Cell Tracker Blue, Invitrogen™, C12881) para mensuração de níveis espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutaciona (GSH).....	33
Figura 4. Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutaciona (GSH), mensurada pela intensidade de fluorescência/μm ² , em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados respectivamente com H2DCFDA, Invitrogen™, D399 e CMF2HC, Cell Tracker Blue, Invitrogen™, C12881.....	34
Figura 5. Valores da razão de intensidade de fluorescência entre níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutaciona (GSH) em oócitos de ovinos.....	35
Figura 6. Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na integridade de actina em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados com Alexa Fluor 350 Phalloidin.....	36
Figura 7. Oócitos imaturos de ovinos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com corados com Alexa Fluor 350 Phalloidin para análise de integridade de actina.....	36
Figura 8. Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na expressão dos genes <i>BMP15</i> , <i>GDF9</i> , <i>HSP70</i> , <i>GAPDH</i> , <i>MATTER</i> , <i>ZAR1</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>B-ACT</i> , <i>H2AFZ</i> , <i>PRDX1</i> e <i>SIRT2</i> de oócitos imaturos vitrificados de ovelhas.....	37

RESUMO

A criopreservação de gametas é uma ferramenta fundamental para viabilizar e aprimorar a aplicação das biotécnicas reprodutivas, garantindo maior praticidade e eficiência, oferecendo viabilidade aos bancos de germoplasma e aprimorando a execução de diversas técnicas. Contudo, a sensibilidade dos oócitos às lesões criogênicas limita sua eficácia. Neste contexto, a proteína anticongelante do tipo I (AFP I), conhecida por sua capacidade de se ligar a cristais de gelo e estabilizar a membrana, emerge como potencial solução para minimizar os danos da criopreservação e otimizar a técnica. Este estudo avaliou a influência da adição da AFP I na criopreservação de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) ovinos imaturos, na criossobrevivência e no metabolismo oocitário, por meio de análises da atividade mitocondrial, níveis de glutatona (GSH), espécies reativas de oxigênio (EROs), integridade da actina e expressão de genes relacionados a competência oocitária, estresse celular e apoptose. Para isso, COCs foram recuperados a partir de ovários obtidos em abatedouro local. Após a seleção, os COCs foram alocados aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o tratamento de criopreservação: i) criopreservados sem AFP I (AFP-, n= 32); ii) criopreservados com AFP I (250 ng/mL de AFP I) (AFP+, n= 32) e iii) controle positivo (fresco), não submetido à criopreservação (n= 33). A criopreservação foi realizada utilizando a técnica de vitrificação em dispositivo Cryotop® (Kizato, Fuji, Japão). A atividade mitocondrial não apresentou diferença significativa entre os grupos Fresco e AFP+ após o aquecimento. No entanto, o grupo AFP- exibiu uma redução significativa em comparação aos grupos Fresco e AFP+ ($P < 0,05$). O grupo AFP+ apresentou níveis mais elevados de EROs ($P < 0,05$) em comparação aos grupos Fresco e AFP-. Por outro lado, os níveis de GSH foram semelhantes entre os grupos ($P > 0,05$). Na análise de integridade, o grupo Fresco apresentou uma quantidade significativamente maior de oócitos com filamentos de actina íntegros ($P < 0,05$) em comparação aos grupos AFP- e AFP+. Na avaliação da expressão gênica, observou-se que o grupo AFP+ manteve níveis de transcritos mais próximos aos do grupo Fresco, com exceção do gene MATER, que estava superexpresso. No grupo AFP-, os genes BMP15, MATER e ZAR1 apresentaram superexpressão em relação ao grupo Fresco. Em conclusão, a concentração de 0,25 µg/mL de AFP I demonstrou um efeito benéfico nos aspectos moleculares, como evidenciado pelos padrões de expressão gênica. No entanto, os resultados metabólicos não foram conclusivos quanto à eficácia da AFP I.

Palavras-chave: Criopreservação; Ovinos; Proteína anticongelante.

ABSTRACT

Cryopreservation of gametes is a fundamental tool to enable and enhance the application of reproductive biotechniques, ensuring greater practicality and efficiency, offering viability to germplasm banks and improving the execution of various techniques. However, the sensitivity of oocytes to cryogenic lesions limits their effectiveness. In this context, type I antifreeze protein (AFP I), known for its ability to bind to ice crystals and stabilize the membrane, emerges as a potential solution to minimize cryopreservation damage and optimize the technique. This study evaluated the influence of adding AFP I to the cryopreservation of immature ovine cumulus-oocyte complexes (COCs), on cryosurvival and oocyte metabolism, through analyses of mitochondrial activity, glutathione (GSH) levels, reactive oxygen species (ROS), actin integrity and expression of genes related to oocyte competence, cellular stress and apoptosis. For this, COCs were recovered from ovaries obtained at a local slaughterhouse. After selection, the COCs were randomly allocated into three experimental groups according to the cryopreservation treatment: i) cryopreserved without AFP I (AFP-, n= 32); ii) cryopreserved with AFP I (250 ng/mL of AFP I) (AFP+, n= 32) and iii) positive control (fresh), not subjected to cryopreservation (n= 33). Cryopreservation was performed using the vitrification technique in a Cryotop® device (Kizato, Fuji, Japan). Mitochondrial activity showed no significant difference between the Fresh and AFP+ groups after warming. However, the AFP- group exhibited a significant reduction compared to the Fresh and AFP+ groups ($P < 0.05$). The AFP+ group showed higher levels of ROS ($P < 0.05$) compared to the Fresh and AFP- groups. On the other hand, GSH levels were similar between the groups ($P > 0.05$). In the integrity analysis, the Fresh group showed a significantly higher number of oocytes with intact actin filaments ($P < 0.05$) compared to the AFP- and AFP+ groups. In the gene expression evaluation, it was observed that the AFP+ group maintained transcript levels closer to those of the Fresh group, with the exception of the MATER gene, which was overexpressed. In the AFP- group, the BMP15, MATER and ZAR1 genes showed overexpression in relation to the Fresh group. In conclusion, the concentration of 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of AFP I demonstrated a beneficial effect on molecular aspects, as evidenced by gene expression patterns. However, the metabolic results were not conclusive regarding the effectiveness of AFP I.

Keywords: *Cryopreservation; Sheep; Antifreeze protein.*

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é amplamente disseminada pelos continentes devido à facilidade de adaptação da espécie a diferentes climas, relevos, vegetações e sistemas de criação. A adaptabilidade da espécie ovina unida à duração do seu curto ciclo reprodutivo potencializa ainda mais o interesse pela criação desses animais em diferentes setores de produção (Viana, 2008). Na última década, além da importância econômica advinda do setor de produção animal em que eles se destacam como fontes de carne, leite, couro e lã, estes animais também adquiriram grande relevância como modelos para pesquisas na área de biomedicina, por apresentarem patologias semelhantes aos humanos (Zhu et al., 2018).

Parte da disseminação da ovinocultura deve-se ao avanço no emprego de biotecnologias reprodutivas. Dentro deste cenário, as técnicas de criopreservação apresentam importância significativa na difusão de material genético (Bogliolo, 2007). Porém, embora apresente diversas vantagens, ainda enfrenta limitações e produz resultados insatisfatórios (Quan; Wu; Hong, 2017). De forma geral, a técnica mais utilizada para a criopreservação de oócitos é a vitrificação, que embora seja de rápida execução, pode ocasionar danos nas estruturas pela toxicidade da alta concentração dos crioprotetores utilizados, dos cristais de gelo formados no processo de aquecimento e estresse osmótico inerente ao processo (Kim et al., 2007; Prentice; Anzar, 2011).

Considerando esses fatores, observa-se uma necessidade de otimização desta biotécnica. Neste sentido, a proteína anticongelante tipo I (AFP I), um agente biológico presente em diversos organismos que vivem em ambientes com temperaturas extremamente baixas, já tem sido associado, de forma benéfica, aos processos de criopreservação de oócitos bovinos, murinos e felinos (Jo et al., 2012; Liang et al., 2016; Leal et al., 2024). Além disso, a aplicação de AFP I não se limita apenas a oócitos, mas também abrange espermatozoides, embriões e tecidos gonadais, ampliando sua aplicabilidade e importância na preservação do material genético de diferentes estágios do desenvolvimento reprodutivo (Correia et al., 2021).

As AFPs são capazes de proteger membranas celulares contra lesões ocasionadas pelo frio. Elas interferem na formação de cristais de gelo de duas formas: por meio da (i) histerese térmica, que reduz o ponto de congelamento da

água, criando uma lacuna com seu ponto de fusão que culmina na redução da cinética de formação de gelo, e, (ii) inibição da recristalização do gelo (Rahman et al., 2019; Correia et al., 2021), que depende da capacidade da proteína de se ligar a estes cristais de gelo. Sendo assim, a investigação da influência da exposição à crioprotetores, como a AFP I, para a criopreservação de oócitos ovinos, torna-se relevante e pertinente, já que resultados positivos podem representar avanços significativos na área da criobiologia animal contribuindo com a otimização da produtividade de animais geneticamente superiores nos rebanhos ovinos.

Portanto, baseado no que foi apresentado, o objetivo desta pesquisa foi testar a adição da AFP I no meio de vitrificação de oócitos ovinos como uma alternativa para otimização da técnica. Considerando a importância da criopreservação de oócitos, não apenas para a preservação de animais de alto valor genético e econômico, mas também para a promoção da possibilidade de uso desse material em futuras pesquisas básicas e/ou aplicadas, este estudo busca, a partir dos resultados alcançados, uma maior difusão desta técnica com o intuito de potencializar os programas de melhoramento genético da espécie que são fundamentais para o aumento da produtividade da ovinocultura.

1.1 OVINOCULTURA

A espécie ovina foi uma das primeiras espécies a serem domesticadas pelos humanos. Atualmente, a espécie possui uma grande importância na pecuária mundial devido a todos os seus diferentes tipos de insumos e recursos fornecidos, como lã e couro que são elementos essenciais na confecção de vestuário, têxteis e calçados. Enquanto sua carne e leite desempenham um papel crucial na indústria alimentícia (Zhu et al., 2018), caracterizando-os assim como animais de grande importância econômica.

Como resultado da ampla disponibilidade de recursos valiosos provenientes dos ovinos, a espécie está distribuída por diversos continentes, com uma população mundial estimada em 1,296 bilhão de cabeças, conforme registrado até o ano de 2022 (IWTO, 2023). Alguns dos países com os maiores rebanhos de ovinos estão localizados na Ásia, Oceania e África. Na Ásia, a China se destaca como o país com o maior número de ovinos, com aproximadamente 187 milhões de cabeças. Na Oceania, a Austrália possui cerca de 69 milhões de ovinos. Na África, o Sudão

conta com aproximadamente 42 milhões de cabeças. Esses países lideram em números de rebanhos ovinos (FAOSTAT, 2021; IWTO, 2023).

No Brasil, observa-se a necessidade de investir em mais pesquisas e estudos sobre biotecnologias voltadas para a produção ovina. A atividade da ovinocultura se desenvolve em todo o território nacional, contabilizando um total de 20.628.699 cabeças no ano de 2020, conforme os dados da EMBRAPA (2020). A região Nordeste destaca-se como a área de maior concentração, representando 66,7% da criação ovina do país. É notável que essa região tem ampliado sua participação neste domínio, visto que, em 2017, sua proporção era de 64% (Lucena et al., 2019).

As biotecnologias reprodutivas causam impacto significativo na ovinocultura, uma vez que as aplicações das técnicas de reprodução desempenham um papel fundamental na melhoria da qualidade e da produtividade dos rebanhos ovinos. Através de técnicas como a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e métodos de transferência de embriões, as biotecnologias reprodutivas possibilitam a aceleração do melhoramento genético, a disseminação de material genético de alta qualidade e a preservação de raças raras de ovinos. Portanto, a junção dessas inovações na ovinocultura desempenha um papel de suma importância no aumento da eficiência e da sustentabilidade da indústria ovina.

1.2 BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

Biотecnologia é definida como a utilização de organismos vivos ou sistemas biológicos para aperfeiçoar ou fabricar produtos inovadores que atendam às necessidades humanas e melhorem técnicas em diversas áreas, como saúde, agricultura, pecuária e indústria (BRASIL, 1994). No âmbito da pecuária, as biotecnologias reprodutivas têm desempenhado um papel fundamental no avanço do melhoramento genético de animais de produção e no refinamento das técnicas de reprodução animal. Desde seu início, em meados do século XIX, as biotecnologias reprodutivas evoluíram de forma significativa, sendo categorizadas em quatro gerações: (i) inseminação artificial (IA) e congelamento de embriões e gametas, (ii) múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE), (iii) produção *in vitro* de embriões (PIVE) e (iv) clonagem e transgenia (Moore; Hasler, 2017).

A disponibilidade de oócitos, como material genético de base, é essencial para fomentar o desenvolvimento dessas biotecnologias. Técnicas como a MOTE, a

PIVE, a clonagem e a transgenia dependem diretamente da qualidade e viabilidade dos oócitos. Por exemplo, a MOTE é um método reprodutivo que melhora a produtividade animal ao permitir a coleta de embriões de fêmeas geneticamente superiores (Phillips; Jahnke, 2016). Essa técnica utiliza oócitos para a produção *in vivo* de embriões, que podem ser transferidos para receptoras ou criopreservados, contribuindo para a disseminação de genética de alta qualidade em rebanhos ovinos (Bergstein-Galan et al., 2019).

A PIVE, composta pelas etapas de maturação oocitária *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo embrionário *in vitro*, depende da disponibilidade de oócitos viáveis para a produção de embriões de qualidade. Além disso, a criopreservação permite o armazenamento desses embriões para uso futuro, aumentando a eficiência logística e ampliando as possibilidades de disseminação dessa técnica em programas de melhoramento genético (Camargo et al., 2006).

A clonagem e a transgenia dependem diretamente dos oócitos, que desempenham um papel essencial na manipulação genética e na produção de embriões transgênicos. Esses oócitos atuam como estruturas para a introdução do material genético ou para a fusão com células somáticas ou espermatozoides previamente manipulados, possibilitando a formação de embriões com características genéticas específicas (Vichera; Olivera; Salamone, 2011).

A criopreservação, portanto, surge como uma ferramenta imprescindível para garantir a conservação e o uso eficiente de oócitos em diversas biotecnologias. Seu papel vai além da reprodução assistida em animais de produção, abrangendo também a conservação de espécies ameaçadas por meio de bancos de germoplasma (Mariante; Albuquerque; Ramos, 2011). Ao assegurar a disponibilidade de oócitos de alta qualidade, a criopreservação viabiliza avanços na PIVE, na MOTE, na clonagem e na transgenia, promovendo inovações na reprodução assistida e no melhoramento genético animal.

1.3 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é uma biotecnologia que contribui consideravelmente para o aprimoramento e otimização das biotécnicas reprodutivas através da preservação de células e tecidos biológicos, como, oócitos, espermatozoides, embriões e tecidos gonadais. Ela auxilia não somente na formação de bancos de germoplasma, na

conservação do material genético de animais ameaçados de extinção, mas também ajuda no bem-estar animal, evitando o transporte de animais por longas distâncias, reduzindo a mortalidade e o estresse associado ao deslocamento, assim, possibilitando a disseminação do material genético (Comizzoli, 2017).

Trata-se de um processo de preservação do material genético mediante exposição a temperaturas extremamente baixas, geralmente abaixo de -196°C , em nitrogênio líquido (N_2) (Arav; Saragusty, 2018). Entre as técnicas de criopreservação mais utilizadas em pesquisas e procedimentos na área de reprodução animal destacam-se a vitrificação e o congelamento lento. Esses métodos permitem suspender temporariamente todas as funções biológicas de células ou tecidos, preservando sua viabilidade e capacidades fisiológicas intactas para uso posterior, após o reaquecimento das amostras (Leibo; Songsassen, 2002). Apesar do sucesso obtido com embriões criopreservados no estabelecimento de gestações após a transferência, a criopreservação de oócitos ainda enfrenta desafios significativos devido ao grande tamanho dessas células e à maior sensibilidade de suas estruturas às baixas temperaturas (Quan; Wu; Hong, 2017).

As técnicas de vitrificação e congelamento lento são amplamente empregadas, com suas respectivas vantagens e desvantagens. O congelamento lento é uma técnica tradicional de criopreservação que envolve um resfriamento gradual do material genético. Durante esse processo, os oócitos são resfriados até -7°C e, em seguida, gradualmente até -32°C , quando são armazenados no nitrogênio líquido a -196°C (Jain; Paulson, 2006; Whaley et al., 2021). Apesar de ser menos tóxica devido à menor concentração de crioprotetores utilizados, essa técnica pode resultar em danos celulares devido à formação de cristais de gelo, especialmente em oócitos (Kometas et al., 2021), além de ser menos acessível devido aos custos com aquisição da máquina de congelação e procedimentos demorados.

1.3.1 Vitrificação

Derivada da palavra em latim (*vit reum*) que tem como significado vidro, a vitrificação, consiste em criopreservar o material genético induzindo-o a um estado vítreo (Rajan; Matsumura, 2018). Durante o procedimento, quando submersos em nitrogênio líquido a -196°C , por convecção, é formada uma película de vapor entre a amostra e o nitrogênio, constituindo uma camada isolante, que reduz a taxa de

transferência de calor, assim resfriando de maneira muito rápida o material genético (AMINI; BENSON, 2023), criando um sólido amorfo onde não há a formação de cristais de gelo intracelulares, que tem o potencial de perfurar a membrana celular causando danos celulares irreversíveis à amostra.

A técnica de vitrificação emergiu como uma alternativa mais simples, econômica (Santos et al., 2010), além de ser a técnica mais indicada devido à rápida velocidade de resfriamento, que leva a menor ocorrência de lesões celulares durante o processo de criopreservação de oócitos (Varghese et al., 2009). Dessa maneira, como pode-se observar na tabela 1, suas taxas de sucesso são maiores quando comparadas com outras técnicas. Embora seja necessário expor o material genético gradualmente a altas concentrações de crioprotetores, adicionados às soluções geralmente em duas etapas, essa abordagem ainda é a melhor escolha para a criopreservação de oócitos.

Na primeira etapa do processo de vitrificação, o material genético é exposto à solução de equilíbrio, onde há a regulação osmótica, quando ao penetrar na célula, os crioprotetores removem a água intracelular, permitindo a sua imersão (Pegg, 2007; Whaley et al., 2021). Posteriormente, a célula é exposta à solução de vitrificação, onde há uma maior concentração de crioprotetores em sua composição, (Whaley et al., 2021). Idealmente, os crioprotetores, por serem tóxicos, devem ser ministrados em pequenas concentrações, com isso, há a necessidade de ter uma maior taxa de resfriamento e maior rapidez nesse processo (Vajta et al., 2015). Dessa forma, é de grande importância utilizar criodispositivos adequados, pois ao longo do desenvolvimento do método de vitrificação, foram criados dispositivos específicos para facilitar as características ideais para uma vitrificação eficaz. Estes dispositivos permitem um volume mínimo e uma taxa de resfriamento ultra-rápido, que permitem taxas de sobrevivência maiores (Palmerini, 2012).

A vitrificação pode ser realizada usando uma variedade de criodispositivos, podendo ser eles fechados ou abertos. Os principais são a palheta convencional (Naik et al., 2005), o cryoloop (Lane et al., 1999), o cryotop (Kuwayama et al., 2005), e a palheta aberta (*Open Pulled Straw* - OPS) (Vajta et al., 1998). Dentre as principais, as duas mais utilizadas são a técnica OPS, que pode ser realizada com volume baixo de amostra, além de ser uma técnica simples e baixo custo (Vajta et al., 1998) e o método Cryotop, que é comumente empregado na criopreservação e

demonstra resultados positivamente maiores nas taxas de sobrevivência quando comparada com as outras técnicas, como representado na tabela 2.

Dessa maneira, a técnica de vitrificação tem sido revolucionária na área da reprodução assistida, pois possibilita criopreservar o material genético para uso futuro (Lussig et al., 2019). Uma grande vantagem da vitrificação é a alta taxa de sobrevivência das células após o descongelamento, o que a torna superior a métodos mais antigos, como o congelamento lento, e evita danos às células. Dessa forma, o método de vitrificação tem transformado a medicina reprodutiva, estando em uma evolução constante de aprimoramento da técnica, visto que ainda há muito o que melhorar quando se fala de criopreservação de oócitos.

Apesar de toda inovação e da vitrificação ser a melhor técnica para a criopreservação de oócitos, ainda há um grande desafio para otimização das taxas de qualidade oocitária após o aquecimento (Pereira; Marques, 2008). A viabilidade dos oócitos após o processo ainda é baixa. Isso ocorre porque certas características tornam a criopreservação desafiadora, como o grande tamanho dos oócitos, o alto teor de água e sua composição celular (Whaley et al., 2021; Cao et al., 2022), fatores que dificultam a movimentação de água e crioprotetores através da membrana plasmática.

Tabela 1. Uso de diferentes técnicas de criopreservação - vitrificação e congelamento lento - em oócitos de diferentes espécies na literatura

Espécie	Maturação	Célula do cumulus *	Método	Resultados	Artigo/Ano
Murinos	Maduros	Sem CC	Vitrificação e congelamento lento	A vitrificação resultou em maiores taxas de sobrevivência, fertilização e eclosão do que o método de congelamento lento (85,6% vs. 63,2%; 51,0% vs. 22,3%; 38,7% vs. 12,5%, respectivamente)	Kim et al., 2006
Ovinos	Maduros	Com e sem CC	Vitrificação	Não houve diferença em vitrificar com ou sem CC; as taxas de COCs vitrificados que atingiram o estágio de blastocisto foi menor, quando comparada ao grupo controle	Zhang et al., 2009
Humanos	Maduros	Sem CC	Vitrificação e congelamento lento	A sobrevivência dos oócitos e a taxa de clivagem foram maiores na vitrificação do que no congelamento lento (81% vs. 67%; 84% vs. 71%, respectivamente).	Smith et al., 2010
Felinos	Imaturos	Sem CC	Vitrificação	A vitrificação é recomendada para criopreservação de oócitos, com base em evidências literárias que indicam sua maior eficácia para oócitos e embriões.	Colombo et al., 2023

* CC: Célula do *cumulus*.

Tabela 2. Métodos de vitrificação de oócitos de diferentes espécies utilizando diferentes criodispositivos, com foco nas taxas de sobrevivência ou viabilidade pós-aquecimento na literatura.

Espécie	Maturação	Célula do cumulus	Método	Respectivas taxas de sobrevivência	Resultados	Artigo/Ano
Ovinos	Imaturos	Com CC	Cryotop, Superfície Sólida e Palheta Convencional	77,97 ± 2,43% vs 71,13 ± 1,79% vs 56,40 ± 4,88%	Cryotop mostra menos efeitos deletérios na ultraestrutura	Ebrahimi et al., 2012
Humanos	Maduros e imaturos	Com CC	Cryotop	100%	Cryotop preserva a qualidade estrutural, evidenciada pela forma regular e pela integridade da zona pelúcida e do oolema	Palmerini et al., 2014
Ovinos	Imaturos	Com CC	OPS, Cryoloop e Palheta Convencional	85,78% ± 1,82% vs 84,24% ± 3,18% vs 67,42% ± 2,17%	Taxa de viabilidade, clivagem e blastocisto foram maiores no grupo Cryoloop; os grupos OPS e Cryoloop apresentaram menores crioinjúrias	Quan et al., 2015
Búfalos	Imaturos	Com CC	Superfície sólida e OPS	96,7% vs 71,8%	Maiores taxas de maturação, clivagem e blastocistos na SSV*	Shalofy et al., 2017

Murinos	Maduros	Sem CC	Cryotop, capilar de sílica e Cryolock	100% e 98,4% vs 93,4% e 98,2% vs 100% e 95,9%)	O protocolo LCSM* foi tão eficiente quanto o HCTM* para vitrificar oócitos e zigotos MII usando capilar de sílica, cryotop e cryolock.	Liu et al., 2021
---------	---------	--------	---------------------------------------	--	--	------------------

*SSV: Vitrificação de superfície sólida;

**LCSM: Baixa concentração de crioprotetores e um único meio;

***HCTM: protocolo tradicional de dois meios de alta concentração.

1.3.2 Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são aditivos químicos que protegem as células quando expostas a temperaturas extremamente baixas, já que o congelamento causa danos celulares, como o estresse osmótico e a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (Rajan; Matsumura, 2018). Dessa maneira, o congelamento desprotegido, torna-se letal para a célula, sendo necessário o uso de crioprotetores que auxiliam no aumento da viabilidade celular e protegem aos demais danos advindos da criopreservação (Pegg, 2007).

Os crioprotetores são organizados em duas categorias: penetrantes e não penetrantes. Quando acrescentados à solução de criopreservação em que a célula é exposta, os crioprotetores fazem com que a pressão osmótica retire a água da célula, o que causa seu encolhimento. Os crioprotetores penetrantes, por serem substâncias de molécula pequena não iônicas, possuem a capacidade de se propagar facilmente através das membranas celulares, isso faz com que ao penetrar na célula haja um equilíbrio osmótico fazendo com que esta volte ao seu tamanho original. Já os crioprotetores não penetrantes abrangem pequenas moléculas, como os açúcares, que não conseguem atravessar as membranas celulares, resultando em um contínuo encolhimento até alcançar o equilíbrio osmótico com o líquido extracelular (Raju et al., 2021)

Embora os crioprotetores possam ser benéficos para a célula quando adicionados em baixas concentrações, eles também podem causar danos, como rupturas na membrana celular, durante os processos de aumento e diminuição do tamanho celular. Além disso, quando utilizados em altas concentrações, como no método de vitrificação, tornam-se altamente tóxicos, especialmente os crioprotetores penetrantes (Rajan e Matsumura, 2018; Raju et al., 2021). Por essa razão, é preferível expor a amostra aos crioprotetores de forma gradual, aumentando as concentrações aos poucos e mantendo a exposição à célula ao mínimo necessário em termos de concentração e tempo.

1.3.3 Criopreservação de oócitos

O processo de criopreservação, pode ser realizado em oócitos imaturos ou maturados, e com ou sem a presença das células do cumulus. Normalmente, ao retirarmos os COCs dos ovários, eles ainda se encontram em estágio de prófase I da primeira meiose. Assim, é possível optar por maturá-los *in vitro* ou criopreservá-

los ainda imaturos. Estudos demonstram que COCs imaturos possuem características que promovem maior resistência ao processo de criopreservação, quando o material genético se encontra em estágio de vesícula germinativa (VG) (Kasapi et al., 2017) ao invés do estágio de placa metafásica (Luvoni, 2012; Dujíčková et al., 2021). Uma dessas características é a cromatina descondensada envolta por uma membrana nuclear e a ausência do fuso meiótico frágil, que promovem uma maior sobrevivência de oócitos imaturos após a criopreservação em comparação com oócitos maturados (Luvoni, 2012).

Entretanto, sobre o processo de criopreservar com a presença ou ausência das células do *cumulus* ainda há muitos debates acerca de seus benefícios e/ou malefícios. Sabe-se que as células do *cumulus* são cruciais para a transferência de nutrientes e moléculas sinalizadoras durante o desenvolvimento e a maturação do oócito (Luvoni, 2012). Além disso, existem evidências de que a ausência de células do *cumulus* pode resultar em uma deficiência na síntese proteica, bem como refletir nos níveis de moléculas envolvidas na regulação dos ciclos celulares meióticos e mitóticos (Combelles et al., 2005). No entanto, a presença de células do *cumulus* pode comprometer o processo de criopreservação do oócito, e isso ocorre porque elas podem prejudicar a difusão entre crioprotetores e água no oócito no meio extracelular (Luciano et al., 2009).

A criopreservação de oócitos é um grande desafio, pois esses oócitos são mais sensíveis aos processos de criopreservação em comparação com os espermatozoides, o que dificulta a obtenção de resultados ideais (Dujíčková et al., 2021). Isso ocorre devido a fatores, como seu grande tamanho, a anomalias cromossômicas, despolimerização dos microtúbulos, alterações na estrutura do fuso e rupturas na estrutura do citoesqueleto de actina (Saunders; Parks, 1999; Comizzoli, 2023). Além disso, seus sistemas biológicos são mais difíceis de congelar devido à alta quantidade de água, o que prolonga o tempo necessário para atingir o equilíbrio osmótico com os crioprotetores. Os lipídios, por sua vez, representam uma das principais causas de danos celulares durante o resfriamento, pois a transição de fase lipídica pode alterar e interromper os processos intracelulares (Coticchio et al 2007; Leal et al., 2024).

1.3.4 Danos estruturais provocados pela criopreservação

Durante o processo de criopreservação e aquecimento, os oócitos são submetidos a uma série de processos que podem resultar em danos estruturais, culminando em toxicidade, disfunção celular e comprometimento das organelas (Chang et al., 2022). Esses efeitos adversos podem começar a surgir desde o momento inicial em que os ovários são transportados até o laboratório, até ao momento do aquecimento onde há o risco de recristalização, que é um dos principais responsáveis por lesões criogênicas durante o momento do aquecimento do processo de vitrificação. Um dos possíveis danos causados durante o processo da vitrificação, o choque osmótico, pode ocorrer quando há a adição das soluções crioprotetoras, quando os oócitos são expostos a altas concentrações de crioprotetores permeáveis, ocorre uma desidratação intensa que os faz encolher devido à perda de água. No entanto, com a entrada dos crioprotetores, eles recuperam seu volume inicial. Esse processo pode causar uma significativa alteração no volume dos oócitos, que podem causar estresse osmótico, lesões na membrana plasmática e zona pelúcida ou até mesmo apoptose (Chen et al., 2022).

Além disso, reduzir a temperatura também pode causar danos às estruturas sensíveis, como o citoesqueleto e a membrana plasmática. Essa sensibilidade da membrana está associada à sua composição lipídica (Arav; Zvi, 2008). Durante o resfriamento, a membrana fosfolipídica passa por uma transição lipídica, onde os ácidos graxos alternam entre os estados líquido e sólido. Como nem todos os ácidos graxos têm a mesma temperatura de transição, isso interfere na função da membrana, causando vazamento de íons e morte celular (Arav; Zvi, 2008). Danos ao citoesqueleto também são comumente associados a criopreservação, podendo causar uma despolimerização dos microtúbulos do fuso, perda de microtúbulos, à desorganização dos cromossomos e distribuição irregular de elementos do citoesqueleto após aquecimento de oócitos imaturos (Morató et al., 2008; Luciano et al., 2009; Iussig et al., 2019). Entende-se que, os microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto são essenciais para a fertilização e maturação, os microfilamentos de actina permitem a migração dos grânulos corticais e a expulsão do corpúsculo polar, ambos essenciais para a fertilização adequada. Ao mesmo tempo, a tubulina forma o fuso meiótico que alinha os cromossomos na placa metafásica (Luvoni, 2012).

O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) também é causado por mudanças bruscas de temperatura durante a vitrificação dos oócitos.

Durante o aquecimento dos oócitos, o estresse térmico pode causar disfunção mitocondrial e alterações no influxo de Ca^{2+} por causa do estresse oxidativo, podendo resultar em uma possível redução da taxa de maturação *in vitro* dos oócitos (Cao et al., 2022). Nesse caso, muitas organelas podem ser afetadas, principalmente as complexas, como as mitocôndrias, que estão envolvidas em vários processos celulares e são responsáveis pelo fornecimento de energia consumida durante o processo de maturação na forma de ATP por meio da fosforilação oxidativa. Elas também desempenham um papel importante como parte essencial da maquinaria metabólica. A qualidade e a capacidade de desenvolvimento de oócitos e embriões de mamíferos estão ligados à distribuição citoplasmática das mitocôndrias, que também desempenham um papel em várias vias de sinalização, na apoptose celular, na homeostase celular e no metabolismo de ácidos graxos (Almansa-Ordonez et al., 2020; Cajas et al., 2020).

Ademais, o processo de criopreservação pode resultar em danos à estrutura e função celular, onde há a necessidade de gerar maior energia, aumentando a atividade mitocondrial, promovendo o aumento na produção EROs (Tatone et al., 2010). Quando em baixos níveis, as EROs possuem importância fisiológica, atuando na regeneração tecidual, na regulação redox intracelular, na embriogênese, com o estímulo à competência do oócito e na regulação da taxa de pré-implantação no desenvolvimento embrionário (Cajas et al., 2020; Combelles et al., 2009). Entretanto, quando há um aumento exacerbado nos níveis de EROs, onde não há a possibilidade de serem eliminados pelos mecanismos de defesa antioxidantes (Cao et al., 2022), a estabilidade da homeostase redox dentro da célula é perturbada, levando ao aumento do estresse oxidativo, o que por sua vez provoca danos ao DNA dentro da célula, além de poder ocasionar a oxidação de moléculas celulares, como lipídios, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos. Essas alterações comprometem suas funções e prejudicam a viabilidade celular, levando à peroxidação lipídica, danos mitocondriais e apoptose (Cajas et al., 2020; Silveira et al., 2008).

1.3.5 Indicadores de competência oocitária

Embora os oócitos sejam suscetíveis a diversos danos estruturais durante o processo de criopreservação, há fatores que podem diminuir tais efeitos adversos, dentre eles, há enzimas e antioxidantes endógenos importantes que estão

presentes nas células e são capazes de proteger o oócito dos efeitos nocivos do estresse oxidativo, com sua função primordial de inibir a geração de EROs ou atuar como coletores desses radicais. Os antioxidantes são moléculas essenciais para manter o equilíbrio entre a defesa antioxidante e o estresse oxidativo. De maneira resumida, retardam ou impedem a oxidação de proteínas, carboidratos e lipídios e até mesmo do DNA e do RNA (Rodríguez-Varela; Labarta, 2020). Além da avaliação de enzimas e antioxidantes, a competência oocitária também pode ser analisada por meio do PCR quantitativo (qPCR). Este método mede os níveis de expressão de genes que refletem a capacidade do oócito de enfrentar o estresse e seu potencial de desenvolvimento após a vitrificação (Barberet et al., 2020).

1.3.5.1 Glutathione (GSH)

A GSH é um antioxidante que, quando sintetizado nos oócitos, pode controlar o estado redox das células e estimular a maturação citoplasmática (Hammond; Lee; Ballatori, 2001). Além disso, protege a morfologia e a função do fuso meiótico contra o estresse oxidativo durante a maturação *in vitro* (García-Martínez et al., 2020). A GSH desempenha várias funções importantes na fisiologia e no metabolismo intracelular, sendo uma das mais cruciais a manutenção do estado redox nas células, protegendo-as contra danos oxidativos (Lafleur et al., 1994). Há estudos relacionados a criopreservação de oócitos de camundongos que indicam que a suplementação de GSH durante a vitrificação e o aquecimento no estágio de VG protege esses oócitos da perda de competência de desenvolvimento causada pelo congelamento, aumentando a taxa de sucesso no desenvolvimento pré-implantação (Moawad; Tan; Taketo, 2016).

1.3.5.2 ZAR1

O *ZAR1* (zygote arrest 1) é uma proteína associada ao efeito materno específico dos oócitos e é fundamental para o início do desenvolvimento embrionário (Uzbekova et al., 2006). Ela tem um papel importante na transição do oócito para o embrião, contribuindo para o desenvolvimento embrionário e o controle da fertilidade em mamíferos (Wu et al., 2003). Além disso, os genes *ZAR1* e *ZAR2* são essenciais para a maturação meiótica do oócito, regulando o transcriptoma materno e a ativação translacional do mRNA (Rong et al., 2019).

1.3.5.3 MATER

O Antígeno Materno Requerido pelo Embrião (*MATER*) é uma proteína específica dos oócitos que depende do genoma materno, sendo essencial para o desenvolvimento inicial do embrião (Sena et al., 2009). Ele é crucial para que o embrião se desenvolva além do estágio de duas células (Tong et al., 2000; Penner et al., 2006). Fêmeas que não possuem o *MATER* se tornam estéreis (Penner et al., 2006). Além disso, a redução na expressão desse gene leva a uma diminuição na coesão do centrômero, o que pode impactar negativamente a qualidade dos oócitos (Lu; He; Zeng, 2016).

1.3.5.4 GDF9 e BMP15

Os genes *GDF9* (fator de diferenciação de crescimento 9) e *BMP15* (proteína morfogênica óssea 15) geralmente atuam em conjunto, desempenhando um papel crucial na foliculogênese ovariana (Kathirvel et al., 2013). O *GDF9* é essencial para o crescimento das células da granulosa e da teca, além de ser vital para a diferenciação e maturação dos oócitos (Hreinsson et al., 2002). O *BMP15*, por sua vez, está envolvido na maturação dos oócitos e no desenvolvimento folicular, funcionando sozinho ou em parceria com o *GDF9*. Ambas as proteínas são expressas progressivamente pelos oócitos nos folículos em crescimento ao longo da foliculogênese (Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998).

1.3.5.5 HSP70

O HSP70 (proteína de choque térmico 70), é uma proteína responsiva ao estresse celular, assim como o estresse oxidativo, ela desempenha um papel como chaperona molecular e proteína citoprotetora, auxiliando na proteção celular contra danos em condições de estresse, como ocorre na criopreservação. Sob estresse térmico, sua produção é intensificada (Vendrell-Flotats et al., 2017). Essa intensificação protege componentes celulares importantes, como proteínas e organelas, de danos causados por condições adversas. Na criopreservação, onde as células enfrentam baixas temperaturas e mudanças bruscas no ambiente, o HSP70 ajuda a evitar a desnaturação de proteínas e a reparar danos estruturais (Evans, Chang e Gestwicki, 2010)

1.3.5.6 PRDX1

O gene *PRDX1* (Peroxirredoxina-1) é um marcador de estresse oxidativo devido à sua função de regulação dos níveis de EROs (Leyens, Knoops, Donnay, 2004). atua como um neutralizador do peróxido de hidrogênio, prevenindo danos oxidativos em células em condições de estresse, como hipóxia ou exposição a agentes oxidativos. Sua expressão é regulada por fatores de transcrição e pode ser induzida por condições de estresse celular (Shiota et al., 2008).

1.3.5.7 SIRT2

O *SIRT2* (Sirtuina 2) é essencial para a maturação de oócitos, regulando as células da granulosa e mantendo a homeostase celular. Essa proteína responde ao estresse oxidativo, contribuindo para a integridade genômica e o equilíbrio do metabolismo energético, frequentemente alterado em situações de estresse. Sua inibição pode causar disfunções mitocondriais, aumento de EROs, redução na produção de ATP e defeitos nos fusos cromossômicos, comprometendo a qualidade oocitária (Xu et al., 2019). Além disso, a ausência de *SIRT2* acelera o envelhecimento celular e induz apoptose dependente de autofagia (Fang et al., 2022; Xu et al., 2019).

1.3.5.8 BCL-2

O gene *BCL-2* (linfoma de células B 2) tem uma função essencial na regulação da apoptose durante a criopreservação de oócitos, favorecendo a viabilidade e a competência desses gametas. Pesquisas com modelos transgênicos murinos indicam que a superexpressão do *BCL-2* diminui a apoptose em oócitos e folículos ovarianos, promovendo maior sobrevivência e maturação dos oócitos, até mesmo em situações adversas, como tratamentos com agentes químicos ou a criopreservação (Morita et al., 1999).

1.3.5.9 BAX

O *BAX* (proteína associada a Bcl-2 tipo X) é um importante regulador de apoptose e possui um papel importante na criopreservação de oócitos, onde o equilíbrio entre genes pró-apoptóticos (como *BAX*) e antiapoptóticos (como *BCL-2*) é crítico para a sobrevivência celular. A expressão do gene *BAX* é aumentada em oócitos vitrificados, especialmente em condições de estresse (Arcarons et al., 2019).

1.4. PROTEÍNAS ANTICONGELANTES

As proteínas anticongelantes (*antifreeze protein*, AFP) são compostos polipeptídicos sintetizados por diversos organismos, como, bactérias, fungos, plantas, insetos e vertebrados que vivem em temperaturas extremamente baixas. Elas se encontram presentes nesses organismos como uma defesa desenvolvida através da seleção natural, de forma a evitar que o corpo seja congelado pelo ambiente externo, reduzindo a temperatura na qual os líquidos do corpo congelam (Xiang et al., 2020). Além disso, as AFPs têm potencial de inibir a formação de cristais de gelo através da histerese térmica (Flores et al, 2018; Cheung; Wong, 2017) que é o processo em que a AFP se liga as superfícies de cristais de gelo reduzindo a temperatura de congelamento da água de forma não coligativa, impedindo o crescimento descontrolado dos cristais de gelo e prevenindo danos celulares (Correia et al., 2021; Ekpo et al., 2022). Outra característica das AFP é sua habilidade de interação com as membranas biológicas que promove estabilização e protegem a integridade estrutural da célula (Robles et al., 2019; Baskaran et al., 2021).

Os primeiros estudos sobre as AFPs, foram realizados a partir do ano de 1957, a partir das observações e questionamentos levantados por Scholander (1957) que isolou as primeiras AFPs dos peixes *Myoxocephalus scorpius* e *Salvelinus alpinus* (Baskaran et al., 2021). Posteriormente, em 1969, descobriu-se que as AFPs atuam como substâncias biológicas capazes de evitar o congelamento, permitindo que peixes *notothenioids* antárticos sobrevivam em águas com temperaturas abaixo de zero (Devries, 1971; Baskaran et al., 2021), determinando que essa adaptação se deve à presença de glicoproteínas que, ao diminuir o ponto de congelamento de maneira não coligativa, retardam o crescimento de cristais de gelo nas células desses organismos (Devries, 1971; Correia et al., 2021). Desse momento em diante as AFPs foram sendo encontradas em diversos organismos.

As AFPs, conhecidas também como proteínas de histerese térmica, proteínas de ligação gelo ou estruturação são classificadas de acordo com o organismo que elas são extraídas. Existem quatro categorias diferentes de AFP que são extraídas de peixes, a AFP I, II, III e AFGPs (glicoproteínas anticongelantes) (Baskaran et al., 2021). Cada uma dessas proteínas é empregada para diferentes finalidades, dependendo de características como a sequência de aminoácidos, estrutura

proteica, composição química, peso molecular, valor de histerese térmica e capacidade de adsorção na superfície do gelo. Com base nessas características, elas podem ser classificadas como moderadas ou hiperativas (Ekpo et al., 2022), apresentando domínios e afinidades específicas para cada tipo (Jia; Davies, 2002; Robles et al., 2019).

A AFP I, extraída do soro sanguíneo do peixe *Pseudopleuronectes americanus*, é notável por possuir 60% de alanina (Baskaran et al., 2021) e estruturas helicoidais, α -helicoidal, de tamanho de 6,48 KDa, além de possuírem atividade de histerese térmica de perfil moderado (Ekpo et al., 2022), que define que sua adsorção na superfície do gelo tenha uma maior lacuna de aderência ao cristal de gelo, comparada com AFPs de perfil hiperativo (Ekpo et al., 2022). Além disso, entre as proteínas anticongelantes, a AFP I vem sendo recentemente cada vez mais estudada na criopreservação de oócitos, embora seja menos utilizada em relação à AFP III (Kim et al., 2017). A AFP II, por sua vez, é principalmente constituída por cisteína, com um tamanho de 14 kDa. Recentemente, a aplicação da AFP II, além de ser comumente utilizada na indústria alimentícia para preservar alimentos congelados por um período maior, também tem sido explorada na criopreservação de gametas, como uma estratégia para prevenir os efeitos prejudiciais deste procedimento (Cheung et al., 2016; Robles et al., 2019). A AFP III se destaca pela praticidade de produção, contendo apenas 66 aminoácidos e 7 kDa. O aumento de seu tamanho pode intensificar a atividade anticongelante, permitindo maior ligação aos cristais de gelo (Yeh; Feeney, 1996; Kim et al., 2017). Já a AFGP apresenta repetições de peptídeos alanina-alanina-treonina com dissacarídeos em cada treonina (Xiang et al., 2020), desempenhando papel relevante na criopreservação, apesar de ser menos estudada.

As proteínas anticongelantes têm sido objeto de diversos estudos e pesquisas biotecnológicas, sendo utilizadas principalmente para pesquisas em criopreservação, como pode-se observar na Tabela 3. Suas características passaram a ser empregadas em várias aplicações, depois que a descobriram e a isolaram (Correia, et al., 2021). As vantagens da AFP na técnica de vitrificação estão principalmente relacionadas a características como estabilização de membranas, defesa contra danos pelo congelamento e impedimento da recristalização (Wen et al., 2014), onde as proteínas operam mitigando a formação de cristais de gelo, através da histerese térmica, diminuindo a temperatura de

solidificação para além do ponto de fusão, desempenhando assim um papel de defesa para a integridade da membrana celular (Rahman et al. 2019).

Estudos recentes demonstraram que o uso de altas concentrações de AFPs resultou em efeitos negativos quando comparado ao uso de baixas concentrações em oócitos de mamíferos (Correia et al., 2021). Em espermatozoides, concentrações superiores a 10 µg/mL de AFP I e AFP III demonstraram uma redução significativa na motilidade (Payne, Oliver e Upreti, 1994; Jant et al., 2020). Além disso, pesquisas utilizando diferentes tipos de AFPs em concentrações variadas para aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos foram realizadas em ratos, suínos e felinos (Rubinsky et al., 1992, Jo et al., 2011; Leal et al., 2024). Em ambas as espécies, a presença de AFPs resultou em um aumento significativo na taxa de sobrevivência, alcançando 82% e 25%, respectivamente (Rubinsky et al., 1992). No experimento conduzido por Jo et al. (2011), a adição de AFP III ao meio de vitrificação dos oócitos maduros de camundongos resultou em um aumento das taxas de sobrevivência após os estágios de aquecimento, fertilização e formação do blastocisto. Já no experimento realizado com AFP I em COCs felinos, foi comprovado que a AFP I contribui para melhorias nos aspectos morfológicos, estruturais e moleculares, apresentando resultados positivos na integridade dos filamentos de actina e no padrão de expressão gênica (Leal et al., 2024).

Este estudo é de extrema importância científica por ser o pioneiro na investigação dos efeitos das AFPs na espécie ovina, um campo ainda inexplorado na literatura. Pois, embora já existam pesquisas com outras espécies, a ausência de estudos em ovinos representava uma lacuna importante, uma vez que cada espécie pode responder de maneira única a esses mecanismos. Ao analisar os efeitos da AFP em oócitos de ovinos, este trabalho não só abre novas possibilidades para a sua aplicação na ovinocultura, mas também enriquece o conhecimento científico sobre o seu papel em diferentes sistemas biológicos. As descobertas a partir desse trabalho podem esclarecer como a AFP protege as células contra os danos causados pela criopreservação, além de fornecer bases para futuras pesquisas, tanto em ovinos quanto em outras espécies. Dessa forma, este estudo representa um grande avanço, ampliando o potencial de aplicações e o entendimento das AFPs na reprodução animal.

Tabela 3. Utilização de proteínas anticongelantes (AFP) na criopreservação de oócitos de diferentes espécies na literatura.

Espécie	Material biológico	AFP	Taxa de sobrevivência	Taxa de clivagem	Taxa de blastocistos	Resultados	Artigo/Ano
Murinos	Oócito	AFP III	Sem (84,5%) Com (94,6%)	Sem (80,5%) Com (94,8%)	Sem (85,6%) Com (94,0%)	A adição de AFP ao meio de vitrificação preservou a integridade do fuso, da membrana e o nível de ATP intracelular.	Jo et al., 2011
Murinos	Oócito	AFP III	Sem (75,0%) Com (85,0%)	Sem (58,7%) Com (81,2%)	Sem (52,3%) Com (76,8%)	A AFP melhora a qualidade dos oócitos e o desenvolvimento embrionário, aumentando as taxas de sobrevivência, clivagem e formação de blastocistos em comparação ao grupo controle.	Lee et al., 2015
Bovinos	Oócito	AFP III	-	Sem (17,9%) Com (17,8%)	Sem (5,0%) Com (6,3%)	A AFP melhorou o desenvolvimento embrionário até o quinto dia de cultura, na concentração de 1 µg/mL, embora sem efeito prolongado na formação do blastocisto.	Chaves et al., 2016

Felinos	Oócito	AFP I	Sem (56,1 %) Com (84.4%)	-	-	A concentração de 1 µg/mL de AFP I na solução de vitrificação melhora os aspectos morfológicos, estruturais e moleculares.	Leal et al., 2024
---------	--------	-------	-----------------------------	---	---	--	----------------------

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de AFP I nas soluções de equilíbrio e vitrificação sobre aspectos metabólicos, moleculares e estruturais de COCs imaturos após vitrificação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da adição da AFP I nas soluções de equilíbrio e vitrificação de COCs imaturos de ovinos após o aquecimento sobre a(os):

2.2.1 Integridade dos filamentos de actina;

2.2.2 Atividade mitocondrial;

2.2.3 Níveis de EROs e GSH;

2.2.4 Expressão de genes relacionados à competência oocitária, estresse e apoptose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Os COCs foram recuperados a partir de ovários obtidos em abatedouro local, sendo realizadas 4 rotinas de obtenção e vitrificação. Um total de 97 COCs foram distribuídos aleatoriamente entre os três grupos experimentais: o grupo controle positivo (fresco), e os grupos vitrificados utilizando o dispositivo Cryotop® (Kizato, Fuji, Japão) na presença (grupo AFP+: 250 ng/mL de AFP I) ou ausência (AFP-: grupo sem suplementação de AFP I) de AFP I. Foram realizadas duas rotinas de aquecimento para a condução das análises de atividade mitocondrial, mensuração de GSH e EROs, integridade dos filamentos de actina e expressão gênica. O total de COCs utilizados em cada análise é especificado na Tabela 4.

Tabela 4. Número de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) de ovelhas frescos e vitrificados com e sem proteína anticongelante tipo I (AFP I) de cada grupo experimental utilizado em cada análise.

	Morfologia				TOTAL*
	Integridade da actina	Atividade mitocondrial	ERO e GSH	Expressão gênica	
Fresco*	18	18	18	15	33
AFP-*	16	17	17	15	32
AFP+*	16	17	17	15	32

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: Controle sem suplementação de AFP I; AFP+: suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I

**Foram utilizados os mesmos COCs para análise de EROs, GSH, Atividade mitocondrial e integridade da actina.

3.2 RECUPERAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE COCs

Os ovários foram coletados em abatedouro local e transportados até o laboratório em um tempo de 1-2 h em soro fisiológico suplementado com 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL estreptomicina a 35 °C. No laboratório, os ovários foram lavados com soro fisiológico aquecido a 38 °C e os COCs foram aspirados de

folículos visíveis de 2 a 6 mm de diâmetro com uma agulha acoplada a uma seringa de 10 mL. Posteriormente, os ovários já aspirados foram submetidos à técnica de *slicing*, sendo fatiados com auxílio de bisturi, lavados com meio de manipulação (MM) para recuperação do conteúdo e em uma placa de Petri de 60 mm. Este conteúdo foi observado sob estereomicroscópio (Nikon SMPZ 800, Nikon, Japão) para rastreamento dos COCs. O MM utilizado para a recuperação oocitária foi composto por TCM 199 com 25 mM HEPES suplementado com 50 µg/mL gentamicina e 4 mg/mL de albumina bovina sérica (*bovine serum albumin* - BSA). Após a coleta, os COCs foram selecionados e classificados em graus I, II, III e IV; e apenas os COCs I e II que apresentam citoplasma homogêneo e duas ou mais de três camadas de células do *cumulus* (Wood; Wildt, 1997) foram escolhidos para o experimento.

3.3 VITRIFICAÇÃO

Após a obtenção e classificação, os COCs foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais. A técnica de vitrificação seguiu o protocolo conforme descrito por Dos Santos-Neto et al. (2020). Durante o processo, foi empregado meio MM composto por TCM 199 com tamponamento de HEPES, enriquecido com 20% de soro fetal bovino. As etapas de manuseio dos oócitos ocorreram a 37 °C na mesa aquecedora, onde todos os meios utilizados na vitrificação foram mantidos a uma temperatura ambiente de 28 °C.

O procedimento foi realizado utilizando o dispositivo Cryotop[®], conforme descrito por Dos Santos-Neto et al. (2020). Grupos de cinco COCs foram transferidos para gotas de 300 µL de uma solução de equilíbrio composta por 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 15 min em MM. Em seguida, os COCs foram transferidos para gotas de 300 µL de uma solução de vitrificação contendo 15% de EG, 15% de DMSO e 0,5 mol/L de sacarose em MM, permanecendo nesta solução por 90 s. Por fim, foram alocados em dispositivos Cryotop[®] com um volume mínimo (< 0,1 µL) e imersos diretamente em N₂.

3.4 AQUECIMENTO

O processo de aquecimento foi efetuado pela imersão do Cryotop[®], em uma solução de aquecimento contendo 1 mol/L de sacarose dissolvido em MM a 37 °C, com duração de 1 minuto. Os oócitos previamente aquecidos foram transferidos

para gotas de 300 μL de uma solução de diluição, constituída de MM suplementado com 0,5 mol/L de sacarose, durante 3 min, seguido por dois enxágues em gotas de 300 μL de MM, cada um com duração de 5 min (Hosseini et al., 2012).

3.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Após o aquecimento dos COCs dos grupos vitrificados e a seleção e classificação dos COCs do grupo fresco, todos foram lavados em PBS com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), desnudados com auxílio de hialuronidase e incubados com as respectivas sondas de cada análise. As análises foram realizadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon 912 Corporation, Tokyo, JP), ajustando os parâmetros para que as imagens exibidas no monitor correspondessem às visualizadas no microscópio. Imagens foram capturadas para posterior análise de intensidade de fluorescência pelo software ZEN 3.9 Blue Edition 32 (ZEISS Microscopy, Alemanha). As imagens foram convertidas para escala de cinza e tiveram a intensidade ajustada subtraindo a média da intensidade, do fundo do resultado final. Cada oócito foi medido (área em μm^2) e teve sua média da intensidade calculada (Unidades Arbitrárias, U.A), obtendo a intensidade por área (A.U./ μm^2) (Paschoal et al., 2017).

3.5.1 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial foi mensurada de acordo com Leal et al. (2024). Resumidamente, os oócitos foram incubados a 38,5 °C por 30 min em PBS suplementado com 100 nM MitoTracker® Red (CMXRos, Molecular Probes). Após a incubação, os oócitos foram lavados em PBS suplementado com 0,1% de BSA, posicionados em lâminas, cobertos com lamínulas e analisados em um microscópio de fluorescência equipado com filtros UV (581/644). A avaliação foi realizada seguindo os critérios descritos previamente.

3.5.2 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH) E DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As análises de mensuração dos níveis de EROs e GSH, foram realizadas de acordo com Piras et al. (2018) utilizando 10 nM de 2', 7' diacetato de diclorodihidro-fluoresceína (H2DCHFDA, Invitrogen™, D399) e 10 mM de 4-clorometil-6,8-difluoro-

7-hidroxicumarina (CMF2HC, Cell Tracker Blue, Invitrogen™, C12881) que detectam níveis intracelulares de EROs e GSH como fluorescência verde e azul, respectivamente. Grupos de oócitos de cada grupo experimental foram incubados no escuro por 30 min a 38,5 °C em atmosfera com 5% de CO₂ em PBS suplementado com BSA 0,1% contendo 10 µM de H2DCFDA e 10 µM de Cell Tracker Blue. Após o período de incubação, os oócitos foram lavados e posicionados entre lâmina e lamínula para análise em microscópio de fluorescência, utilizando filtros UV (371/464) para GSH e (485/535) para EROs. A avaliação foi conduzida conforme descrito previamente.

3.5.3 INTEGRIDADE DA ACTINA

A análise de integridade da actina foi adaptada de Leal et al. (2020) e Scheffler et al. (2022). Os oócitos foram fixados e permeabilizados em uma solução de PBS contendo 0,1% de BSA, 0,5% de Triton X-100 e 2% de paraformaldeído por 30 min a 38,5 °C. Após esse período, foram lavados e incubados em PBS com 0,1% de BSA. Posteriormente, foram corados em solução contendo 1 UI de Alexa Fluor 350 Phalloidin (Invitrogen, Waltham, MA, USA) em PBS com 0,1% BSA por 30 min, a 38,5° C. Em seguida, foram lavados três vezes em PBS com 0,1% BSA, colocados em lâmina, avaliados em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon Corporation, Tóquio, JP) com filtros UV (346/442 nm) e capturadas (Visualizador Pylon, Basler AG, Exton, PA, EUA) e analisadas para quantificar os níveis de F-actina intacta por meio da medição da intensidade de fluorescência.

3.6 EXPRESSÃO GÊNICA

Para a inferência da competência de desenvolvimento dos COCs vitrificados na presença ou ausência da AFP I, a quantidade dos transcritos relacionados a competência oocitária (*BMP15*, *GDF9*, *MATER* e *ZAR-1*), estresse (*HSP70*, *PRDX1* e *SIRT2*) e apoptose (*Bcl-2* e *BAX*) foi avaliada utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR).

3.6.1. Extração do RNA

O RNA total foi extraído de três *pools*, cada um contendo cinco COCs de cada grupo experimental, tratados com DNase, utilizando o kit Rneasy Micro Kit

(Qiagen, Valencia, USA), de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante. A quantificação do RNA extraído em cada *pool* foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop Lite, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

3.6.2 Transcrição reversa

A transcrição reversa realizou-se utilizando a enzima SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em todas as amostras com a mesma concentração de RNA. A reação de transcrição reversa foi realizada em dois passos: o primeiro mix continha primers oligo (dT)₂₀, mistura de dNTPs, água livre de nucleases e o molde de RNA, com volume total de 13 µL por amostra; o segundo mix continha Superscript IV Reverse Transcriptase, inibidor de RNase RNaseOUT, DTT e tampão Superscript IV RT, com volume total de 7 µL por amostra, totalizando um volume final de 20 µL. Em seguida, cada amostra do primeiro mix foi incubada a 65 °C por 5 min, seguida de 4 °C por 3 min, momento em que o segundo mix foi adicionado. Após isso, a síntese de cDNA foi realizada a 50 °C por 10 min, 80 °C por 10 min e 4 °C por 1 min. Por fim, as amostras foram resfriadas em gelo ou armazenadas a -20 °C até a realização da reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

3.6.3 Amplificação

A quantificação relativa foi realizada em triplicatas utilizando qPCR (Applied Biosystems QuantStudio 3, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 5. As reações, com volume total de 20 µL, foram preparadas com uma mistura contendo 10 µL do kit SYBR Green (Power SYBR Green, Applied Biosystems), 0,1 µM de primers, água livre de nucleases e 0,5 µL de cDNA transcrito reversamente. Controles negativos, compostos pelo mix da reação de PCR sem ácidos nucleicos, também foram processados junto a cada grupo de amostras. O cDNA molde foi desnaturado a 95 °C por 15 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento dos primers a 60 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s. Os dados de fluorescência foram adquiridos durante as etapas de extensão. Após cada corrida de PCR, uma análise da curva de melting foi realizada para confirmar a formação de um único produto específico. A eficiência dos primers foi calculada utilizando o software LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) para cada reação, apresentando as seguintes médias: 1,98 para *BMP15* (proteína

morfogenética óssea), 1,97 para *GDF9* (fator de crescimento e diferenciação), 1,92 para *MATER* (gene materno necessário para o embrião), 1,92 para *ZAR1* (bloqueio zigótico 1), 1,96 para *HSP70* (proteína de choque térmico), 1,97 para *PRDX1* (Peroxiredoxina), 1,99 para *SIRT2* (sirtuina), 1,94 para *BCL-2* (Linfoma de células B) e 1,95 para *BAX* (proteína associada a Bcl-2 tipo X). A quantificação relativa foi realizada pelo método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) utilizando o software REST 2008 (Livak; Schmittgen, 2001). A expressão de cada gene alvo foi normalizada pela média geométrica dos valores de *GAPDH*. A estabilidade do gene de referência foi calculada conforme a metodologia descrita por Pfaffl et al. (2004), utilizando a ferramenta BestKeeper no Excel.

Tabela 5. Sequências, tamanhos e referências dos primers utilizados para a realização do PCR em tempo real dos complexos *cumulus*-oócitos frescos e vitrificados com e sem proteína anticongelante tipo I (AFP I) de ovinos.

Genes	Sequência dos primers	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>BMP15</i>	F: GACAGCCCTCTAATGCCCTC R: CCAATGGTGCGGTTCTCTCT	187	NM_00116589 81
<i>GDF9</i>	F: AGTTCAGATTGCAGCGGGGTG R: GATGTGAAGAGCCGAGCAGT	264	NM_00116590 01
<i>MATER</i>	F: CAGCCTCCAGGAGTTCTTTG R: GACAGCCTAGGAGGGTTTCC	212	Bebbere et al., 2008
<i>ZAR1</i>	F: CATCCGATGGGAAAGTGCCT R: GCTGTCACAGGATAGGCGTT	241	XM_02325223 8.2
<i>HSP70</i>	F: GGCATCGATGTCTGAAGGTCA R: ATCCAGGTGTACGAGGGTGA	129	XM_01983038 6.3
<i>PRDX1</i>	F: CCCACGGAGATCATTGCTT R: AATGGTACGCTTGGGGTCTG	181	XM_00399003 5.5
<i>SIRT2</i>	F: GCCAGACTGACCCTTTCCTC R: GGTGGTGGAGAATTCCTGGG	145	Ishikawa et al., 2013.
<i>BCL-2</i>	F: GTCGCTACCGTCGTGACTTC R: CAGACATGCACCTACCCA	214	Chakravarthi et al., 2015
<i>BAX</i>	F: ATGCGTCCACCAAGAAGCTCAG R: CCCAGTTGAAGTTGCCATCAG	566	Chakravarthi et al., 2015

*F: forward; R: reverse; *BMP15*: bone morphogenetic protein 15; *GDF9*: growth differentiation factor 9; *MATER*: Maternal antigen that embryo requires; *ZAR1*: zygote arrest 1; *HSP70*: 70 kilodalton heat shock protein; *PRDX1*: peroxiredoxin-1; *SIRT2*: sirtuin 2; *BCL-2*: B-cell lymphoma 2; *BAX*: Bcl-2-associated X protein.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homocedasticidade de Levene. Os dados não paramétricos (atividade mitocondrial, níveis de EROs e GSH) foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido post hoc de Dunn. Já os dados de integridade da actina foram submetidos a Anova seguida de Tukey. O software utilizado foi Bioestat versão 5.3, com intervalo de confiança de 95% e valor de $P < 0,05$ como significativo.

4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Não houve diferenças significativas entre o grupo fresco e AFP+. Já o grupo AFP- obteve menor atividade mitocondrial quando comparado aos demais ($P < 0,05$), conforme ilustrado nas Figuras 1 e 2.

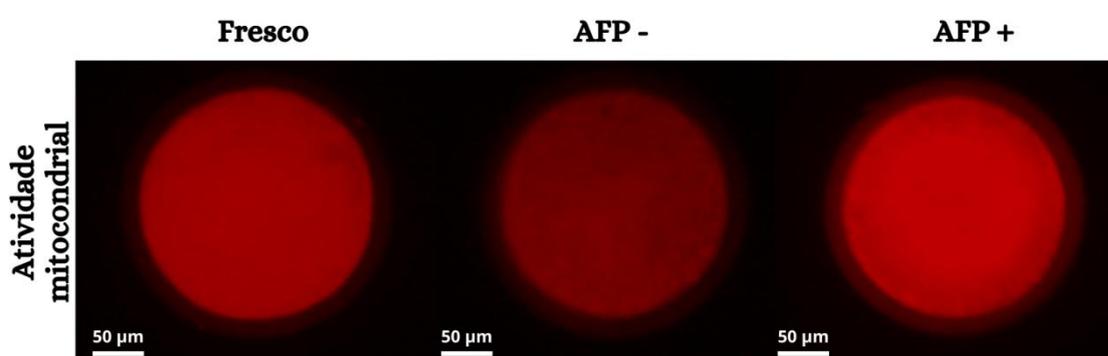


Figura 1: Oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com MitoTracker Red para avaliação da atividade mitocondrial.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I ($0,0 \mu\text{g/mL}$) e AFP+: grupo suplementado com $0,25 \mu\text{g/mL}$ de AFP I.

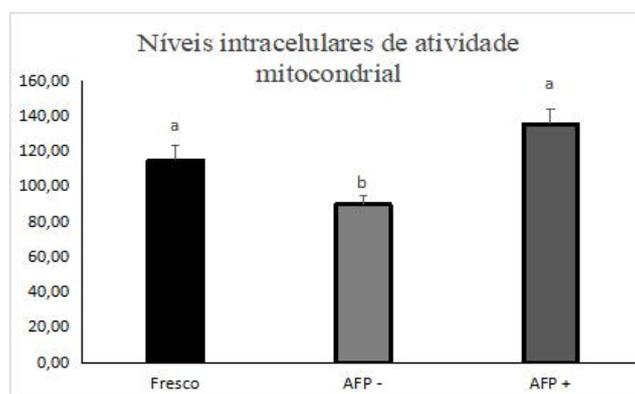


Figura 2: Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de equilíbrio e vitrificação sobre a atividade mitocondrial, mensurada pela intensidade de fluorescência/ μm^2 , em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados com MitoTracker Red.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I ($0,0 \mu\text{g/mL}$) e AFP+: grupo suplementado com $0,25 \mu\text{g/mL}$ de AFP I.

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

4.2 MENSURAÇÃO DE EROs e GSH

O grupo AFP+ apresentou maiores ($P < 0,05$) níveis intracelulares de EROs quando comparado com os grupos fresco e AFP-, que não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$). Não foi encontrada diferença nos níveis intracelulares de glutatona entre os grupos (figuras 3 e 4).

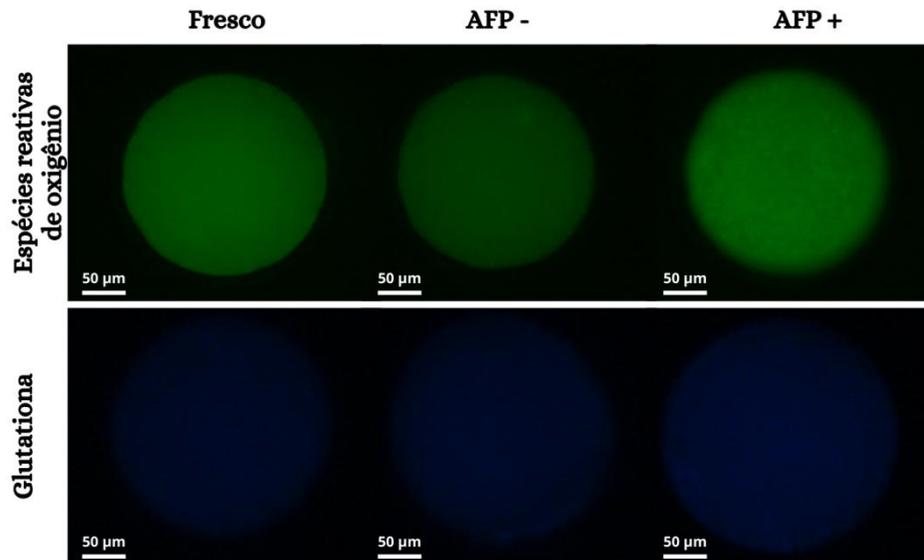


Figura 3: Oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com 2',7'- 932 dichlorodihidrofluorescein diacetate (H2DCFDA, Invitrogen™, D399) e 4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CMF2HC, Cell Tracker Blue, Invitrogen™, C12881) para mensuração de níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutatona (GSH), respectivamente.

*Grupos experimentais: Fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 µg/mL) e AFP+: grupo suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I.

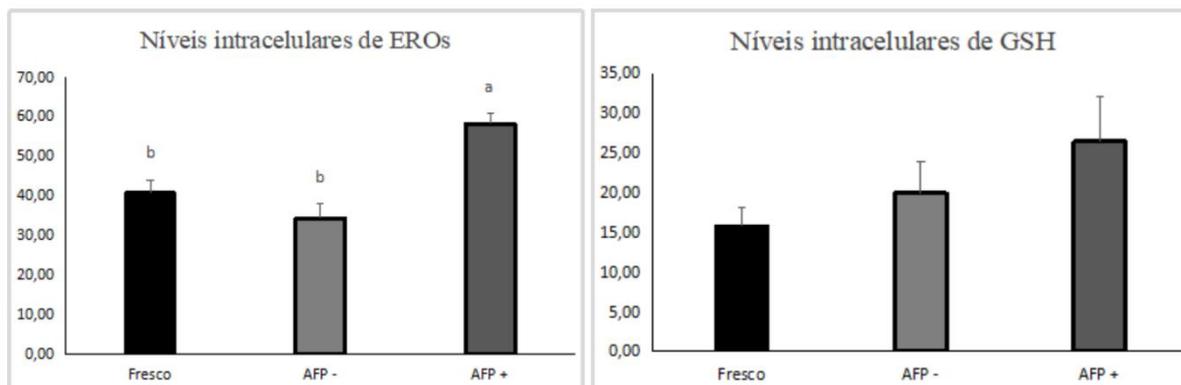


Figura 4: Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutatona (GSH), mensurada pela intensidade de fluorescência/ μm^2 , em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados respectivamente com H2DCFDA, Invitrogen™, D399 e CMF2HC, Cell Tracker Blue, Invitrogen™, C12881.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e AFP+: grupo suplementado com 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AFP I.

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$)

4.3 RAZÃO ENTRE EROs E GSH

Ao realizar a razão entre EROs e GSH baseado nos valores obtidos anteriormente, foi observado que o grupo AFP+ obteve maiores níveis de intensidade ($P < 0,05$) quando comparado aos grupos fresco e AFP-. Já o fresco não apresentou diferença em relação aos outros grupos (figura 5).

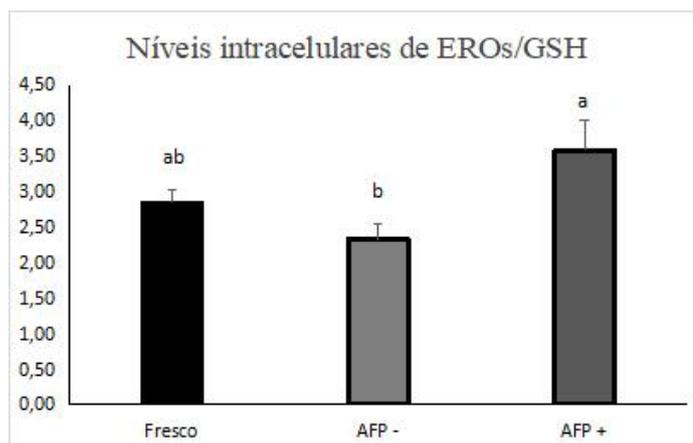


Figura 5: Valores da razão de intensidade de fluorescência entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutatona (GSH) em oócitos de ovinos.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 µg/mL) e AFP+: grupo suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I.

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$)

4.4 INTEGRIDADE DA ACTINA

O grupo fresco apresentou uma quantidade significativamente maior de oócitos que possuíam filamentos de actina íntegros ($P < 0,05$) em comparação aos grupos AFP- e AFP+, que não mostraram diferença estatisticamente significativa entre si (Figura 6 e 7.)

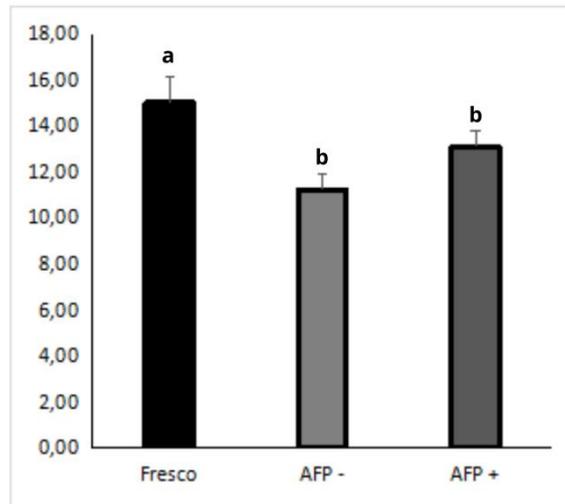


Figura 6: Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na integridade de actina em oócitos ovinos imaturos, frescos e vitrificados, corados com Alexa Fluor 350 Phalloidin.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 µg/mL) e AFP+: grupo suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I.

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (P<0,05)

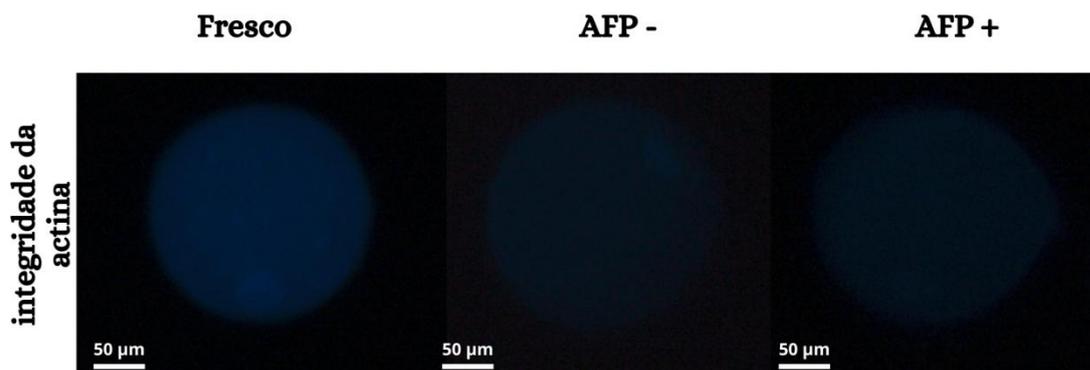


Figura 7: Oócitos imaturos de ovinos, frescos e vitrificados, com ou sem proteína anticongelante tipo I (AFP I), corados com corados com Alexa Fluor 350 Phalloidin para análise de integridade de actina.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 µg/mL) e AFP I: grupo suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I.

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados da análise de expressão gênica estão apresentados na figura 8. Os genes *BMP15*, *MATER* e *ZAR1* apresentaram-se *up-regulated* no grupo AFP- em comparação com o grupo fresco. Comparando os grupos vitrificados, os genes *BMP15* e *ZAR1* estavam *up-regulated* no grupo AFP-. De forma geral, o grupo AFP+ obteve grande similaridade no padrão de expressão gênica em relação ao grupo fresco, exceto com relação ao gene *MATER*, que estava *down-regulated* no grupo fresco e similar entre os grupos vitrificados. Os genes *GDF9*, *HSP70*, *PRDX1*, *SIRT2*, *BCL2* e *BAX*, não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais.

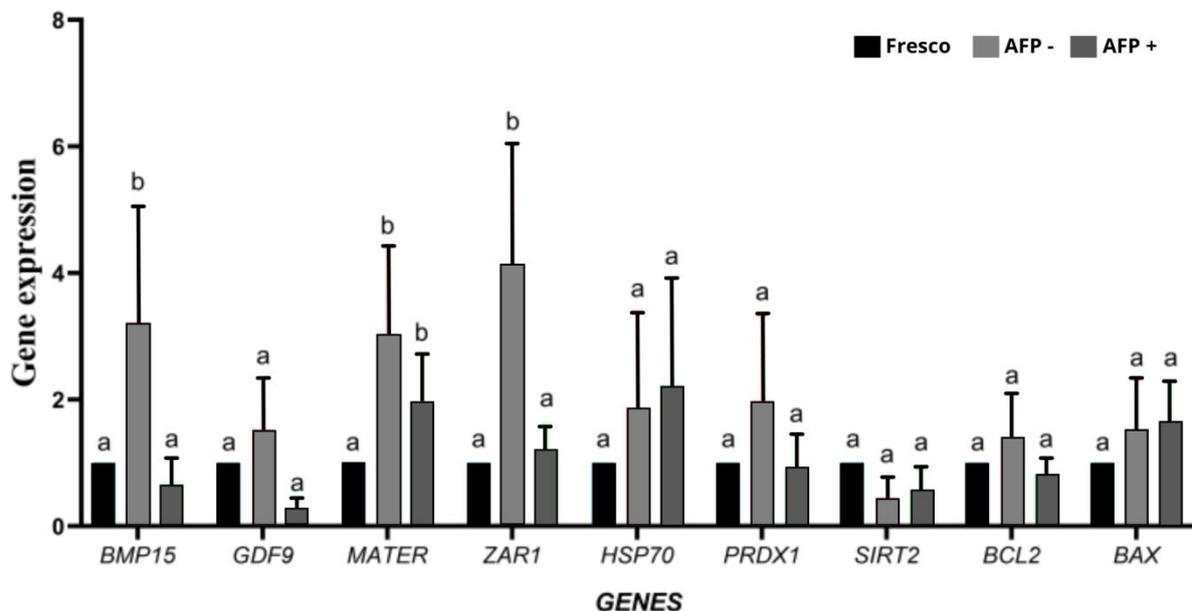


Figura 8: Efeito da proteína anticongelante tipo I (AFP I) na solução de vitrificação na expressão dos genes *BMP15*, *GDF9*, *HSP70*, *GAPDH*, *MATER*, *ZAR1*, *BAX*, *BCL2*, *B-ACT*, *H2AFZ*, *PRDX1* e *SIRT2* de oócitos imaturos vitrificados de ovelhas.

*Grupos experimentais: fresco: controle positivo; AFP-: grupo sem suplementação de AFP I (0,0 µg/mL) e AFP+: grupo suplementado com 0,25 µg/mL de AFP I.

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (P<0,05)

*** *BMP15*: bone morphogenetic protein 15; *GDF9*: growth differentiation factor 9; *MATER*: Maternal antigen that embryo requires; *ZAR1*: zygote arrest 1; *HSP70*: 70 kilodalton heat shock protein; *PRDX1*: peroxiredoxin-1; *SIRT2*: sirtuin 2; *BCL-2*: B-cell lymphoma 2; *BAX*: Bcl-2-associated X protein.

5. DISCUSSÃO

Este estudo investigou, pela primeira vez na espécie ovina, o impacto da adição de 250 ng/mL de AFP I na qualidade de COCs imaturos após a vitrificação. A principal hipótese para a realização desse estudo foi a de que a adição de AFP I teria um efeito crioprotetor sobre os oócitos, promovendo uma melhor preservação de sua qualidade após vitrificação (Wen et al., 2014; Rahman et al., 2019). De forma geral, observou-se que o grupo tratado com AFP (AFP+) manteve um perfil de expressão gênica semelhante ao do grupo fresco, exceto pelo gene *MATER*, que apresentou um aumento significativo em relação a este. Além disso, em comparação ao fresco, o grupo AFP+ demonstrou níveis intracelulares de atividade mitocondrial semelhantes, porém exibiu maiores níveis de EROs e uma quantidade menor de oócitos com filamentos de actina íntegros. O grupo vitrificado sem AFP (AFP-) apresentou um aumento significativo na expressão dos genes relacionados à competência oocitária, como BMP15, *MATER* e ZAR1. No entanto, nas análises metabólicas, esse grupo demonstrou menores níveis de atividade mitocondrial em comparação com grupo fresco e AFP+, EROs semelhantes ao fresco e integridade dos filamentos de actina semelhantes ao AFP+. Além disso, na relação entre EROs e GSH, embora o grupo AFP+ tenha apresentado níveis mais elevados de EROs, o equilíbrio entre a defesa antioxidante e o estresse oxidativo não apresentou diferenças ao observado no grupo fresco.

Conforme mencionado anteriormente, o perfil de expressão gênica no grupo AFP+ apresentou níveis semelhantes aos observados no grupo fresco. Esses resultados sugerem que a adição de AFP I durante a vitrificação exerceu um efeito protetor, contribuindo para a regulação dos genes e mantendo sua capacidade de lidar com o estresse da vitrificação e progredir. Esse efeito já foi evidenciado em estudos com felinos onde a concentração de 1 µg/mL de AFP I foi capaz de preservar a expressão geral dos genes em níveis semelhantes aos observados em COCs frescos (Leal et al., 2024) e camundongos com a AFP III que manteve os níveis semelhantes também ao fresco (Jo et al., 2011), destacando o papel da AFP na preservação da integridade da expressão gênica durante o processo de vitrificação. O gene *MATER*, que desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário e na competência oocitária (Cajas et al., 2020; Tong et al., 2000), apresentou aumento significativo no grupo AFP+, mesmo sob o estresse causado

pela vitrificação. Este aumento sugere que a expressão de *MATER* pode ser mais sensível a processos de criopreservação, mesmo na presença das AFPs, indicando uma possível resposta adaptativa à preservação da qualidade dos oócitos. Estudos mostram que *MATER* contribui significativamente para a foliculogênese e para funções essenciais, como o processamento de RNA, a regulação metabólica e a organização da rede citoplasmática (Tong et al., 2000; Pennetier et al., 2004; Urrego et al., 2015). Oócitos com níveis elevados desse gene tendem a exibir maior competência para o desenvolvimento, refletida em taxas superiores de formação de blastocistos, como observado em bovinos (Urrego et al., 2015). Por outro lado, em oócitos com menor viabilidade, como os envelhecidos, observa-se uma redução na expressão de *MATER* (Lu et al., 2016), reforçando sua importância como marcador de qualidade oocitária. Assim, as alterações na expressão de *MATER*, particularmente em condições de estresse como a vitrificação, parecem estar diretamente ligadas à competência de desenvolvimento, evidenciando sua relevância tanto na preservação quanto na melhora da qualidade dos oócitos.

O grupo AFP- exibiu aumento significativo na expressão dos genes relacionados à competência oocitária *BMP15*, *MATER* e *ZAR1*. O gene *BMP15*, desempenha um papel crucial no desenvolvimento ovariano e na maturação dos folículos primários (Han et al., 2015) e o gene *ZAR1*, está envolvido na regulação da maturação meiótica dos oócitos (Rong et al., 2019). Estudos anteriores demonstraram que oócitos ovinos vitrificados apresentam qualidade inferior em comparação aos oócitos frescos (Hosseini et al., 2015). Essa diferença pode ser explicada, em parte, pelas alterações na expressão de genes relacionadas à resposta ao estresse, como o *HSP70*, cuja superexpressão durante o processo de vitrificação e aquecimento está associada à degeneração citoplasmática e à redução da viabilidade dos oócitos (Kasman et al., 2020). Dessa forma, no grupo vitrificado sem a proteção da AFP seria esperado um perfil de expressão gênica predominantemente alinhado à resposta ao estresse, em vez de uma elevação na expressão de genes associados à competência oocitária, que são fundamentais para a qualidade e o potencial de desenvolvimento dos oócitos (Adeniyi et al., 2023). Dessa maneira, acredita-se que a superexpressão dos genes de competência oocitária, observada no grupo AFP-, não é necessariamente benéfica, já que o excesso de proteínas ou moléculas específicas na célula, por exemplo, pode desencadear interações indesejadas, comprometendo sua viabilidade (Prelich, 2012).

Assim, essa superexpressão pode desestabilizar as funções celulares, gerando estresse e prejudicando processos essenciais, como o equilíbrio metabólico e a integridade estrutural da célula (Sopko et al., 2006). Já foi relatado que a superexpressão de *BMP15* em oócitos de camundongos durante a foliculogênese acelera o crescimento dos folículos e reduz a reserva ovariana de forma precoce, o que pode comprometer a natureza poliovulatória desses animais e prejudicar sua função ovariana ao envelhecerem (Mcmahon et al., 2008). Além disso, estudos realizados também com camundongos indicam que a superexpressão do gene *ZAR1* pode ser prejudicial para o oócito, pois, o excesso dessa proteína desestabiliza o controle da maturação, aumentando o estresse celular e comprometendo sua qualidade. Esse desequilíbrio também pode reduzir a viabilidade do oócito, afetando seu desenvolvimento, seu potencial de fertilização e, possivelmente, provocando paradas no desenvolvimento embrionário em estágios iniciais (Sopko et al., 2006; Hu et al., 2010). Ao se observar os grupos vitrificados, AFP- e AFP+, não foram evidenciadas diferenças significativas para a maioria dos genes analisados, exceto para *BMP15* e *ZAR1*, nos quais o grupo AFP- apresentou uma expressão aumentada em comparação ao grupo AFP+. Isso reforça que, a superexpressão de genes no grupo AFP- não resulta em bons resultados, sugerindo que o aumento na expressão desses genes pode representar uma resposta compensatória ao estresse induzido pela criopreservação, especialmente em ausência da proteção adicional oferecida pela AFP I.

A maturação oocitária é um processo metabolicamente exigente, que demanda altas quantidades de ATP, e para que os oócitos completem esse processo com sucesso, é essencial a presença de um número adequado de mitocôndrias funcionais, que garantam a produção energética necessária (Kirillova et al., 2021). A integridade e a atividade mitocondrial, portanto, são parâmetros indicativos da viabilidade dos oócitos e de sua competência para continuar o desenvolvimento (Belli et al., 2021). Portanto, a baixa intensidade mitocondrial observada no grupo AFP- sugere um metabolismo mitocondrial deficiente, o que pode prejudicar a progressão meiótica dos oócitos e reduzir sua capacidade de maturação. O aumento da atividade mitocondrial também pode indicar que as células estão respondendo a danos celulares, como observado no estudo de Seli, Wang e Horvath (2019). Situações de estresse, como aquelas induzidas pelo processo de criopreservação, podem levar a um aumento na demanda energética,

fazendo com que as mitocôndrias intensifiquem sua atividade (Tiwari, Belenghi e Levine, 2002). Esse aumento, embora positivo em termos de produção de energia, também pode estar diretamente associado ao aumento de EROs, uma vez que a célula possivelmente busca compensá-lo por meio da intensificação do metabolismo mitocondrial (Wu, Wu e Wei, 2014). Esse mecanismo de compensação pode ser uma forma da célula se adaptar para manter a energia necessária em condições difíceis. No entanto, o aumento constante de EROs pode sobrecarregar as defesas antioxidantes da célula. Se esse equilíbrio for rompido, a célula pode sofrer danos oxidativos, afetando seu DNA, proteínas e lipídios, o que acabaria prejudicando sua função e comprometendo a qualidade e viabilidade do oócito (Hamdan et al., 2016; Cogley, 2020; Hardy et al., 2021). Dessa maneira, o excesso de EROs pode causar estresse oxidativo e danos às estruturas celulares (Tatone et al., 2010), incluindo as próprias mitocôndrias, resultando em alterações em sua função e potencialmente comprometendo a viabilidade oocitária a longo prazo. Embora o aumento da atividade mitocondrial nos grupos fresco e AFP+ possa inicialmente sugerir uma maior capacidade de geração de energia, ele também aponta para possíveis danos celulares e um aumento no estresse oxidativo. Esses fatores podem afetar significativamente a qualidade dos oócitos, comprometendo sua integridade e viabilidade.

O resultado de atividade mitocondrial indica que o grupo AFP+ apresentou níveis mais elevados de atividade mitocondrial em comparação ao AFP-, com valores semelhantes ao grupo fresco. Além disso, o grupo fresco apresentou a maior proporção de oócitos íntegros em comparação aos grupos AFP+ e AFP-. Resultados similares já foram relatados com COCs de felinos, onde a concentração de 0,5 µg/mL mostrou resultados semelhantes entre o controle fresco e o grupo tratado com AFP I, além de menor integridade dos filamentos de actina nos grupos não tratados (Leal et al., 2024). O grupo AFP+ também apresentou níveis mais elevados de EROs em relação aos grupos fresco e AFP-. Esse padrão de aumentos no AFP+ contém uma relação, visto que o aumento de EROs pode estar associado a uma maior atividade mitocondrial, e que esse aumento das EROs danifica os filamentos de actina. Essas observações levantam algumas hipóteses: (i) o tratamento com AFP I pode não ter gerado os resultados esperados, sugerindo que a concentração de 250 ng/mL elevou a produção de energia no oócito devido ao estresse induzido pela vitrificação, o que resultou em um aumento nos níveis de EROs (Turrens et al.,

2003) e no comprometimento do metabolismo oxidativo celular; e (ii) o aumento de EROs no grupo (AFP+) pode também ter ocorrido como uma resposta compensatória (Xie et al., 2011). Os EROs podem aumentar como uma forma de compensação nos oócitos, especialmente em situações de estresse ou envelhecimento, e esse aumento pode ser benéfico e protetor, desde que haja um equilíbrio entre a produção de EROs e a ação dos antioxidantes (Boudoures e Moley, 2015; Mihalas et al., 2017; Cao et al., 2022). Embora não tenha sido possível observar diferenças significativamente estatísticas nos níveis de GSH, outros antioxidantes podem ser testados em combinação com a AFP para reduzir o estresse oxidativo. Estudos com antioxidantes como astaxantina (suínos), acetil-L-carnitina, N-acetil-L-cisteína, ácido α -lipoico (camundongos), melatonina e resveratrol (camundongos) demonstraram efeitos benéficos após a vitrificação de oócitos, incluindo aumento das taxas de sobrevivência e desenvolvimento, além da redução dos níveis de EROs (Aghaz et al., 2020; Truong e Gardner, 2020; Xiang et al., 2021).

Há diversos estudos que indicam as vantagens da AFP na integridade do citoesqueleto e na diminuição de EROs. Lee et al. (2015) e Wen et al. (2014) que indicam que a AFP III, além de melhorar a qualidade dos oócitos murinos e favorecer o desenvolvimento embrionário, reduz a produção de EROs e contribui positivamente para a preservação da estrutura e função dos oócitos durante a vitrificação, mantendo a integridade dos microtúbulos, filamentos de actina e da estrutura cromossômica. Porém, como se pode observar, os resultados indicam que ambos os resultados não foram satisfatórios no grupo AFP+ nas análises metabólicas, isso pode ser explicado pelo impacto da criopreservação, que afeta a viabilidade celular e as funções mitocondriais devido ao estresse térmico e formação de cristais de gelo (Cao et al., 2022; Comizzoli, 2023). Outra possibilidade é o aumento EROs, que compromete o equilíbrio redox e a integridade celular (Hardy, Day e Morris, 2021). A combinação desses fatores pode ter influenciado os resultados, além do fato que os oócitos são altamente sensíveis ao processo de criopreservação devido à sua estrutura delicada, especialmente em oócitos ovinos, que apresentam uma grande vulnerabilidade à oxidação (Bogliolo et al., 2007). Como já demonstrado, diversos estudos apontam que as AFPs promovem efeitos benéficos, portanto, para que se possa saber o efeito da AFP I em oócitos ovinos com mais clareza, mais estudos devem ser realizados, pois, apesar de ser possível

observar algum efeito nas análises de expressão gênica no presente estudo, não é possível afirmar que a AFP I auxilia otimizando o processo vitrificação, sendo necessário explorar mais variáveis para compreender plenamente os mecanismos de ação e seus impactos na qualidade oócitaria. Além disso, é necessário um número maior de COCs para obter uma análise estatística mais robusta, bem como realizar análises adicionais, como maturação *in vitro*, a fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário para uma melhor compreensão dos resultados. Ademais, é fundamental avaliar o impacto de diferentes concentrações de AFP I para determinar a dosagem mais eficaz e seus efeitos na qualidade oocitária.

Ainda não existem dados sobre oócitos ovinos suplementados com AFPs na literatura, nem um consenso sobre a concentração ideal de AFP a ser utilizada para a criopreservação de oócitos nas demais espécies. De forma geral, a AFP I tem demonstrado resultados favoráveis na criopreservação de sêmen e embriões (Correia et al., 2021). Estudos com AFP I em oócitos felinos mostraram que a concentração de 1 µg/mL produziu os melhores resultados mantendo a integridade dos oócitos, melhorando os aspectos morfológicos, estruturais e moleculares (Leal et al., 2024). Já em oócitos de camundongos suplementados com AFP III, as concentrações de 500 ng/mL (Jo et al., 2011) e 0,1 mg/mL (Lee et al., 2015) mostraram-se eficazes, promovendo maior taxa de sobrevivência, clivagem e blastocisto. De modo geral, a maioria dos estudos apresentados na literatura são recentes, visando descobrir a concentração ideal de AFP para cada espécie. Como mencionado acima, não há dados acerca da criopreservação de ovinos com nenhum tipo de AFP ou AFGP, portanto, foi adotada uma concentração aproximada com base em estudos realizados com oócitos bovinos (Correia et al., 2021), nos quais a concentração de 1 mM de AFGP8 (aproximadamente 2,6 µg/mL) proporcionou maiores taxas de sobrevivência e clivagem quando comparado ao grupo controle não tratado (Liang et al., 2020). Além disso, concentrações de 500 ng/mL e 1000 ng/mL de AFP III também foram avaliadas, com resultados indicando melhorias no desenvolvimento embrionário até o quinto dia de cultura, apesar dos efeitos benéficos não se manterem até a formação do blastocisto (Chaves et al., 2016). Até o presente momento, ainda há muitas lacunas acerca do uso de AFPs na criopreservação de oócitos, especialmente sobre a concentração ideal e o tipo mais adequado. Estudos futuros devem explorar diferentes concentrações, considerando

as particularidades dos oócitos ovinos, para aprimorar sua aplicação na preservação da qualidade oocitária e nas biotecnologias reprodutivas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

No contexto experimental analisado, a AFP I apresentou efeitos benéficos em aspectos moleculares, conforme demonstrado pelos padrões de expressão gênica, e em parâmetros metabólicos, como a atividade mitocondrial e o equilíbrio entre EROs e GSH reduzida. Contudo, os resultados referentes à integridade dos filamentos de actina não foram satisfatórios, limitando a possibilidade de conclusões abrangentes sobre o impacto global da AFP I. Os resultados obtidos indicam a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes, testar outras concentrações da AFP I e confirmar sua eficácia em diferentes contextos biológicos.

6.2 PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo contribuem significativamente para entendermos os efeitos moleculares, metabólicos e estruturais da AFP I, destacando seu potencial como ferramenta biotecnológica em contextos específicos. No entanto, as limitações encontradas, como o baixo número amostral, mostram a importância de novas pesquisas para aprofundar o conhecimento sobre o tema. Estudos futuros investigando o impacto da AFP I em diferentes concentrações e com um maior número de COCs durante a vitrificação de oócitos poderão ser realizados, bem como, análises de maturação *in vitro*, viabilidade oocitária e aspectos morfológicos poderão trazer novas perspectivas acerca do efeito da AFP I em oócitos ovinos.

7. REFERÊNCIAS

ADENIYI, T. et al. O-159 Impact of open and closed methods of vitrification on oocyte mitochondria function and RNAseq transcriptome profile: a preclinical screening study. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 38, n. Supplement_1, 2023.

AGHAZ, F. et al. Enhanced cryoprotective effect of Melatonin and Resveratrol by coencapsulation: Improved *in vitro* development of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes. *Biopreservation and biobanking*, v. 19, n. 3, p. 184–193, 2021.

ALBERTINI, D. F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research*, v. 296, p. 68, 1992.

ALBERTS B. et al. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1044-1045.

AMIDI, F.; KHODABANDEH, Z.; NORI MOGAHI, MH Comparação dos efeitos da vitrificação na expressão gênica de oócitos maduros de camundongos usando Cryotop e Open Pulled Straw. *International journal of fertility & sterility* , v. 12, n. 1, p. 61–67, 2018.

AMINI, M.; BENSON, J. D. Technologies for vitrification based cryopreservation. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 5, p. 508, 2023.

ARAV, A.; SARAGUSTY, J. Preservation of Gametes and Embryos. In: *Animal Biotechnology: Reproductive Biotechnologies*. [s.l: s.n.]. p. 235–267, 2018.

ARCARONS, N. et al. Cryoprotectant role of exopolysaccharide of *Pseudomonas* sp. ID1 in the vitrification of IVM cow oocytes. *Reproduction, fertility, and development*, v. 31, n. 9, p. 1507–1519, 2019.

ARRIS, C. et al. Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. *J Med Chem*, v.43, p.2797-2804, 2000

BALDASSARRE, H. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production and transfer in assisted breeding programs for ruminants. *Animals: an open access journal from MDPI*, v. 11, n. 1, p. 216, 2021.

- BARROSO, P. A. A. et al. Effects of dexamethasone on growth, viability and ultrastructure of bovine secondary follicles cultured *in vitro*. *Zygote* (Cambridge, England), v. 28, n. 6, p. 504–510, 2020.
- BELLI, M. et al. Ultrastructure of mitochondria of human oocytes in different clinical conditions during assisted reproduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 703, n. 108854, p. 108854, 2021.
- BOGLIOLO, L. et al. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, v. 68, n. 8, p. 1138–1149, 2007.
- BOGLIOLO, L. et al. Evaluation of the impact of vitrification on the actin cytoskeleton of *in vitro* matured ovine oocytes by means of Raman microspectroscopy. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 32, p. 185–193, 2015.
- BOUDOURES, A. L.; MOLEY, K. H. Insights into mechanisms causing the maternal age-induced decrease in oocyte quality. Em: *Biennial Review of Infertility*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 43–55.
- BRASIL. Decreto legislativo n.º2, de 03 de fevereiro de 1994. Aprova o texto da Convenção sobre Diversidade Biológica, assinada durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada na Cidade do Rio de Janeiro, no período de 5 a 14 de junho de 1992. *Diário do Congresso Nacional*. Brasília, Seção 1 - 27/9/1993, Página 6224.
- CAO, B. et al. Oxidative stress and oocyte cryopreservation: Recent advances in mitigation strategies involving antioxidants. *Cells* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 22, p. 3573, 2022.
- CAJAS, Y. N. et al. Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 15, p. 5340, 2020.
- CAMARGO, L. S. A. et al. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod*, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.
- CHANG, C.-C.; SHAPIRO, D. B.; NAGY, Z. P. The effects of vitrification on oocyte quality. *Biology of reproduction*, v. 106, n. 2, p. 316–327, 2022.
- CHEN, C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, v. 327, n. 8486, p. 884–886, 1986.

CHEN, H. et al. Advantages of vitrification preservation in assisted reproduction and potential influences on imprinted genes. *Clinical epigenetics*, v. 14, n. 1, 2022.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. Antifreeze proteins from diverse organisms and their applications: An overview. *Current protein & peptide science*, v. 18, n. 3, p. 262–283, 2017.

CHIARATTI, M. R. et al. Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. *Animal Reproduction*, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2018.

COBLEY, J. N. Mechanisms of mitochondrial ROS production in assisted reproduction: The known, the unknown, and the intriguing. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 10, p. 933, 2020.

COOK, J. International Wool Textile Organisation. Disponível em: <<https://iwto.org/>>. Acesso em: 2 set. 2023.

COMBELLES, C. M. H. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in invitro matured human oocytes. *Human Reproduction*, v. 17, n. 4, p. 1006–1016, 2002.

COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive BioMedicine Online*, v. 18, n. 6, p. 864–880, 2009.

COMIZZOLI, P. Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction*, v. 14, n. 1, p. 30–33, 2017.

COMIZZOLI, P. O-173 Cellular and developmental damage from oocyte cryopreservation. *Human reproduction (Oxford, England)*, v. 38, n. Supplement_1, 2023.

CORREIA, L. F. L. et al. Effect of antifreeze protein I in the freezing solution on in vivo-derived sheep embryos. *Research in veterinary science*, v. 168, n. 105132, p. 105132, 2024.

CORREIA, L. F. L. et al. Antifreeze proteins for low-temperature preservation in reproductive medicine: A systematic review over the last three decades. *Theriogenology*, v. 176, p. 94–103, 2021.

COTICCHIO, G. et al. Truths and myths of oocyte sensitivity to controlled rate freezing. *Reproductive biomedicine online*, v. 15, n. 1, p. 24–30, 2007.

DEVRIES, A. L. Glycoproteins as biological antifreeze agents in antarctic fishes. *Science (New York, N.Y.)*, v. 172, n. 3988, p. 1152–1155, 1971.

DOS SANTOS-NETO, P. C. et al. Cumulus cells during *in vitro* fertilization and oocyte vitrification in sheep: Remove, maintain or add? *Cryobiology*, v. 92, n. December 2019, p. 161–167, 2020.

DUJÍČKOVÁ, L. et al. Methodological approaches for vitrification of bovine oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, v. 29, n. 1, p. 1–11, 2021.

EBRAHIMI, B. et al. Ultrastructural changes of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. *Zygote (Cambridge, England)*, v. 20, n. 2, p. 103–115, 2012.

EKPO, MD et al. Proteínas anticongelantes: Novas aplicações e navegação em direção à sua aplicação clínica em criobancamento. *Revista internacional de ciências moleculares*, v. 23, n. 5, p. 2639, 2022.

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.

EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reproduction, fertility, and development*, v. 8, n. 4, p. 485, 1996.

EVANS, C. G.; CHANG, L.; GESTWICKI, J. E. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of medicinal chemistry*, v. 53, n. 12, p. 4585–4602, 2010.

FAIR, T. et al. Immunolocalization of nucleolar proteins during bovine oocyte growth, meiotic maturation and fertilization. *Biol Reprod*, v.64, p.1516-1525, 2001.

FALCHI, L.; LEDDA, S.; ZEDDA, M. T. Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]*, v. 57, n. S5, p. 22–33, 2022.

FANG, X. et al. SIRT2 is critical for sheep oocyte maturation through regulating function of surrounding granulosa cells. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 9, p. 5013, 2022.

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.

FISSORE, R. et al. Potential Role of MitogenActivated Protein Kinase during Meiosis Resumption in Bovine Oocytes'. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, v. 55, p. 1261–1270, 1996.

FLORES, A. et al. Mechanisms of antifreeze proteins investigated via the site-directed spin labeling technique. *European biophysics journal: EBJ*, v. 47, n. 6, p. 611–630, 2018.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive biomedicine online*, v. 9, n. 6, p. 680–691, 2004.

GARCÍA-MARTÍNEZ, T. et al. Glutathione ethyl ester protects in vitro-maturing bovine oocytes against oxidative stress induced by subsequent vitrification/warming. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 20, p. 7547, 2020.

GINSBURG, M.; SNOW, M. H. L.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, v. 110, p. 521–528, 1990.

GHOSH, H. S.; REIZIS, B.; ROBBINS, P. D. SIRT1 associates with eIF2-alpha and regulates the cellular stress response. *Scientific reports*, v. 1, n. 1, p. 150, 2011.

HABIBI, A. et al. The effects of vitrification on gene expression in mature mouse oocytes by nested quantitative PCR. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 27, n. 11, p. 599–604, 2010.

HAMDAN, M. et al. The sensitivity of the DNA damage checkpoint prevents oocyte maturation in endometriosis. *Scientific reports*, v. 6, p. 36994, 2016.

HAMMOND, C. L.; LEE, T. K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. *Journal of hepatology*, v. 34, n. 6, p. 946–954, 2001.

HAN, H. et al. Association between BMP15 gene polymorphism and reproduction traits and its tissues expression characteristics in chicken. *PloS one*, v. 10, n. 11, p. e0143298, 2015.

HARDY, M. L. M.; DAY, M. L.; MORRIS, M. B. Redox regulation and oxidative stress in mammalian oocytes and embryos developed in vivo and *in vitro*. *International journal of environmental research and public health*, v. 18, n. 21, p. 11374, 2021.

HASTIE, L. E. et al. Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model. *Free radical biology & medicine*, v. 22, n. 6, p. 955–966, 1997.

HOSSEINI, S. M. et al. Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and *in vitro* aging. *Theriogenology*, v. 77, n. 9, p. 1741–1753, 2012.

HOSSEINI, S. M. et al. Developmental competence of ovine oocytes after vitrification: differential effects of vitrification steps, embryo production methods, and parental origin of pronuclei. *Theriogenology*, v. 83, n. 3, p. 366–376, 2015.

HU, J. et al. Mouse ZAR1-like (XM_359149) colocalizes with mRNA processing components and its dominant-negative mutant caused two-cell-stage embryonic arrest. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 239, n. 2, p. 407–424, 2010.

HYTTEL, P. et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*, v.122, p.21-30, 2001.

JANG, H. et al. Effects of Leucosporidium-derived ice-binding protein (LeIBP) on bull semen cryopreservation. *Veterinary medicine and science*, v. 6, n. 3, p. 447–453, 2020.

JAMNONGJIT, M.; HAMMES, S. R. Oocyte maturation: The coming of age of a germ cell. *Seminars in reproductive medicine*, v. 23, n. 03, p. 234–241, 2005.

JO, J. et al. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence. *Fertility and sterility*. 2011; 96(5):1239-45.

IUSSIG B. et al., A brief history of oocyte cryopreservation: arguments and facts. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2019; 98(5), 550-558.

KASAPI, E. et al. Vitrification of human germinal vesicle oocytes: Before or after *in vitro* maturation? *International journal of fertility & sterility*, v. 11, n. 2, p. 85–92, 2017.

KASMAN, A. A. M. N. et al. Comparisons of morphology and HSP70 expression between fresh oocytes and vitrified oocytes post warming. *Proceedings of the 2020 10th International Conference on Biomedical Engineering and Technology*. Anais...New York, NY, USA: ACM, 2020.

KIM, H. J. et al. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine Drugs*, v. 15, n. 2, 2017a.

KIM, S. et al. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, v. 1, n. 1, p. 58, 2003.

KIM, S. H. et al. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. ***Yonsei medical journal***, v. 47, n. 3, p. 399–404, 2006.

KIRILLOVA, A. et al. The role of mitochondria in oocyte maturation. *Cells (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 9, p. 2484, 2021.

KOMETAS, M. et al. Methods of ovarian tissue cryopreservation: Is vitrification superior to slow freezing?—ovarian tissue freezing methods. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, v. 28, n. 12, p. 3291–3302, 2021.

KRISHER, R.; BAVISTER, B. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, v.49, p.103-114, 1998.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 11, n. 3, p. 300–308, 2005.

LANE, M. et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, v. 72, n. 6, p. 1073–1078, 1999.

LEAL, G. R. et al. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 199, p. 1–14, 2018.

LEAL, G. R. et al. Lipid modulation during IVM increases the metabolism and improves the cryosurvival of cat oocytes. *Theriogenology*, v. 214, p. 33–42, 2024.

LEAL, G. R. et al. Antifreeze protein type I in the vitrification solution improves the cryopreservation of immature cat oocytes. *Theriogenology*, v. 229, p. 108–117, 2024.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 303–326, 2002.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Molecular reproduction and development*, v. 69, n. 3, p. 243–251, 2004.

LINS, T. L. B. G. et al. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology*, v. 89, p. 263–270, 2017.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; ROBERTS, T.; HIRSHBERG, K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.16, p.557-589, 2000.

LIU, J.; PHY, J.; YEOMANS, E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology*, v. 78, n. 8, p. 1641–1652, 2012.

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

LU, Y.-Q.; HE, X.-C.; ZHENG, P. Decrease in expression of maternal effect gene *Materis* associated with maternal ageing in mice. *Molecular human reproduction*, v. 22, n. 4, p. 252–260, 2016.

LUCENA, C. C. DE et al. Pesquisa da Pecuária Municipal 2018: análise dos rebanhos caprinos e ovinos. *Embrapa*, n. 9, p. 17, 2019.

LUCIANO, A. M. et al. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*, v. 59, p. 90-95, 2009.

LUVONI, G. C. Cryosurvival of ex situ and in situ feline oocytes. *Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]*, v. 47, n. s6, p. 266–268, 2012.

MAJEED, A. et al. Effect of collection methods on oocyte recovery rate in sheep. *Research Journal of Biotechnology*, 14, p. 262–264, 2019.

MARIANTI, A. S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011.

MCCMAHON, H. E. et al. Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology*, v. 149, n. 6, p. 2807–2815, 2008.

MIHALAS, B. P. et al. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to oxidative stress-mediated deterioration of the ageing oocyte. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 6247, 2017.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 12, p. 10314–10331, 2017.

MOAWAD, A. R. et al. Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 6, n. sup1, p. S41–S48, 2018.

MOAWAD, A. R.; TAN, S. L.; TAKETO, T. Beneficial effects of glutathione supplementation during vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage on their preimplantation development following maturation and fertilization *in vitro*. *Cryobiology*, v. 76, p. 98–103, 2017.

MORITA, Y. et al. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte

apoptosis *in vitro*. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), v. 13, n. 6, p. 841–850, 1999.

MÜLLERS, Y. et al. Quantitative analysis of F-actin alterations in adherent human mesenchymal stem cells: Influence of slow-freezing and vitrification-based cryopreservation. *PloS one*, v. 14, n. 1, p. e0211382, 2019.

NAIK, B. R. et al. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Animal Reproduction Science*, v. 86, n. 3–4, p. 329–338, 2005.

NAVARRO-COSTA, P. et al. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Human Reproduction*, v.25, n.10, p. 2647-54, 2010.

PALMERINI, M. G. et al. Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification. *The Journal of reproduction and development*, v. 60, n. 6, p. 411–420, 2014.

PAYNE, S. R.; OLIVER, J. E.; UPRETI, G. C. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 31, n. 2, p. 180–184, 1994.

PEGG, D. E. *Principles of Cryopreservation. Em: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press. p. 39–57, 2007.

PENNETIER, S. et al. MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine. *BMC developmental biology*, v. 6, n. 1, 2006.

PENNETIER, S. et al. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. *Biology of reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1359–1366, 2004.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*, v. 9, n. 4, p. 267–277, 2008.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: The primordial follicle. *Theriogenology*, v. 55, n. 6, p. 1193–1210, 2001.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v. 32, n. 2, p. 365–385, 2016.

PORRAS-GÓMEZ, T. J.; MORENO-MENDOZA, N. Neo-oogenesis in mammals. *Zygote*, v. 25, p. 404–422, 2017.

PRELICH, G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, v. 190, n. 3, p. 841–854, 2012.

QUAN, G. B. et al. Meiotic maturation and developmental capability of ovine oocytes at germinal vesicle stage following vitrification using different cryodevices. *Cryobiology*, v. 72, n. 1, p. 33–40, 2016.

QUAN, G.; WU, G.; HONG, Q. Oocyte cryopreservation based in sheep: The current status and future perspective. *Biopreservation and biobanking*, v. 15, n. 6, p. 535–547, 2017.

RAHMAN, A. et al. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 6:268, 2019

RAJAN, R.; MATSUMURA, K. Development and Application of Cryoprotectants. Em: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Singapore: Springer Singapore, p. 339–354. 2018.

RAJU, R. et al. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, v. 1865, n. 1, p. 129749, 2021.

RAMOS LEAL, G. et al. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 199, p. 1–14, 2018.

ROBLES, V.; G. VALCARCE, D.; F. RIESCO, M. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos. *Biomolecules*, v. 9, n. 5, p. 181, 2019.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.204-208, abr./jun. 2019

RONG, Y. et al. ZAR1 and ZAR2 are required for oocyte meiotic maturation by regulating the maternal transcriptome and mRNA translational activation. *Nucleic acids research*, v. 47, n. 21, p. 11387–11402, 2019.

SANTOS, R. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 2010; 122(3-4):151-63.

SCHEFFLER, K. et al. The prophase oocyte nucleus is a homeostatic G-actin buffer. *Journal of cell science*, v. 135, n. 6, 2022.

SELI, E.; WANG, T.; HORVATH, T. L. Mitochondrial unfolded protein response: a stress response with implications for fertility and reproductive aging. *Fertility and sterility*, v. 111, n. 2, p. 197–204, 2019.

SENA, P. et al. Human MATER localization in specific cell domains of oocytes and follicular cells. *Reproductive biomedicine online*, v. 18, n. 2, p. 226–234, 2009.

SHIOTA, M. et al. Ets regulates peroxiredoxin1 and 5 expressions through their interaction with the high-mobility group protein B1. *Cancer science*, v. 99, n. 10, p. 1950–1959, 2008.

SHIRAZI, A. et al. The effect of ovine oocyte vitrification on expression of subset of genes involved in epigenetic modifications during oocyte maturation and early embryo development. *Theriogenology*, v. 86, n. 9, p. 2136–2146, 2016.

SILVEIRA, L. R. et al.. Regulação metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 14, n. 1, p. 57–63, jan. 2008.

SMITH, G. D. et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertility and sterility*, v. 94, n. 6, p. 2088–2095, 2010.

SOPKO, R. et al. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene Overexpression. *Molecular cell*, v. 21, n. 3, p. 319–330, 2006.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biol Reprod*, v.64, p.904-909, 2001.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, v. 26, n. 8, p. 563–567, 2010.

TIWARI, B. S.; BELENGHI, B.; LEVINE, A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant physiology*, v. 128, n. 4, p. 1271–1281, 2002.

TONG, Z. B. et al. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature genetics*, v. 26, n. 3, p. 267–268, 2000.

TONG, Z.-B. et al. Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. *Endocrinology*, v. 145, n. 3, p. 1427–1434, 2004.

TRUONG T. T; GARDNER D. K. Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human Reproduction*, p. 12–23, 2020.

TSAI, S. et al. Use of an adenosine triphosphate assay, and simultaneous staining with fluorescein diacetate and propidium iodide, to evaluate the effects of cryoprotectants on hard coral (*Echinopora* spp.) oocytes. *Theriogenology*, v. 73, p. 605–611, 2010.

URREGO, R. et al. Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. *Theriogenology*, v. 83, n. 7, p. 1179–1187, 2015.

UZBEKOVA, S. et al. Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, v. 4, n. 1, 2006.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 51, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G; RIENZI L; UBALDI F. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 30(4):325- 33.

VENDRELL-FLOTATS, M. et al. Effect of heat stress during *in vitro* maturation on developmental competence of vitrified bovine oocytes. *Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]*, v. 52 Suppl 4, p. 48–51, 2017.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*, v. 4, n. 12, p. 1–9, 2008.

VICHERA, G.; OLIVERA, R.; SALAMONE, D. 63 oocyte genome cloning used in transgenic bovine embryo production. *Reproduction, fertility, and development*, v. 23, n. 1, p. 137, 2011.

VINCENT, C. et al. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology*, v. 27, n. 1, p. 9–23, 1990.

WEN, Y. et al. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. *Cryobiology*. 2014; 69(3), 394-401

WESSEL, G. The biology of cortical granules. *Int Rev Cytol.*, v.209, p.117-206, 2001.

WHALEY, D. et al. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell transplantation*, v. 30, p. 096368972199961, 2021.

WOOD, T. C.; WILDT, D. E. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *Reproduction*, v. 110, n. 2, p. 355–360, 1997.

WU, X. et al. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature genetics*, v. 33, n. 2, p. 187–191, 2003.

WU, Y.-T.; WU, S.-B.; WEI, Y.-H. Metabolic reprogramming of human cells in response to oxidative stress: implications in the pathophysiology and therapy of mitochondrial diseases. *Current pharmaceutical design*, v. 20, n. 35, p. 5510–5526, 2014.

XIANG, D.-C. et al. Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the *in vitro* maturation and vitrification of porcine oocytes. *Theriogenology*, v. 167, p. 13–23, 2021.

XIANG, H. et al. The properties, biotechnologies, and applications of antifreeze proteins. *International journal of biological macromolecules*, v. 153, p. 661–675, 2020.

XIE, Y. et al. Interpreting the stress response of early mammalian embryos and their stem cells. *International review of cell and molecular biology*, v. 287, p. 43–95, 2011.

XU, D. et al. SIRT2 inhibition results in meiotic arrest, mitochondrial dysfunction, and disturbance of redox homeostasis during bovine oocyte maturation. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 6, p. 1365, 2019.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. *Reproductive medicine and biology*, v. 10, n. 2, p. 69–79, 2011.

YEH, Y.; FEENEY, R. E. Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function. *Chemical Reviews*, v. 96, n. 2, 1996.

ZHANG, D.-X. et al. Regulation of maternal gene expression by MEK/MAPK and MPF signaling in porcine oocytes during *in vitro* meiotic maturation. *The Journal of reproduction and development*, v. 57, n. 1, p. 49–56, 2011

ZHANG, J. et al. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. **Animal reproduction science**, v. 110, n. 1–2, p. 46–55, 2009.

ZHU, J. et al. Advances *in vitro* production of sheep embryos. International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 6, n. December 2017, p. S15–S26, 2018.