



**BARBARA AZEVEDO PEREIRA**

**CRIOTOLERÂNCIA DE OÓCITOS SUÍNOS MATURADOS *IN*  
*VITRO* NA PRESENÇA DE IGF-I E VITRIFICADOS COM  
GLUTATIONA REDUZIDA**

**LAVRAS-MG  
2018**

**BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA**

**CRIOTOLERÂNCIA DE OÓCITOS SUÍNOS MATURADOS *IN VITRO* NA  
PRESENÇA DE IGF-I E VITRIFICADOS COM GLUTATIONA REDUZIDA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, área de concentração em  
Nutrição e Produção de não ruminantes, para a obtenção  
do título de Doutor.

Prof. Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

Prof. Dr. Joan Enrique Rodriguez-Gil  
Prof. Dr. Marc Yeste Oliveiras  
Coorientadores

**LAVRAS-MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Barbara Azevedo.

Criotolerância de oócitos suínos maturados *in vitro* na presença  
de IGF-I e vitrificados com glutatona reduzida / Barbara Azevedo  
Pereira. - 2018.

96 p.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangeronimo.

Coorientador(a): Marc Yeste, Joan Enric Rodriquez-Gil.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fator de crescimento. 2. Antioxidante. 3. Crio-resistência. I.  
Zangeronimo, Márcio Gilberto. II. Yeste, Marc. III. Rodriquez-Gil,  
Joan Enric. IV. Título.

**BÁRBARA AZEVEDO PEREIRA**

**CRIOTOLERÂNCIA DE OÓCITOS SUÍNOS MATURADOS *IN VITRO* NA  
PRESENÇA DE IGF-I E VITRIFICADOS COM GLUTATIONA REDUZIDA  
CRYOTOLERANCE OF PORCINE OOCYTES *IN VITRO* MATURED IN  
PRESENCE OF IGF-I AND VITRIFIED WITH REDUCED GLUTATHIONE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, área de concentração em  
nutrição e produção de não ruminantes, para a obtenção  
do título de Doutor.

APROVADA em 21 de agosto de 2018.

Dr. Joan Enrique Rodriguez-Gil	UAB
Dr. José Nélio de Sousa Sales	UFLA
Dr. José Camisão	UFLA
Dr. Marc Yeste de Oliveiras	UdG

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2018**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Deus, por todas as oportunidades e pessoas que ele colocou no meu caminho. Sou muito abençoada por isso. Obrigada também por não me deixar desistir e me dar forças para seguir em frente e ir atrás dos meus sonhos.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do DZO/UFLA, pela oportunidade de cursar o doutorado em tão reconhecida instituição. A Capes, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil, bem como pela concessão da bolsa para Doutorado sanduíche no exterior, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao professor e orientador Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo por se dispor a me orientar desde 2008, pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos e conselhos dados. Ao amigo e co-orientador Dr. Marc Yeste Oliveiras, por, mesmo sem me conhecer, aceitar me receber no seu grupo e por sempre estar ao meu lado. Você foi meu alicerce na Espanha. Sem você esse trabalho não teria sido concluído. Ao Dr. Joan Enric Rodrigues-Gil pela oportunidade de fazer o doutorado sanduiche na Espanha, por todo apoio e por estar presente na minha banca avaliadora. Ao professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa, que esteve presente em toda minha formação profissional, se disponibilizando sempre a me ajudar e contribuir com os trabalhos. Infelizmente ele não está presente hoje, mas sou muito grata por ter tido a oportunidade de conviver com ele. Ao professor Dr. José Nélio de Souza Sales e ao professor Dr. Jose Camisão por aceitarem o convite em participar da banca avaliadora, e contribuírem com o trabalho.

Agradecimentos especiais ao frigorífico Costa Brava (Girona, Espanha) e Nutrili (Lavras, Brasil) por me concederem o material necessário para realização do trabalho. Ao Dr. Sergi Bonet, diretor da TechnoSperm, por aprovar minha participação no grupo e disponibilizaram toda a estrutura física necessária pela condução do experimento. Agradeço também os amigos que fiz na Espanha, principalmente a Estela Garcia, Miriam Castillo Martin e Beatrice Gadani, por sempre me apoiarem, me ajudarem e me deixarem participar da vida e da família de vocês. Vocês foram essências em uma das fases mais desafiadoras da minha vida. Tudo ficava mais leve e fácil na companhia de vocês. Nunca me esquecerei de

todas as horas que passamos juntas dentro do laboratório, sem saber se ainda era dia ou já era noite, pelas “comidas”, “cenas”, “copas”, “viagens” e, claro, pelo “cajón de chuches”. As quiero muchísimo y as echo mucho de menos. À Thais Preisser Pontelo, Bruna Resende Chaves, Eloiza Lanferdine e Mariele Teles, por sempre me apoiarem e por estarem ao meu lado. Amo vocês.

E é claro que eu não podia deixar de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, a minha família. Meus pais Paulo Roberto e Tânia, meus irmãos Guilherme e Paulo Henrique, as minhas “irmãs” Maíra Torres e Sandra Urrutia, que me acolheu da forma mais carinhosa e amiga, aos meus sobrinhos Enzo e Bernardo, e aos meus avos, tios e primos. O amor e apoio de vocês são à base de tudo. E finalmente, mas não menos importante, ao amor da minha vida e meu porto seguro, Lucas Cota Torres.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

*Se enxerguei mais longe,  
foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”*

*(Isaac Newton)*

## RESUMO GERAL

Apesar da criopreservação oocitária ser uma importante ferramenta para o intercâmbio de material genético e produção *in vitro* de embriões, em suínos essa biotecnologia ainda é pouco praticada devido à baixa resistência dos ovócitos a esse processo. Porém, estudos demonstram que o fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I) pode regular a síntese de proteínas durante a resposta celular frente à criopreservação, ao passo que a glutathiona reduzida (GSH) pode manter a estabilidade da estrutura nucleoproteica e aumentar a viabilidade de gametas suínos criopreservados. Portanto, esse trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar se a maturação oocitária *in vitro* com IGF-I, e subsequente vitrificação com ou sem GSH, afeta a qualidade oocitária, a expressão de genes envolvidos em respostas antioxidantes, apoptóticas e de estresse, e a competência de desenvolvimento embrionário de oócitos suínos vitrificados. No Experimento 1, os complexos cumulus-oócito foram maturados na ausência ou presença de IGF-I (100 ng·mL<sup>-1</sup>) e então vitrificados com ou sem 2,0 mM de GSH. A taxa de maturação foi avaliada antes da vitrificação e a viabilidade oocitária, fragmentação do DNA e abundância relativa de transcritos da proteína X associada à BCL-2 (BAX), BCL2-like1 (BCL2L1), proteína de choque térmico 70 (HSPA1A), glutathiona peroxidase 1 (GPX1) e superóxido dismutase 1 (SOD1) foram avaliados em oócitos frescos e vitrificados. No Experimento 2, oócitos frescos e vitrificados foram fertilizados *in vitro* e a taxa de desenvolvimento embrionário foi determinada. Enquanto a adição de IGF-I ao meio de maturação não teve efeito sobre a maturação oocitária (P<0,05), esse hormônio aumentou (P>0,05) a taxa de sobrevivência dos oócitos vitrificados. Da mesma maneira, o uso de GSH nos meios de vitrificação também melhorou (P<0,05) a viabilidade oocitária após o reaquecimento. Entretanto, as maiores taxas de células vivas com DNA íntegro foram encontradas no grupo de oócitos maturados na presença de IGF-I e vitrificados com GSH. Os efeitos positivos do IGF-I e GSH sobre a sobrevivência oocitária foram acompanhados do aumento na abundância relativa de transcritos de HSPA1A e GPX1, respectivamente, e uma diminuição da expressão do gene BAX. Apesar das diferenças observadas no experimento I, nenhuma diferença (P>0,05) foi encontrada entre os grupos de oócitos vitrificados para os parâmetros de fertilização e desenvolvimento embrionário. Em conclusão, suplementar o meio de maturação com 100ng·mL<sup>-1</sup> de IGF-I e as soluções vitrificantes com 2mM de GSH melhora a qualidade e a criotolerância de oócitos suínos maturados *in vitro* e vitrificados, através de um mecanismo que envolve a expressão de BAX, GPX1 e HSPA1A, além de aumentar as taxas de clivagem e formação de blastocisto dos oócitos vitrificados, os quais apresentaram valores semelhantes aos dos oócitos frescos.

**Palavras-chave:** Fatores de crescimento. Antioxidantes. Criotolerância. Suínos.



## ABSTRACT

Although oocyte cryopreservation is an important tool for the exchange of genetic material and the *in vitro* production of embryos, in pigs this biotechnology is still little practiced due to the low resistance of the oocytes to this process. However, studies have shown that insulin-like growth factor I (IGF-I) can regulate protein synthesis during cellular response to cryopreservation, whereas reduced glutathione (GSH) can maintain the stability of the nucleoprotein structure and increase the viability of cryopreserved swine gametes. So, the objective of this study was to evaluate whether *in vitro* oocyte maturation with IGF-I, and subsequent vitrification with or without GSH, affects quality, expression of genes involved in antioxidant, apoptotic and stress response, and embryonic developmental competence of vitrified porcine oocytes. In Experiment 1, cumulus-oocyte complexes were matured in the absence or presence of IGF-I ( $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and then vitrified with or without 2.0 mM of GSH. The maturation rate was evaluated prior to vitrification, and oocyte viability, DNA fragmentation and relative abundance of BAX, BCL2-like1 (BCL2L1), heat shock protein 70 (HSPA1A), glutathione peroxidase 1 (GPX1) and superoxide dismutase 1 (SOD1) were evaluated in fresh and vitrified oocytes. In Experiment 2, fresh and vitrified oocytes were fertilized *in vitro* and the rate of embryonic development was determined. While the addition of IGF-I to the maturation medium had no effect on oocyte maturation ( $P < 0.05$ ), this hormone increase ( $P > 0.05$ ) the survival rate of vitrified oocytes. Likewise, the use of GSH in the vitrification/warming media also improved ( $P < 0.05$ ) the oocyte viability after rewarming. The associated use of IGF-I during maturation and GSH in vitrification process promoted a highest rate of live cells with integral DNA of IVM vitrified oocytes. The positive effects of IGF-I and GSH on oocyte survival were accompanied by an increase in the relative abundance of HSPA1A and GPX1 transcripts, respectively, and a decrease in BAX gene expression. Despite the differences observed in experiment I, no significant difference ( $P > 0.05$ ) was found between the vitrified oocyte groups for the parameters of fertilization and embryonic development. In conclusion, supplementing the maturation medium with  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  of IGF-I and vitrification solutions with 2 mM GSH improves the quality and cryotolerance of *in vitro* matured vitrified porcine oocytes through a mechanism that involves the expression of BAX, GPX1 and HSPA1A, in addition to increasing the rates of cleavage and blastocyst formation of vitrified oocytes, which presented values similar to fresh oocytes.

**Keywords:** Growth factors. Antioxidants. Cryotolerance. Swine.

## RESUMEN

Aunque la criopreservación oocitaria es una importante herramienta para el intercambio de material genético y producción *in vitro* de embriones, en cerdos esta biotecnología todavía es poco practicada debido a la baja resistencia de los ovocitos a ese proceso. Sin embargo, se ha demostrado que el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) puede regular la síntesis de proteínas durante la respuesta celular frente a la criopreservación, mientras que el glutatión (GSH) puede mantener la estabilidad de la estructura nucleoproteica y aumentar la viabilidad de los gametos porcinos criopreservados. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si la maduración oocitaria *in vitro* con IGF-I, y subsiguiente vitrificación con o sin GSH, afecta la calidad, la expresión de genes involucrados en respuestas antioxidantes, apoptóticas y de estrés, y de la competencia de desarrollo embrionario de ovocitos porcinos vitrificados. En el experimento 1, los complejos cumulus-ovocito fueron madurados en ausencia o presencia de IGF-I ( $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y luego vitrificados con o sin 2,0 mM de GSH. La tasa de maduración fue evaluada antes de la vitrificación, y la viabilidad oocitaria, fragmentación del ADN y abundancia relativa de transcripciones de la proteína X asociada a BCL-2 (BAX), BCL2-like1 (BCL2L1), proteína de choque térmico 70 (HSPA1A), glutatión peroxidasa 1 (GPX1) y superóxido dismutasa 1 (SOD1) se evaluaron en ovocitos frescos y vitrificados. En el experimento 2, los ovocitos frescos y vitrificados fueron fertilizados *in vitro* y se determinó la tasa de desarrollo embrionario. Mientras que la adición de IGF-I al medio de maduración no tuvo efecto sobre la maduración ( $P < 0,05$ ), esa hormona aumentó ( $P > 0,05$ ) la tasa de supervivencia de los ovocitos vitrificados. Igualmente, el GSH en los medios de vitrificación mejoró ( $P < 0,05$ ) la viabilidad oocitaria después del recalentamiento. Sin embargo, las mayores tasas de células vivas con ADN íntegro fueron encontradas en el grupo de ovocitos madurados con IGF-I y vitrificados con GSH. Los efectos positivos del IGF-I y GSH sobre la supervivencia oocitaria se acompañaron del aumento en la abundancia relativa de transcripciones de HSPA1A y GPX1, respectivamente, y una disminución de la expresión del gene BAX. A pesar de las diferencias observadas en el experimento I, no se encontró ninguna diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) entre los grupos de ovocitos vitrificados para los parámetros de desarrollo embrionario. En conclusión, suplementar el medio de maduración con  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IGF-I y las soluciones vitrificantes con 2mM de GSH mejora la calidad y la criotolerancia de ovocitos porcinos madurados *in vitro* y vitrificados, a través de un mecanismo que implica la expresión de BAX, GPX1 y HSPA1A, además de aumentar las tasas de clivaje y formación de blastocito de los ovocitos vitrificados, los cuales presentaron valores similares a de los ovocitos frescos.

**Palabras clave:** Factores de crecimiento. Antioxidantes. Criotolerancia. Cerdos.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Modelo proposto para a manutenção de paragem meiótica na fase de folículo pré-ovulatório em diplóteno. O GMPc e o AMPc produzidos pelas células da granulosa são transferidos para o oócito através de junções *gap*. O aumento do nível de GMPc inativa fosfodiasterase (PDE3A) e impede a hidrólise do AMPc no oócito. O aumento do nível de AMPc oocitário aumenta a atividade da proteína quinase A (PKA). O aumento da atividade de PKA inativa a fosfatase CDC25B e ativa Wee1/Myt1 quinase que resulta na fosforilação da CDK1 e inativação dos fatores promotores de meiose (FPM=MPF).....22

Figura 2 - Modelo proposta para o reinício da meiose induzido pelo LH em oócitos. LH liga-se ao seu receptor em células da granulosa murais e induz a produção de AMPc através de adenilato ciclase (AC). O nível aumentado de AMPc, em seguida, estimula a atividade de PKA/PKC e, conseqüentemente, a produção de fatores semelhantes ao EGF em células da granulosa. Os fatores EGF induzem a atividade da MAPK que perturba as junções comunicantes entre as células da granulosa e o oócito. Essa interrupção da bloqueia a transferência de AMPc e GMPc para o oócito. A redução do nível de GMPc ativa a fosfodiasterase (PDE3A) que reduz ainda mais o nível de AMPc através de sua hidrólise. A redução líquida do AMPc oocitário reduz a atividade da PKA no oócito. A atividade PKA reduzida ativa a fosfatase CDC25B e inativa a Wee1/Myt1 quinase que resulta na desfosforilação da CDK1 e ativação dos fatores promotores de meiose (FPM=MPF). FPM ativo, induz a retomada da meiose. ....24

Figura 3 - Depois da fase S duas divisões celulares são necessárias para produzir um gameta haploide. Durante meiose I, os cromossomos homólogos se segregam entre o oócito e o primeiro corpo polar. Na conclusão desse processo, o oócito paralisa sua divisão na metáfase II. Após a progressão meiótica, gerada pela fertilização, ocorre a conclusão da meiose II e as cromátides irmãs de segregam e expulsam o segundo corpo polar (GV=vesícula germinativa; MI=meiose I; PB1=primeiro corpúsculo polar; MetII=metáfase II; PB2= segundo corpúsculo polar).....25

Figura 4 - Modelo proposto para a manutenção da detenção meiótica na fase M-II. A via Mos/MEK/MAPK induz diretamente a estabilização dos fusos e dos FPM e, indiretamente,

esta via ativa a via do Emi2. O Emi2 ativado, em seguida, forma um complexo com a APC/C levando à estabilização dos FPM. A via Mos/MEK/MAPK usando duas proteínas, tais como MISS e DOC1R induz a estabilidade do eixo, e a síntese de ciclina induz a estabilização dos FPM. A estabilidade do fuso e dos níveis de FPM induzem a manutenção da detenção meiótica na fase M-II.....26

Figura 5 - Eventos envolvidos na oscilação da concentração de cálcio intra oocitária após a fertilização ..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6 - Visão esquemática da distribuição de organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto de bovino. (A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas citoplasmáticas a partir da fase imatura da vesícula germinativa para o estágio maduro de metáfase II e formação do zigoto. (B) Distribuição das organelas e o mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos cortical, secundária à liberação do cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fertilização. ....29

Figura 7 - Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. (A) Detalhe do aparelho do fuso meiótico na metáfase I e a estrutura centríolo/centrossoma. (B) Detalhe do fuso meiótico em telófase I, no qual podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos de cromossomos. ....31

Figura 8 - Imagem esquemática e de microscopia das projeções transzonais (TZP's). Essas projeções partem das células da granulosa e atravessam a zona pelúcida formando as junções aderentes em invaginações profundas na superfície do oócito, e/ou junções *gap* (comunicantes) na membrana do oócito. TZP pode ser rico em F-actina (A-TZP), ou eles são compostos principalmente de microtúbulos (M-TZP).....33

Figura 9 - Sistema de fator de crescimento semelhante à insulina. O sistema de IGF compreende os ligantes (IGF-I e IGF-II), sendo que a insulina pode participar do sistema devido a similaridade, os seus receptores (receptor de IGF-I, IGF-IR; receptor de insulina, IR; receptor híbrido IR/IGF-IR híbrido e o receptor de manose 6-fosfato/ IGF-II, M6P/IGF-IIR), seis proteínas de ligação de IGF (IGFBPs) e suas proteases. As setas completas e as setas pontilhadas indicam alta e baixa afinidade do ligante com o receptor, respectivamente. (ALS = subunidade ácido-lábil) .....35

Figura 10 - Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I).....37

Figura 11 - Esquema da sinalização do IGF e principais efeitos a jusante. A ativação do IGF-1R pode resultar em sinalização através de duas vias: PI3K / AKT e Ras / MAPK. A PI3K / AKT resulta em diminuição da apoptose, aumento da síntese de proteínas e aumento do metabolismo da glicose. Ras / MAPK contém uma cascata elaborada de quinase que, em última análise, leva ao aumento da proliferação celular, promovendo a atividade de fatores de transcrição, como a ELK1. ....38

Figura 12 - Regulação da síntese de E2 no folículo ovariano. Nas células da granulosa, a expressão do CYP19A1 é regulada pela sinalização de FSH e ER. Os efeitos do FSH na expressão do gene CYP19A1 são mediados pela sinalização do IGF-IR e pela AKT. A sinalização do ER também pode estar relacionada com as vias do IGF-IR. Além disso, o ER tem efeitos diretos sobre a expressão do gene CYP19A1 dentro do núcleo da célula. A androstenodiona, produzida pelas células da teca, é usada como substrato para a aromatase produzir E2. Em células da granulosa, a IGFBP-2 é regulada por E2, e a IGFBP-2 tem mostrado bloquear a produção de E2 dependente de FSH. Níveis aumentados de E2 bloqueiam a expressão de FSH e induzem o aumento de LH. (AKT, proteína quinase B; CYP19A1: aromatase; E2, 17beta-estradiol; ER, receptor de estrogênio; FSH, hormônio folículo-estimulante, IGF-IR, receptor de IGF-I, LH, hormônio luteinizante). ....41

Figura 13 - Diagrama esquemático mostrando o envolvimento das mitocôndrias e receptores de membrana na via de apoptose em oócitos de mamíferos.....55

Figura 14 - Representação esquemática mostrando vários fatores que podem desencadear a apoptose de ovócitos, como a falha de comunicação entre oócito e células da granulosa, sinalização molécula (Ca<sup>2+</sup>, AMPc e GMPc), fatores oxidantes (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup>), fatores de sobrevivência, fatores pró-apoptóticos (Bax, citocromo c, caspases 8 e 9) e fatores apoptóticos (caspase 3 e fragmentação do DNA). Casp 3: Caspase 3; Frag DNA: Fragmentação de DNA, Cit c: Citocromo c; Casps 8, 9:Caspases 8 e 9 .....56

Figura 15 - Imagem ilustrativa de duas cascatas de sinalização de quinase ativadas por choque térmico. PI-3K: fosfatidilinositol-3 quinase; AKT: proteína quinase B; GSK3: glicogênio sintase quinase 3; PKA: proteína quinase A; HSF-1: fator de transcrição do choque térmico 1; HSP70 e 27: proteína do choque térmico 70 e 27. ....58

Figura 16 - (A) Mecanismo de conversão do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>) pela superóxido dismutase (SOD), e (B) Vias de

redução/oxidação envolvidas na manutenção dos cofatores necessários para a atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Mn: manganês; Cu: cobre. GP6: glicose-6-fosfato; G6PD: glicose-6fosfato desidrogenase; 6-fosfogluconato; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada. .... 61

## SEGUNDA PARTE

**Figure 1** Classification of porcine oocytes using the orcein staining method: (A) germinal vesicle (GV); (B) metaphase I (MI); and (C) metaphase II (MII) stage. Magnification of 100x. CP = polar corpuscle ..... 97

**Figure 2** Classification of pig oocytes using simultaneous ethidium homodimer-1 (EthD-1) staining and TUNEL assay: (A) DAPI+; blue, stains all nuclei; (B) TUNEL+; green, fragmented DNA; and (C) EthD-1+; red stain – stains nuclei of non-viable oocytes. Magnification of 400x. .... 97

**Figure 3** Effects of IGF-I supplementation on in vitro maturation of pig oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. GV: Germinal Vesicle; MI: Metaphase I; MII: Metaphase II; Deg: degenerated. No significant differences between control and IGF-I were observed..... 98

**Figure 4** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with GSH on oocyte viability and DNA fragmentation before and after vitrification of porcine oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) A: TUNEL-/EthD-1-: viable oocytes with intact DNA; B: TUNEL+/EthD-1+: non-viable oocytes with fragmented DNA ..... 99

**Figure 5** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with GSH on Relative expression of BAX, BCL2L1, HSPA1A, GPX1 and SOD1, and BAX: BCL2L1 ratio before and after vitrification of porcine oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). .... 100

**Figure 6** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with GSH on penetration, monospermy, cleavage and blastocysts rates before and after vitrification of porcine oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). .... 101

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

<b>Table 1.</b> Primers used for quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. NCBI, National Center for Biotechnology Information.....	102
<b>Table 2</b> Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with GSH on cleavage rates and embryo development. ....	103

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>18</b>
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b> <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b> <b>Oogênese</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2</b> <b>Maturação oocitária</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2.1</b> <b>Maturação nuclear</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.1.1</b> <b>Primeira parada meiótica</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2.1.2</b> <b>Segunda parada meiótica</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.2</b> <b>Maturação Citoplasmática</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.2.1</b> <b>Dinâmica das organelas e do citoesqueleto durante a maturação</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3</b> <b>Células da granulosa (<i>cumulus oophorus</i>)</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3.1</b> <b>Interações entre <i>cumulus oophorus</i> e oócito</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4</b> <b>Sistema Fator de Crescimento Semelhante à insulina (Sistema IGF)</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4.1</b> <b>Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4.1.1</b> <b>Receptores de IGF-I (IGF-IR)</b> .....	<b>37</b>
<b>2.4.1.2</b> <b>IGF-I e função ovariana</b> .....	<b>39</b>
<b>2.5</b> <b>Criopreservação</b> .....	<b>43</b>
<b>2.5.1</b> <b>Congelamento de oócitos</b> .....	<b>45</b>
<b>2.6</b> <b>Vitrificação oocitária</b> .....	<b>46</b>
<b>2.6.1</b> <b>Estágio Vitrificação</b> .....	<b>49</b>
<b>2.6.2</b> <b>Principais crioinjúrias</b> .....	<b>50</b>
<b>2.7</b> <b>Resposta oocitária frente ao estresse</b> .....	<b>52</b>
<b>2.7.1</b> <b>Alteração na expressão gênica</b> .....	<b>53</b>
<b>2.7.2</b> <b>Apoptose celular</b> .....	<b>53</b>
<b>2.7.3</b> <b>Proteínas do Choque térmico (heat shock proteins – HSP)</b> .....	<b>57</b>
<b>2.7.4</b> <b>Estresse oxidativo</b> .....	<b>59</b>
<b>2.8</b> <b>Glutathiona reduzida (GSH)</b> .....	<b>61</b>
<b>3</b> <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>80</b>
<b>ARTIGO – Normas da Revista Frontiers in Physiology</b> .....	<b>80</b>



## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de gametas é considerada uma ferramenta eficiente para manutenção dos recursos genéticos, contribuindo para a pesquisa e desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida. A criopreservação oocitária é realizada através da vitrificação, processo que utiliza altíssimas taxas de resfriamento, pois apresenta resultados melhores do que os processos de congelamento lento. Entretanto, apesar de ser a metodologia de eleição, o processo de vitrificação gera danos à estrutura do oócito, afetando sua capacidade de sobrevivência, fertilização e desenvolvimento após o descongelamento.

Na espécie suína, os oócitos são altamente sensíveis ao resfriamento e congelamento devido à grande quantidade de lipídios presentes no citoplasma, o que os torna altamente suscetíveis ao estresse oxidativo gerados pelo processo de criopreservação. Diante dessa situação, a adição de glutathiona reduzida (GSH) aos meios de vitrificação pode auxiliar o oócito a combater as espécies reativas ao oxigênio, protegendo as estruturas oocitárias do estresse oxidativo durante a vitrificação. Isso ocorre devido ao fato da GSH ser um importante antioxidante não enzimático, que desempenha um papel crucial como protetor celular e na manutenção do status redox intracelular. Baseado nisso, trabalhos demonstram que a suplementação de meios de maturação com GSH melhora a função mitocondrial e a regulação do estado redox celular (TRAPPHOFF et al., 2016), e sua adição aos meios de criopreservação estabiliza a estrutura de nucleoproteínas dos espermatozoides suínos (YESTE et al., 2014) e aumenta a taxa de desenvolvimento de blastocistos em oócitos de camundongo vitrificados (MOAWAD; TAN; TAKETO, 2017).

A composição dos meios de maturação in vitro também tem forte impacto na qualidade do ovócito e na criotolerância dos mesmos. Pensando nisso, a suplementação de meios de maturação com fatores que podem melhorar a qualidade oocitária e auxiliá-los no combate ao frio, é outra alternativa para melhorar os resultados pós descongelamento. Vários trabalhos demonstraram que a suplementação dos meios de maturação oocitária e cultivo embrionário com fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) estimula a

maturação oocitária, promove o desenvolvimento de blastocistos e diminui a taxa de apoptose em oócitos e blastocistos. Wasielak et al. (2013) demonstraram que o IGF-1 na concentração de  $100\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  no meio de maturação oocitária aumenta a razão entre genes antiapoptóticos (BCL2L1) e apoptóticos (BAX) em blastocistos suínos, o que está relacionado com blastocistos de qualidade superior. Adicionalmente, além de reduzir a apoptose, o IGF-I também aumenta a expressão de proteínas que estão envolvidas na proteção celular contra o choque térmico (PAN et al., 2015)

Neste contexto, as hipóteses deste estudo foram que (1) a adição de IGF-I no meio IVM melhora a criotolerância de oócitos suínos através das vias antiapoptóticas e de sinalização de choque térmico; e (2) a suplementação de meios de vitrificação e reaquecimento com GSH protege o oócito do estresse oxidativo e auxilia na manutenção da estrutura nuclear. Para testar essas hipóteses, o presente estudo teve como objetivo determinar se suplementar o meio de maturação *in vitro* (MIV) com  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de IGF-I e adição de 2mM GSH aos meios de vitrificação e reaquecimento alteram a viabilidade, integridade do DNA e competência de desenvolvimento embrionário dos oócitos suínos MIV e vitrificados, bem como a abundância relativa de transcritos de genes envolvidos em respostas antioxidantes (GPX1 e SOD1), apoptóticas (BAX, BCL2L1) e de estresse (HSPA1A).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Oogênese

A oogênese pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, até a formação do oócito haplóide apto a ser fecundado (MARTIN, 2008). Esse processo se inicia antes do nascimento, mas somente alguns oócitos conseguem completá-lo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação.

De acordo com Van Den Hurke Zhao (2005), o processo de formação de oócitos inclui sete passos: a geração de células germinativas primordiais (CGP); a migração dessas células para as gônadas; a colonização das gônadas pelas CGP; a diferenciação das CGP em

ovogônias; a proliferação das ovogônias; a iniciação da meiose; e a parada meiótica em prófase I.

Portanto, a oogênese se inicia ainda durante a vida fetal, no momento em que as CGP colonizam a gônada indiferenciada, e se diferenciam em ovogônias, que por sua vez dão origem a todos os oócitos da gônada feminina. As ovogônias passam por sucessivas mitoses e entram na primeira divisão meiótica, quando passam a ser denominadas de oócitos primários ou imaturos. Esse processo de meiose é interrompido (primeira parada) no estágio de diplóteno da prófase I, no qual o oócito permanece até o início da maturação oocitária no período da maturidade sexual.

## **2.2 Maturação oocitária**

Desde que a fertilização *in vitro* (FIV) tornou-se uma realidade, tem-se dado crescente atenção ao conhecimento dos eventos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento do gameta feminino. Vários fatores atuam de maneira a tornar o oócito imaturo hábil para ser normalmente fertilizado e se desenvolver em um embrião viável. A maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza a fecundação e aumenta as ocorrências de polispermia, de partenogênese e de bloqueio do desenvolvimento embrionário (MARTIN, 2008).

O início da divisão meiótica dos oócitos se inicia ainda na fase fetal, após sucessivas mitoses. Fatores inibitórios sintetizados pelas células da granulosa e presentes no fluido folicular, chamados de inibidores de maturação do oócito (OMI), interrompem as divisões meióticas no estágio diplóteno da prófase I, morfologicamente designado como vesícula germinativa (VG) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os oócitos permaneceram nesse estágio até a puberdade, quando, sob estímulo das gonadotrofinas hipofisárias, serão mobilizados e retomaram a meiose. Esse estímulo gonadotrófico é decorrente de um aumento repentino do hormônio luteinizante (LH), o que implicará na quebra da vesícula germinativa (GVBD) e na montagem do fuso meiótico (LI; ALBERTINI, 2013). Após esse processo, a maturação fica estagnada na fase de metáfase II, a qual será concluída somente com a fertilização e extrusão do segundo corpúsculo polar.

Além da redução de cromossomos e haploidização, a chamada maturação nuclear, o citoplasma do oócito também deve "madurar". Nesse processo ocorrem modificações que incluem a síntese proteica, transcrição de RNAm e a reorganização de organelas, o que irá conferir ao oócito capacidade para sustentar as etapas posteriores do desenvolvimento (REYES; ROSS, 2016) . Portanto, a maturação oocitária envolve duas etapas principais: a maturação nuclear, que se inicia com a quebra de vesícula germinativa (GVBD) e termina apenas quando a meiose é finalizada; e a maturação citoplasmática, que envolve modificações citoesqueléticas e moleculares nos oócitos (VORONINA; WESSEL, 2003).

### **2.2.1 Maturação nuclear**

A maturação nuclear ou meiótica corresponde à divisão reducional dos cromossomos, que tem como objetivo central a produção dos gametas haplóides aptos para fecundação, e posterior desenvolvimento embrionário (CROCOMO et al., 2011). Esse processo se inicia quando ocorre a quebra da vesícula germinativa, e o processo meiótico retoma.

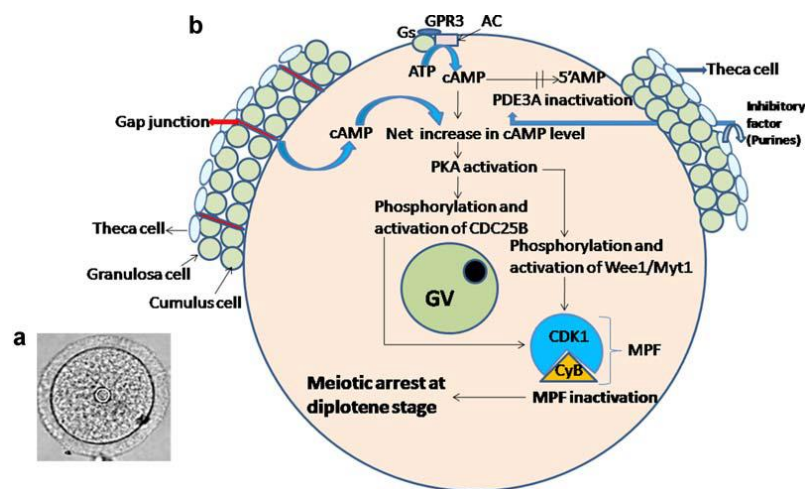
#### **2.2.1.1 Primeira parada meiótica**

A retomada da divisão meiótica é dependente da atividade dos Fatores Promotores da Maturação (FPM). Esses fatores são serina-treonina proteínas quinases compostas por uma subunidade catalítica, quinase dependente de ciclina 1 (CDK1), e por outra subunidade regulatória, a ciclina B (TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010). Quando os FPM estão inativados, o oócito se mantém em prófase I (VON STETINA; ORR-WEAVER, 2011). Níveis elevados do segundo mensageiro AMPc no interior do oócito tem sido indicado como um dos fatores essenciais para manter a atividade dos FPM inativados durante a parada meiótica (HAN et al., 2005). O pool inibitório de AMPc necessário para manter a parada meiótica é produzido pelo próprio oócito, através da ativação da proteína G, e subsequente estimulação da adenilato ciclase, enzima responsável pela síntese de AMPc (VACCARI et al., 2009).

As células somáticas que envolvem o oócito também produzem sinais inibitórios da meiose, os quais são enviados através das junções *gap* para o citoplasma oocitário, exercendo importante papel na manutenção da parada meiótica (Figura 1) (NORRIS et al., 2008). Essa interação entre as células foliculares e o oócito é tão importante que a simples remoção das

células somáticas leva o oócito a retomar a meiose (WIGGLESWORTH et al., 2013). Utilizando um marcador de AMPc, Webb et al. (2002) demonstraram que o tratamento do complexo cumulus-oócitos com FSH, hormônio que estimula a produção de AMPc nas células da granulosa, provocou um aumento do AMPc tanto nas células do cumulus quanto no oócito. Entretanto, se as junções comunicantes fossem fechadas, a transferência desse segundo mensageiro para o oócitos era abolida. Nessa situação, os níveis de AMPc permaneceram constantes nos oócitos, mas a parada meiótica não foi mantida (WEBB et al., 2002), demonstrando que o AMPc necessário para manter a parada meiótica, tem tanto origem oocitária quanto folicular.

Figura 1 - Modelo proposto para a manutenção de paragem meiótica na fase de folículo pré-ovulatório em diplóteno. O GMPc e o AMPc produzidos pelas células da granulosa são transferidos para o oócito através de junções *gap*. O aumento do nível de GMPc inativa fosfodiesterase (PDE3A) e impede a hidrólise do AMPc no oócito. O aumento do nível de AMPc oocitário aumenta a atividade da proteína quinase A (PKA). O aumento da atividade de PKA inativa a fosfatase CDC25B e ativa Wee1/Myt1 quinase que resulta na fosforilação da CDK1 e inativação dos fatores promotores de meiose (FPM=MPF).



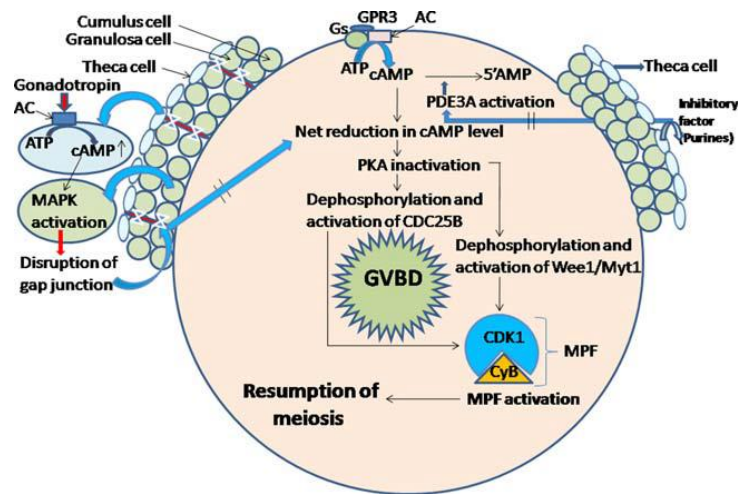
Fonte: Tripathi; Kumare Chaube (2010)

O GMPc também foi identificado como um sinal inibidor essencial que se difunde através das junções *gap* a partir de células da granulosa do cumulus para o oócito. Essa substância inativa a ação da fosfodiesterase, enzima responsável pela degradação do AMPc

celular, fazendo com que níveis desse segundo mensageiro se mantenham elevados no oócito, bloqueando a progressão meiótica (MADGWICK; JONES, 2007). Na verdade, a fosfodiesterase é responsável pela hidrólise tanto de AMPc quanto do GMPc, mas, a velocidade de hidrólise do AMPc é mais elevada do que para a hidrólise do GMPc. Portanto, dadas estas propriedades cinéticas, esta enzima comporta-se como uma fosfodiesterase que hidrolisa AMPc inibida pelo GMPc (MADGWICK; JONES, 2007). O papel do GMPc na manutenção da parada meiótica foi comprovada por Vaccari et al. (2009), os quais demonstraram que a adição de fosfodiesterases que hidrolisam somente GMPc faz com que a célula germinativa retome o ciclo celular normal. Dessa forma, o GMPc é considerado um sinal inibitório essencial que se difunde através de junções *gap* a partir de células da granulosa do cumulus para o oócito.

Na puberdade, em resposta ao aumento pré-ovulatório do LH, o oócitos retomam a meiose. Esse hormônio induz a expressão de genes requeridos para a ruptura folicular e ovulação, e ativa várias cascatas de sinalização que conduzem a maturação do oócito (CONTI et al., 2012). A retomada da meiose é induzida pela queda na concentração intra oócito de AMPc, o que leva à ativação da fosfatase CDC25 e a redução na inibição da CDK1 (VON STETINA; ORR-WEAVER, 2011). A queda dos níveis intra oocitários de AMPc é decorrente da ação do LH sobre as junções *gap*. Esse hormônio gonadotrófico ativa a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), a qual promove a fosforilação da conexina 43 (a principal proteína de junções *gap*) e induz uma diminuição na permeabilidade da comunicação entre oócito e células somáticas (NORRIS et al., 2008). Portanto, essa redução das comunicações impede tanto o influxo de AMPc quanto de GMPc a partir das células da granulosa para o oócito, aumentando a atividade oocitária da fosfodiesterase e, por consequência, reduzindo a concentração de AMPc no oócito. Vale ressaltar que os receptores de LH são expressos apenas nas células somáticas e não no oócito, a estimulação da meiose induzida pelo LH também envolve a sinalização entre o oócito e as células foliculares.

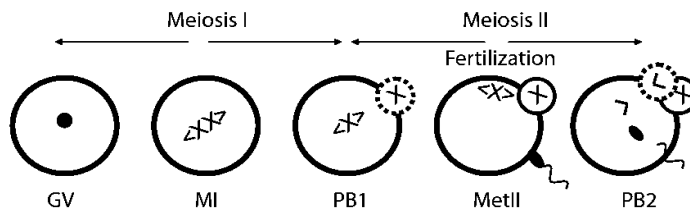
Figura 2 - Modelo proposta para o reinício da meiose induzido pelo LH em oócitos. LH liga-se ao seu receptor em células da granulosa murais e induz a produção de AMPc através de adenilato ciclase (AC). O nível aumentado de AMPc, em seguida, estimula a atividade de PKA/PKC e, conseqüentemente, a produção de fatores semelhantes ao EGF em células da granulosa. Os fatores EGF induzem a atividade da MAPK que perturba as junções comunicantes entre as células da granulosa e o oócito. Essa interrupção da bloqueia a transferência de AMPc e GMPc para o oócito. A redução do nível de GMPc ativa a fosfodiesterase (PDE3A) que reduz ainda mais o nível de AMPc através de sua hidrólise. A redução líquida do AMPc oocitário reduz a atividade da PKA no oócito. A atividade PKA reduzida ativa a fosfatase CDC25B e inativa a Wee1/Myt1 quinase que resulta na desfosforilação da CDK1 e ativação dos fatores promotores de meiose (FPM=MPF). FPM ativo, induz a retomada da meiose.



Fonte: Tripathi; Kumare Chaube (2010)

A partir do momento em que a meiose é retomada, os cromossomos recondensam, a vesícula germinativa é rompida, e os cromossomos homólogos replicados, separam-se na anáfase I dando origem a dois núcleos, cada um contendo a metade do número original de cromossomos (Figura 3) (YAMADA; ISAJI, 2011). Nesse período o posicionamento do fuso ocorre de maneira excêntrica, levando a divisão celular assimétrica, a qual coincidirá com a redução do número de cromossoma por meio de extrusão do primeiro corpo polar, e a retenção máxima do citoplasma do oócito (LONERGAN; FAIR, 2016). Após esse processo, cada um dos cromossomos é ainda composto de duas cromátides, que só serão separadas na meiose II.

Figura 3 - Depois da fase S duas divisões celulares são necessárias para produzir um gameta haploide. Durante meiose I, os cromossomos homólogos se segregam entre o oócito e o primeiro corpo polar. Na conclusão desse processo, o oócito paralisa sua divisão na metáfase II. Após a progressão meiótica, gerada pela fertilização, ocorre a conclusão da meiose II e as cromátides irmãs se segregam e expulsam o segundo corpo polar (GV=vesícula germinativa; MI=meiose I; PB1=primeiro corpúsculo polar; MetII=metáfase II; PB2= segundo corpúsculo polar).



Fonte: Madgwick et al. (2004)

A etapa de separação dos cromossomos, durante a meiose I, é controlada pelas proteínas verificadoras da montagem do fuso (SAC), as quais garantem a correta segregação de cromossomos homólogos (LI; ALBERTINI, 2013). Esse controle é realizado através da inibição do complexo promotor da anáfase/ciclossoma (ACP/C), retardando o início da anáfase (TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010). Formação do eixo funcional correlaciona-se com o aumento progressivo na atividade dos FPM, pois esse processo requer elevada atividade desses fatores (MADGWICK et al., 2004), até o ponto onde suas concentrações se estabilizam. No momento em que ocorre estabilização dos níveis de FPM, a migração do fuso e a ativação da APC/C são iniciadas. A ativação de via Mos/MAPK também desempenha um papel significativo na reorganização dos microtúbulos e no posicionamento do eixo metafásico (MADGWICK et al., 2004).

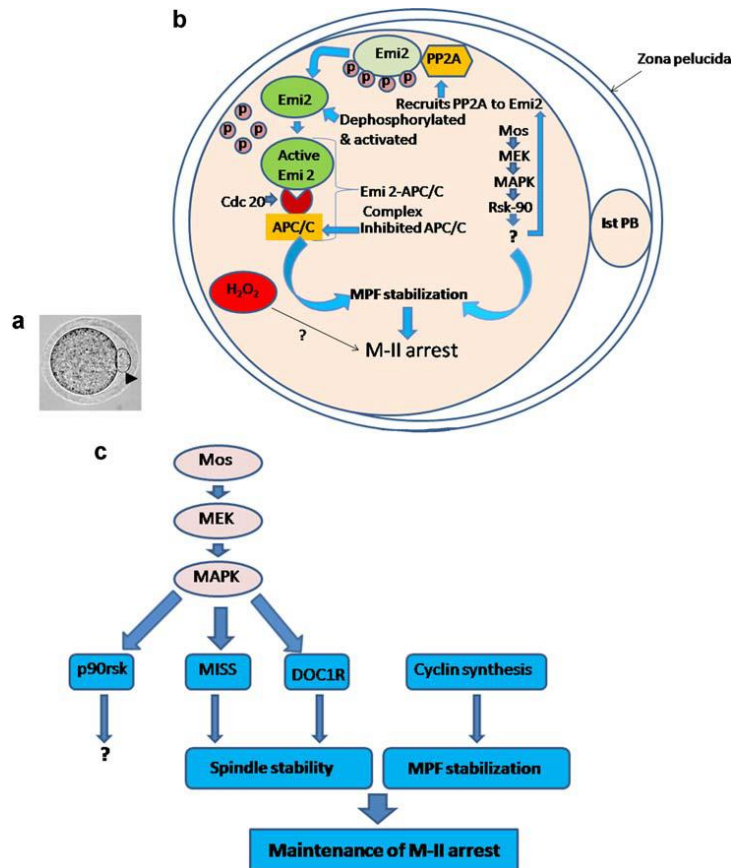
### 2.2.1.2 Segunda parada meiótica

Após o término da meiose I, os oócitos evitam a ativação partenogenética paralisando seu ciclo celular na metáfase da meiose II. A própria estabilização da atividade dos FPM e a organização correta do fuso, são necessárias para a manutenção da parada do oócito em meiose II (TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010). A estabilização do FPM é mantida por fatores citostáticos e pela via da MAPK mediada por Mos (Figura 4). O Fator Inibidor da meiose 2 (EMI2) é um dos componentes moleculares do fator citostático, e é necessário para manter a



segunda parada da meiose (VON STETINA; ORR-WEAVER, 2011). Ambas as vias de Mos e Emi2 trabalham em conjunto para inibir a atividade do APC/C (MADGWICK; JONES, 2007), impedindo a progressão da divisão celular. A via da MAPK mediada por Mos também é importante na manutenção da parada meiótica por estabilizar os fusos meióticos, impedindo sua progressão (TRIPATHI; KUMAR; CHAUBE, 2010).

Figura 4 - Modelo proposto para a manutenção da detenção meiótica na fase M-II. A via Mos/MEK/MAPK induz diretamente a estabilização dos fusos e dos FPM e, indiretamente, esta via ativa a via do Emi2. O Emi2 ativado, em seguida, forma um complexo com a APC/C levando à estabilização dos FPM. A via Mos/MEK/MAPK usando duas proteínas, tais como MISS e DOC1R induz a estabilidade do eixo, e a síntese de ciclina induz a estabilização dos FPM. A estabilidade do fuso e dos níveis de FPM induzem a manutenção da detenção meiótica na fase M-II.

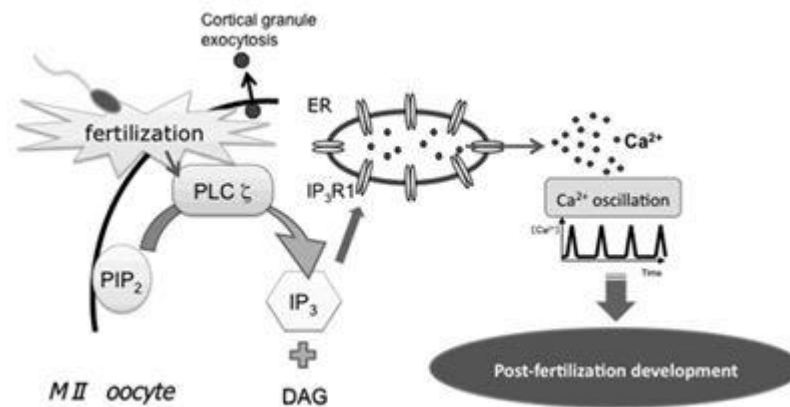


Fonte: Tripathi; Kumare Chaube (2010)

A ativação oocitária, ou seja, a retomada da meiose II, ocorre de forma dependente da fertilização. A fusão do espermatozoide com o oócito induz oscilações nas concentrações

oocitárias de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual desencadeará a conclusão da meiose II (MADGWICK; JONES, 2007). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre pela ativação da via da fosfolipase C e formação de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> liga-se ao seu receptor localizado nas membranas do retículo endoplasmático, induzindo a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e libertação desses a partir do lúmen dessa organela para o citoplasma (Figura 5) (AJDUK; MALAGOCKI; MALESZEWSKI, 2008). A elevação intra oócito de cálcio resulta na ativação de um efetor, a proteína quinase dependente de calmodulina II (CaMKII), a qual degradará o Emi2, gerando o desbloqueio da ação da APC/C e o progresso meiótico (MADGWICK; JONES, 2007; VON STETINA; ORR-WEAVER, 2011).

Figura 5 - Eventos envolvidos na oscilação da concentração de cálcio intra oocitária após a fertilização



Fonte: Adaptado de Yamada e Isaji

Com a retomada da meiose, e após a separação das cromátides irmãs na anáfase II, o citoplasma do oócito secundário se divide novamente originando o oócito maduro e um segundo corpúsculo polar, ambos contendo um número haploide de cromossomos. Devido às duas divisões citoplasmáticas assimétricas, os oócitos mantêm seu volume, apesar de sofrerem duas divisões celulares (LI; ALBERTINI, 2013).

### 2.2.2 Maturação Citoplasmática

A maturação nuclear completa não é suficiente para garantir a qualidade do oócito para ser fecundado e promover o crescimento de um embrião, sendo que a maturação citoplasmática também deve ser concluída. Tanto a maturação nuclear quanto a citoplasmática

dos oócitos, procedem em sincronia após o pico de LH in vivo. Embora a maturação nuclear e citoplasmática geralmente ocorram em sincronia, a maturação citoplasmática pode progredir mesmo quando a maturação nuclear está em parada meiótica, indicando que eles são fenômenos independentes (YAMADA; ISAJI, 2011). Em termos gerais, a maturação citoplasmática envolve a acumulação de RNAm, proteínas, substratos e nutrientes que são necessários para o desenvolvimento da competência oocitária e embrionária (WATSON, 2007).

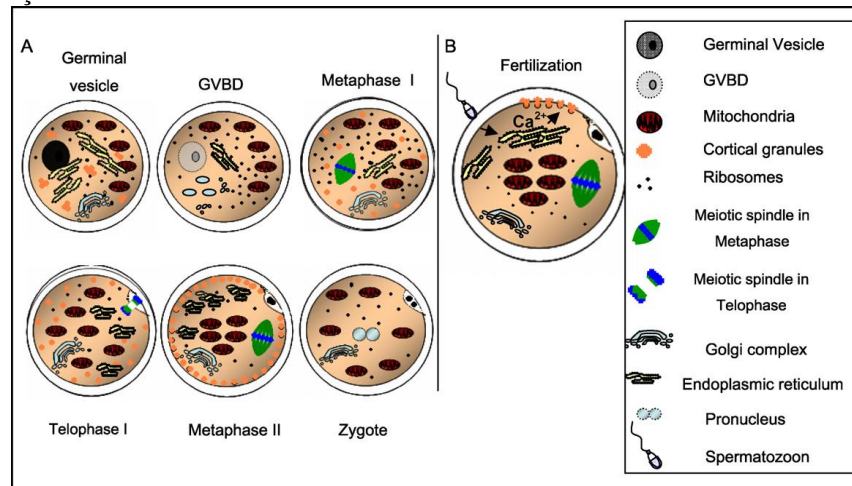
O processo de maturação citoplasmática é composto pela redistribuição das organelas citoplasmáticas e pela dinâmica dos filamentos do citoesqueleto (FERREIRA et al., 2009), sendo que o reposicionamento das organelas depende das necessidades da célula durante cada fase de desenvolvimento da maturação.

### **2.2.2.1 Dinâmica das organelas e do citoesqueleto durante a maturação**

Dentre as organelas citoplasmáticas, as mitocôndrias desempenham importante papel, uma vez que elas são um componente chave da maquinaria metabólica, responsável pelo fornecimento de energia que é necessária durante o processo de maturação (YAMADA; ISAJI, 2011). O movimento das mitocôndrias para áreas de elevado consumo de energia é essencial para os oócitos e embriões durante períodos críticos do ciclo celular (FERREIRA et al., 2009). Em oócitos de bovino e suíno, as mitocôndrias ativas têm uma distribuição principalmente cortical na fase GV e, em seguida, migram para o centro durante o processo de maturação, o que resulta numa distribuição difusa no citoplasma dos oócitos em MII (Figura 6).

Como a síntese proteica é indispensável para a maturação oocitária, outra organela importante para o desenvolvimento oocitário são os ribossomos. Durante a metáfase I, a síntese de proteínas no oócito é aproximadamente três vezes maior do que durante a fase de quebra da vesícula germinativa (GVBD) (Figura 6). Entretanto, quando a célula atinge a fase de metáfase II, o oócito exibe níveis basais de tradução do RNAm (FERREIRA et al., 2009). Essa redução da síntese proteica talvez ocorra devido à ausência de um nucléolo funcional, o que conduz a uma ausência de transcrição de RNAr ou baixa produção dos ribossomos, e, conseqüente, diminuição da tradução de RNAm (REYES; ROSS, 2016).

Figura 6 - Visão esquemática da distribuição de organelas citoplasmáticas durante a maturação, fertilização e formação do zigoto de bovino. (A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas citoplasmáticas a partir da fase imatura da vesícula germinativa para o estágio maduro de metáfase II e formação do zigoto. (B) Distribuição das organelas e o mecanismo de liberação do conteúdo dos grânulos cortical, secundária à liberação do cálcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fertilização.



Fonte: Ferreira et al. (2009)

Evidências anteriores sugeriram que a produção de ribossomos na fase GV, em que há um nucléolo funcional e, portanto, a presença de transcrição de RNAr ou de produção do ribossomo para a tradução de RNAm, pode favorecer um maior armazenamento dessa organela nos oócitos durante a fase de MI (VAN BLERKOM; DAVIS; ALEXANDER, 2000). Assim, os níveis mais elevados de síntese de proteína observada em MI em oposição a MII pode ser devido ao maior armazenamento ribossomal observada durante MI. Como consequência da alta utilização destas organelas durante o processo de maturação até MII, os estoques de proteína são reduzidos e, portanto, a quantidade de ribossomos e os níveis de síntese de proteínas podem ser comparativamente menores (FERREIRA et al., 2009). De qualquer maneira, esta evidência apoia a ideia de que a presença de ribossomos está diretamente ligada à síntese de proteínas durante períodos de desenvolvimento oocitário.

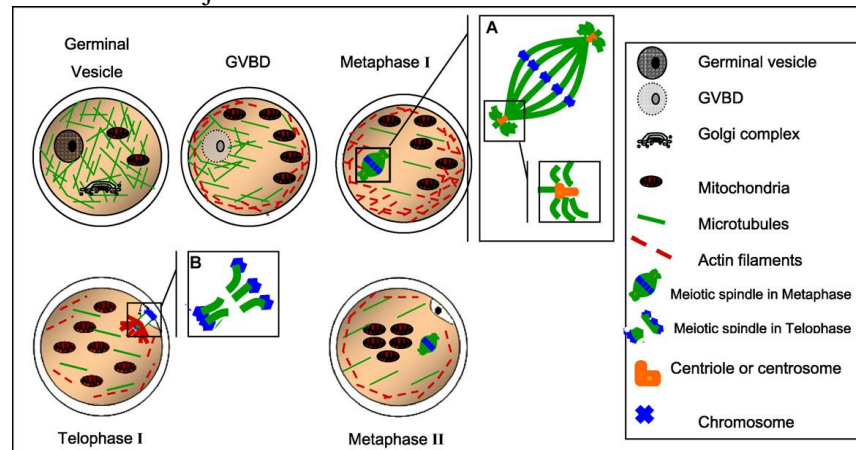
Outra organela importante na maturação oocitária, principalmente no processo de progressão da meiose II, é o retículo endoplasmático. Essa organela é responsável pelo dobramento e degradação de proteínas, pelo metabolismo lipídico, compartimentalização do núcleo, e pela regulação do gradiente do ion  $\text{Ca}^{2+}$  (AJDUK; MAŁAGOCKI; MALESZEWSKI,

2008). Portanto, alterações bioquímicas e estruturais no retículo endoplasmático durante a maturação são fundamentais para o bom funcionamento da regulação do cálcio intracelular. Na vesícula germinal (GV) essa organela encontra-se uniformemente distribuída no ooplasma, ao passo que, com a progressão da maturação, o retículo endoplasmático é encontrado em regiões corticais e acumula-se em pequenos grupos (YAMADA; ISAJI, 2011).

Os grânulos corticais, responsáveis pelo bloqueio da polispermia, também sofre alterações posicionais durante a maturação oocitária. Em oócitos na fase GV, os grânulos corticais são distribuídos em grupos ao longo de todo citoplasma. No final do período de maturação, quando os oócitos atingem a fase MII, os grânulos se distribuem por toda a superfície interna próximo a membrana plasmática, um padrão estrategicamente disposto para esperar pela entrada do espermatozoide e realizar a ativação oocitária (Figura 6) (HOSOE; SHIOYA, 1997).

Os microtúbulos apresentam uma distribuição relativamente uniforme na fase de GV, onde estão espalhados por todo o ooplasma. Após a GVBD, microtúbulos são condensados em torno dos cromossomas e começam a migrar para o córtex, enquanto os microfilamentos estão densamente acumulados na região subcortical dos oócitos, especialmente à volta do fuso meiótico (MAO et al., 2014). Na MI, os microtúbulos são nucleados, por polimerização da tubulina no citoplasma dos oócitos, com o centrossoma, formando o fuso meiótico e a placa de metafisária, na qual os cromossomos são dispostos de maneira equatorial (FERREIRA et al., 2009). Já em MII, tanto os microtúbulos quanto os microfilamentos de actina, se acumulam principalmente na região citoplasmática cortical (Figura 7).

Figura 7 - Dinâmica dos filamentos do citoesqueleto durante a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos bovinos. (A) Detalhe do aparelho do fuso meiótico na metáfase I e a estrutura centríolo/centrossoma. (B) Detalhe do fuso meiótico em telófase I, no qual podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos de cromossomos.



Fonte: Ferreira et al. (2009)

### 2.3 Células da granulosa (*cumulus oophorus*)

O *cumulus oophorus* é definido como um grupo de células da granulosa intimamente associadas, chamadas de células do cumulus, que ficam ao redor do oócito no folículo antral (TANGHE et al., 2002). Em folículos primários, os quais contêm oócitos em crescimento, as células da granulosa, que os rodeiam, começam a proliferar e, no momento da formação do antro, duas populações específicas podem ser distinguidas, as células do cumulus, e células da granulosa mural, que ficam em contato com a parede folicular (VAN SOOM et al., 2002).

As células do cumulus e as células da granulosa mural, juntamente com o oócito, formam um sincício mediado por junções comunicantes, o qual é essencial para o crescimento e maturação oocitária e folicular. Através dessas junções, as células da granulosa conecta os oócitos ao meio externo, fornecendo nutrientes, e permitindo uma transferência rápida de pequenos metabolitos e moléculas regulatórias para o citoplasma do oócito (TANGHE et al., 2002).

### 2.3.1 Interações entre *cumulus oophorus* e oócito

A interação entre as células somáticas e os oócitos é conhecida por ocorrer ininterruptamente desde a formação do folículo primordial até a ovulação, mas as formas segundo as quais ocorrem pode variar ao longo do tempo em resposta aos desafios impostos pelo desenvolvimento folicular. Por exemplo, na estrutura do folículo primordial, o contato direto célula-a-célula prevalece como a forma de interação, enquanto, logo que o folículo torna-se mais complexo e barreiras físicas são criadas entre as células, sistemas adicionais são implantados para garantir a comunicação celular (COTICCHIO et al., 2015).

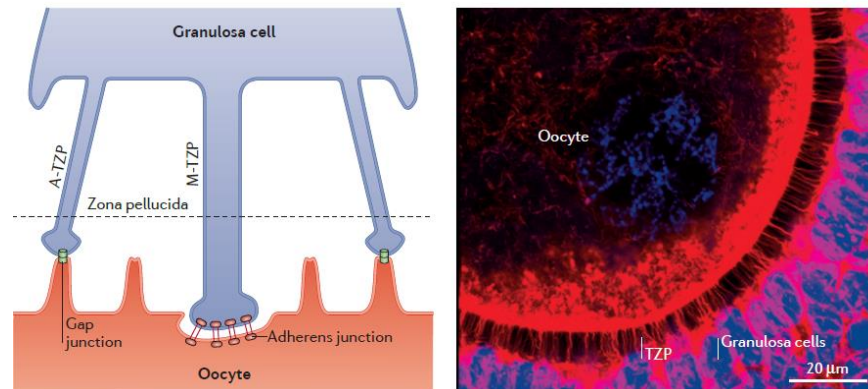
Cinco tipos de interações são reconhecidas na regulação somática-germinal: contatos diretos mediando sinais na ausência de junções intercelulares; as típicas interações ligante-receptor, que podem ser via receptor tirosina-quinases; as vias de sinalização parácrina; as junções *gap*; e outros contatos por junção através de projeções transzonais (TZP) (MCGINNIS; LIMBACK; ALBERTINI, 2013). A comunicação via parácrina e junções comunicantes são as mais estudadas (MORI; AMANO; SHIMIZU, 2000; ALBERTINI et al., 2001; ATEF et al., 2005; WIGGLESWORTH et al., 2013).

A regulação parácrina está ativa durante toda a oogênese e também desempenha um papel importante durante a maturação. Essa regulação é importante porque as células da granulosa e do cumulus secretam uma variedade de fatores de crescimento que irão agir no desenvolvimento oocitário de forma parácrina, ao mesmo tempo em que os oócitos secretam fatores importantes para o desenvolvimento folicular. Exemplo típico de ação parácrina são os fatores de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e semelhante a insulina (IGF). Estes agentes estão profundamente envolvidos nas vias de regulação entre as células da granulosa e o oócito durante toda a oogênese e foliculogênese, incluindo a fase de maturação oocitária (SILVA; LEITÃO; BRITO, 2009).

A presença de uma zona de pelúcida espessa atrapalha claramente o extensivo contato entre oócito e as células do cumulus. Portanto, a interação física entre essas células ocorre através de projeções finas, as TZP's, que partem das células do cumulus e se estendem através de toda a zona pelúcida, fazendo contato direto com o oolema, onde formam junções comunicantes à base de conexina (junções *gap* e aderentes) (ALBERTINI et al., 2001) (Figura 8). As TZP's fornecem a base estrutural para padrões mais complexos de comunicação

intercelular que surgem em fases posteriores do desenvolvimento folicular (CARABATSOS et al., 1998). TZP's aumentam em número e complexidade estrutural à medida que prossegue o crescimento do oócito (LI; ALBERTINI, 2013). Como a evolução da complexidade das TZP's, o córtex do oócito em crescimento adquire microvilosidades, e o número de junções *gap* e aderentes aumentam a medida que o volume do oócito cresce.

Figura 8 - Imagem esquemática e de microscopia das projeções transzonais (TZP's). Essas projeções partem das células da granulosa e atravessam a zona pelúcida formando as junções aderentes em invaginações profundas na superfície do oócito, e/ou junções *gap* (comunicantes) na membrana do oócito. TZP pode ser rico em F-actina (A-TZP), ou eles são compostos principalmente de microtúbulos (M-TZP).



Fonte: Adaptado de Lie Albertini (2013)

Essas junções comunicantes conectam diretamente os compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas, permitindo uma rápida troca de íons e metabólitos de até 1kD de tamanho, como segundos-mensageiros e pequenas moléculas importantes para a comunicação intercelular e para respostas coordenadas (KIDDER; MHAWI, 2002). De acordo com esses autores, a unidade fundamental dessas junções é o conexina, uma estrutura cilíndrica que forma um hemicanal na membrana plasmática.

O processo de maturação oocitária é suportada por diversas formas da interação entre o oócito e células do cumulus, sendo essa comunicação essencial para o correto desenvolvimento oocitário. De forma geral, as células do cumulus exercem funções fundamentais para o correto desenvolvimento da maturação oocitária, uma vez que elas são responsáveis por manter o oócito paralisado na primeira meiose (MADGWICK; JONES, 2007), por participar na indução da meiose através da realização do sinal LH (NORRIS et al., 2008), e



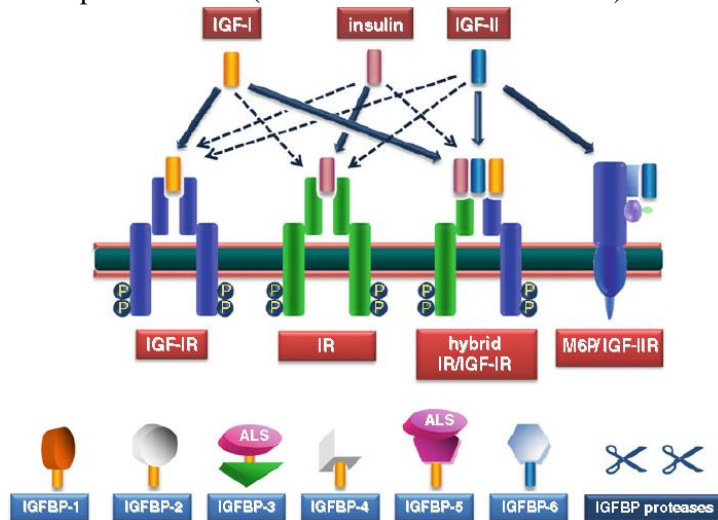
também por serem responsáveis pela maturação citoplasmática adequada do oócito (MAO et al., 2014). Entre as vias de comunicação, as TZP's são particularmente importantes, não apenas para a sua função e regulação, mas também porque a preservação da sua delicada estrutura, a qual envolve projeções celulares extremamente finas que se estendem por vários micrômetros de comprimento, pode ser comprometida pela manipulação *in vitro*.

#### **2.4 Sistema Fator de Crescimento Semelhante à insulina (Sistema IGF)**

O sistema de fator de crescimento de insulina (IGF) compreende a família de peptídeos envolvida no crescimento, desenvolvimento e metabolismo celular, bem como em processos celulares como proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação (LAVIOLA; NATALICCHIO; GIORGINO, 2007; ANNUNZIATA; GRANATA; GHIGO, 2011; YAKAR; ADAMO, 2012; BACH, 2015). Entretanto observa-se que os integrantes desse sistema também estão associados na mediação de algumas enfermidades, como na ocorrência de neoplasias (KHANDWALA et al., 2000; DENDULURI, S. K. et al., 2015) e diabetes (ANEKE et al., 2015; ZHU et al., 2016)

Essa família é composta por dois ligantes (IGF-I, IGF-II), três receptores de superfície celular que medeiam os efeitos biológicos dos IGFs, incluindo o receptor de IGF-I (IGF-IR), o receptor de IGF-II (IGF-IIR) e o receptor de insulina (IR), bem como seis proteínas de ligação (IGFBP-1 a 6) e suas proteases (LEROITH; ROBERTS, 2003) (Figura 9).

Figura 9 - Sistema de fator de crescimento semelhante à insulina. O sistema de IGF compreende os ligantes (IGF-I e IGF-II), sendo que a insulina pode participar do sistema devido a similaridade, os seus receptores (receptor de IGF-I, IGF-IR; receptor de insulina, IR; receptor híbrido IR/IGF-IR híbrido e o receptor de manose 6-fosfato/ IGF-II, M6P/IGF-IIR), seis proteínas de ligação de IGF (IGFBPs) e suas proteases. As setas completas e as setas pontilhadas indicam alta e baixa afinidade do ligante com o receptor, respectivamente. (ALS = subunidade ácido-lábil)



Fonte: Adaptado de Annunziata; Granatae Ghigo (2011)

#### 2.4.1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), principal componente do sistema IGF, foi primeiramente identificado por Salmone Daughaday (1957) como sendo um fator sérico induzido pelo hormônio do crescimento (GH), o qual mediava à ação desse hormônio no processo de sulfatação da cartilagem, assim como no processo do crescimento ósseo longitudinal. Dessa maneira foi inicialmente denominado de agente surfactante.

Entretanto, pesquisas posteriores observaram que esse fator era mediador da ação do GH em vários tecidos alvos (DAUGHADAY et al., 1972), e que apresentava ação semelhante à insulina, mas sua atividade não podia ser suprimida pela adição de anticorpos anti-insulina (FROESCH et al., 1963).

Além dos efeitos metabólicos semelhantes da insulina, observou-se que o IGF-I apresentava efeitos promotores do crescimento celular. Portanto, em 1987, essa substância foi denominada "fator de crescimento semelhante à insulina", devido a sua estreita homologia com a insulina, e ao fato de que seus efeitos no crescimento das células e dos tecidos predominavam em relação aos efeitos metabólicos (DAUGHADAY et al., 1987).

O gene codificador do IGF-I apresenta uma estrutura complexa com múltiplos sítios promotores compostos por seis exons, dos quais quatro estão sujeitos ao splicing alternativo, podendo alterar a estrutura final do peptídeo maduro (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989). A expressão do IGF-I é, portanto, finamente regulada pelo nível de transcrição e tradução gênica, sendo que o produto final desse processo é um precursor proteico o qual necessita passar por reações proteolíticas em ambas extremidades, para formar o IGF-I maduro. A molécula ativa de IGF-I é um polipeptídeo cadeia simples de 7,5 kDa com 70 aminoácidos, ligados por três ligações dissulfeto (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989). Essa estrutura final do IGF-I apresenta alto grau de homologia com a insulina, tendo 48% de correspondência da cadeia aminoacídica, ligações dissulfeto idênticas e estrutura terciária similar (ANNUNZIATA; GRANATA; GHIGO, 2011).

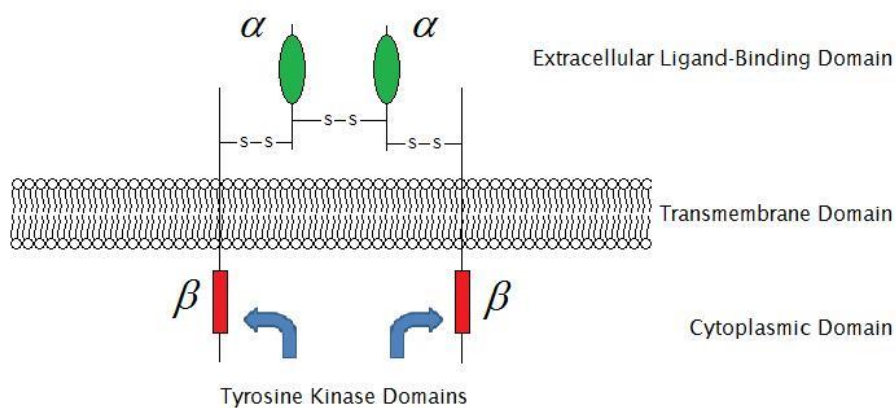
IGF-I atua tanto de forma autócrina/parácrina, como de maneira endócrina, já que pode ser secretado na corrente sanguínea e agir em tecidos distantes. Apesar do IGF-I ser ubiquamente produzido, os hepatócitos são as maiores fontes de secreção desse fator de crescimento, produzindo 75% do IGF-I presente no soro (ADAMO; NEUENSCHWANDER; LEROITH, 1993). No fígado a expressão do gene do IGF-I é regulada principalmente pelo GH, sendo que a quantidade de IGF-I no plasma realizará feedback negativo sobre a secreção hipofisária desse hormônio (FRYSTYK; SKJAERBAEK; DINESEN, 1994). De acordo com os mesmos autores, a regulação extra-hepática da expressão de IGF-I também depende do GH, mas é principalmente regulada por fatores específicos produzidos por esses tecidos.

A biodisponibilidade sérica do IGF-I é modulada por suas proteínas de ligação (IGFBP's), as quais facilitam a estabilidade desse fator no plasma e nas matrizes extracelulares, sendo que somente 5% do IGF-I são encontrados livres no sangue (MOHAN; BAYLINK, 2002). Nos tecidos alvos, as IGFBP's podem tanto reduzir como facilitar a bioatividade do IGF-I. Isso ocorre devido à alta afinidade que proteínas de ligação têm com o IGF-I, que chega a ser superior a afinidade entre IGF-I e seu receptor (YAKAR; ADAMO, 2012). Entretanto, as IGFBP's podem atuar como reservatórios de liberação lenta de IGF-I, permitindo uma ação prolongada desse fator no seu tecido alvo.

### 2.4.1.1 Receptores de IGF-I (IGF-IR)

Os efeitos do IGF-I sobre a resposta celular são mediados pelo receptor tipo 1 do IGF (IGF-IR), o qual transmite sinais mitogênicos e de sobrevivência celular através de uma rede complexa de sinalização intracelular. O IGF-IR é uma proteína hetero-tetramérica composta por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares, as quais contêm o sítio de ligação do IGF rico em cisteína, e duas subunidades  $\beta$  transmembranas e intracelulares, ligadas por uma ligação dissulfeto, que apresentam atividade tirosina quinase intrínsecas (LAVIOLA; NATALICCHIO; GIORGINO, 2007; SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009) (Figura 10).

Figura 10 - Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I)

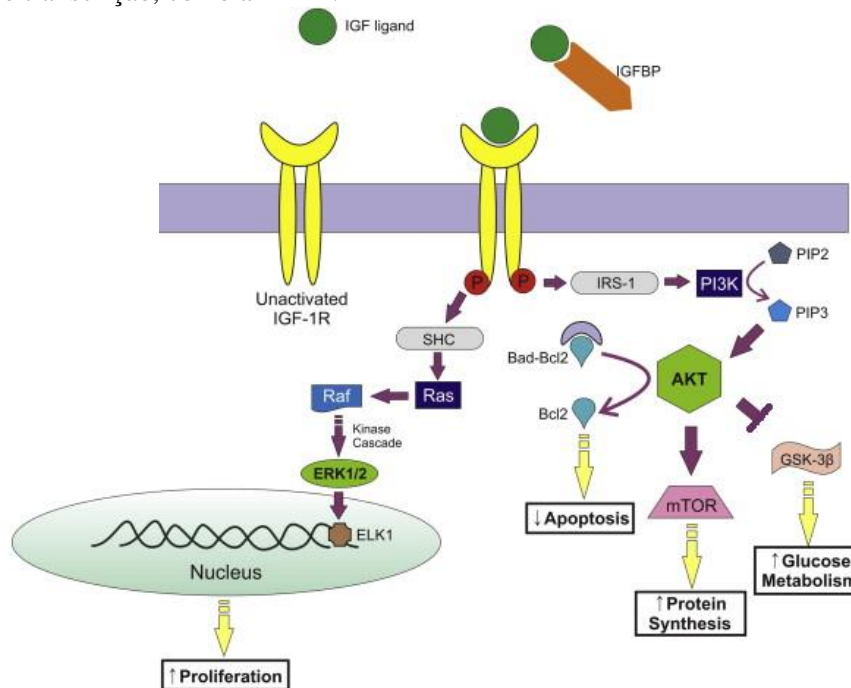


Fonte: Adams et al. (2000)

A ligação do IGF-I ao seu receptor desencadeia a transmissão de sinais, a qual se inicia com a autofosforilação dos sítios de tirosinas presentes na parte intracelular da subunidade  $\beta$ . Os radicais de tirosinas fosforilados no receptor servem como sítios de acoplamento para vários substratos, incluindo os substratos do receptor de insulina (IRS) 1 a 4 e a proteína Shc (Src homolog de colágeno), os quais iniciaram a cascata de fosforilação intracelular de formas distintas (LAVIOLA; NATALICCHIO; GIORGINO, 2007; YAKAR; ADAMO, 2012) (Figura 11).

IRS-1 fosforilado gera a ativação da proteína p58, que é a unidade regulatória da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), levando a um subsequente aumento na fosforilação de fosfolipídios ligados a membrana, como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (ANNUNZIATA; GRANATA; GHIGO, 2011). Essas moléculas, por consequência, recrutam e ativam quinases dependentes de fosfoinosítídeos (PDK's), as quais fosforilam e ativam outras proteínas quinases, incluindo a AKT (proteína quinase B), p70rsk e proteína quinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ).

Figura 11 - Esquema da sinalização do IGF e principais efeitos a jusante. A ativação do IGF-1R pode resultar em sinalização através de duas vias: PI3K / AKT e Ras / MAPK. A PI3K / AKT resulta em diminuição da apoptose, aumento da síntese de proteínas e aumento do metabolismo da glicose. Ras / MAPK contém uma cascata elaborada de quinase que, em última análise, leva ao aumento da proliferação celular, promovendo a atividade de fatores de transcrição, como a ELK1.



Fonte: Denduluri, Sahitya K. et al. (2015)

A AKT pode atuar através de três efetores de sinalização intracelular: (1) complexo mTOR-1 (Mammalian Target of Rapamycin-1/Proteína alvo de rapamicina em mamíferos-1); (2) fatores de transcrição (FOXO); e (3) glicogênio quinase 3 (GSK3). Ativação do complexo mTOR-1 desencadeia um importante papel no crescimento e sobrevivência celular através da

estimulação da captura de nutrientes (aumenta influxo de glicose para a célula), da produção de glicogênio, e da síntese proteica (FINLAY; CANTRELL, 2010). Diferentemente, a AKT induz fosforilações inibitórias nas proteínas FOXO, as quais são responsáveis por promover a paralização do ciclo celular, apoptose, estresse oxidativo e ativação de enzimas gliconeogênicas (LEGER et al., 2006). Portanto, essa inibição está associada aos efeitos antiapoptóticos e de proliferação, sobrevivência e hipertrofia celular, gerados pelo IGF-I. Da mesma maneira o IGF-I inibe a via da GSK-3, proteína quinase responsável por estimular a gliconeogênese, acentuando os efeitos hipertróficos desse fator de crescimento (LEGER et al., 2006). Além dessas três principais vias de sinalização intracelular, a AKT também pode auxiliar na sobrevivência celular através da inativação de proteínas apoptóticas, como Bad e caspase 9, e do aumento na expressão de proteínas antiapoptóticas, incluindo a Bcl-2, Bcl-x e NK- $\kappa$  $\beta$  (KOOIJMAN, 2006).

Outra via da sinalização ativada por IGF-I é através da cascata de sinalização celular das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógeno), as quais atuam sobre as atividades mitogênicas e transcricionais da célula. Essa via inicia-se com a fosforilação tanto do IRS-I quanto do domínio Shc do fator *Sos*, proteína que troca GDP por GTP da Ras, ativando-a (RIEDEMANN; MACAULAY, 2006). Essa cascata de sinalização ativa a proteína serina quinase Raf e as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), as quais estão relacionadas com a atividade transcricional da célula, estimulando a síntese de fatores de transcrição (HAN et al., 1994).

#### **2.4.1.2 IGF-I e função ovariana**

A função ovariana, assim como o crescimento e diferenciação folicular, é controlada pelas gonadotrofinas hipofisárias, LH e FSH, e por fatores autócrinos e parácrinos, como os esteroides e fatores de crescimento. Nesse contexto, o papel dos fatores de crescimento no desenvolvimento folicular, incluindo o IGF-I, vem sendo extensivamente estudado, uma vez que esse promove o crescimento e diferenciação das células da granulosa, o desenvolvimento de folículos pré-antrais, e a formação de folículos antrais (Mao et al. 2004).

IGF-I atua sobre a fertilidade em diferentes níveis dentro do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. No hipotálamo e hipófise, o IGF-I regula a secreção de GnRH, LH e

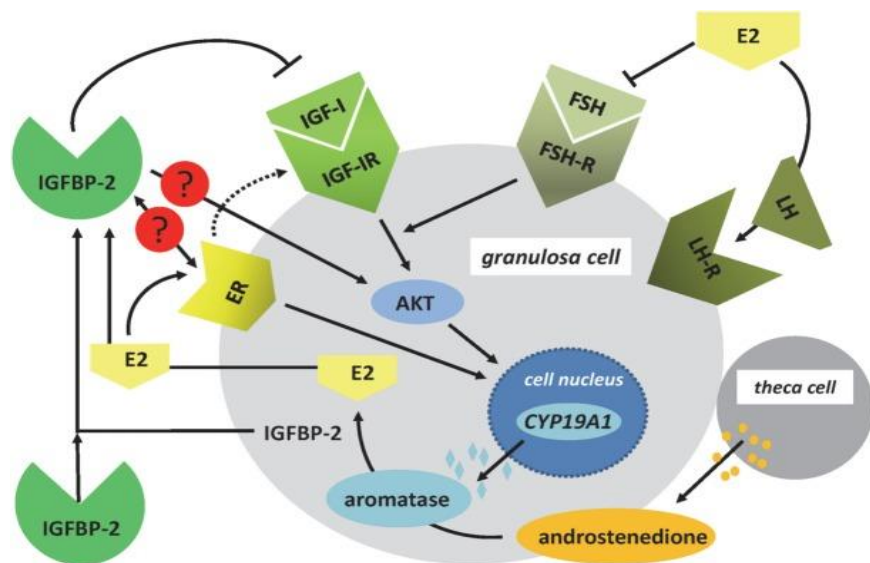
prolactina (HIKAKE et al., 2009; HARA et al., 2012). Nas gônadas, receptores para o IGF-I já foram encontrados em células da granulosa (CG) de suínos (QUESNEL, 1999; GE et al., 2000), bovinos (REBOUCAS et al., 2014; RAWAN et al., 2015), ovinos (HASTIE; HARESIGN, 2006) e roedores (ZHAO et al., 2002), o qual modula a ação do IGF-I sobre a regulação da proliferação, diferenciação e esteroidogênese das células somáticas foliculares (TOORI et al., 2014). Consequentemente, camundongos knockout para receptor gonadal de IGF-I têm gônadas hipoplásicas, resultando em ciclos anovulatórios em fêmeas e atraso no desenvolvimento testicular em machos (BAKER et al., 1996).

Além da presença de receptores nos ovários, estudos em bovinos e equinos encontraram IGF-I no fluido folicular de folículos em crescimento (Santiago et al. 2005, Spicer et al. 2005). Ao analisar as concentrações livres desse hormônio, ambos os trabalhos observaram que a concentração de IGF-I no fluido folicular aumenta durante o crescimento folicular, sendo que as maiores concentrações são encontradas nos folículos pré-ovulatórios. Em suínos, Oberlender, G.; Murgas, L. D.; Pontelo, T. P.; et al. (2013) mensuraram a quantidade de IGF-I no fluido folicular e no sangue de fêmeas pré-pubescentes. De acordo com os resultados obtidos, esses autores observaram uma concentração média de  $120 \text{ ng.mL}^{-1}$  de IGF-I livre no fluido folicular de folículos antrais, a qual foi superior as concentração sanguíneas desse hormônio ( $70 \text{ ng.ml}^{-1}$ ).

A ação do IGF-I sobre o crescimento e desenvolvimento folicular é basicamente mediada pela regulação da esteroidogênese, induzida pela FSH, e pelo aumento da produção de progesterona e andrógeno (Spicer & Echterkamp, 1995). Ausência do IGF-I durante o crescimento folicular não afeta o recrutamento dos folículos primordiais, porém estagna o crescimento dos folículos no estágio pré-antral, devido a uma diminuição na expressão do receptor de FSH (FSHR) e na ação do mesmo (BAKER et al., 1996). Nas células da granulosa, a sinalização do receptor de IGF-I é necessária para que ocorra o efeito positivo do FSH na expressão da enzima aromatase (CYP19A1) através da via da AKT (Figura 12), já que a maturação oocitária na presença de inibidor da atividade do IGF1R demonstra que o FSH é incapaz de estimular a expressão de genes esteroidogênicos e a produção do  $17\beta$ -estradiol, que são essenciais para o funcionamento adequado das células da granulosa pré-ovulatórias (BAUMGARTEN et al., 2014). Portanto, a diferenciação entre folículo pré-antral e

antral requer atividade de IGF-IR com subsequente ativação de AKT que permitirá a expressão de genes esteroidegênicos induzidos pelo FSH. Baseado nisso, Mao et al. (2004) demonstraram que o IGF-I sustentou o crescimento folicular pré-antral contribuindo na formação do antro folicular, e suprimiu e estimulou a apoptose e a proliferação das células da granulosa, respectivamente.

Figura 12 - Regulação da síntese de E2 no folículo ovariano. Nas células da granulosa, a expressão do CYP19A1 é regulada pela sinalização de FSH e ER. Os efeitos do FSH na expressão do gene CYP19A1 são mediados pela sinalização do IGF-IR e pela AKT. A sinalização do ER também pode estar relacionada com as vias do IGF-IR. Além disso, o ER tem efeitos diretos sobre a expressão do gene CYP19A1 dentro do núcleo da célula. A androstenodiona, produzida pelas células da teca, é usada como substrato para a aromatase produzir E2. Em células da granulosa, a IGFBP-2 é regulada por E2, e a IGFBP-2 tem mostrado bloquear a produção de E2 dependente de FSH. Níveis aumentados de E2 bloqueiam a expressão de FSH e induzem o aumento de LH. (AKT, proteína quinase B; CYP19A1: aromatase; E2, 17beta-estradiol; ER, receptor de estrogênio; FSH, hormônio folículo-estimulante, IGF-IR, receptor de IGF-I, LH, hormônio luteinizante).



Fonte: (SPITSCHAK; HOEFLICH, 2018)

Além da importância do crescimento folicular, o IGF-I também está envolvido diretamente no processo de maturação oocitária. Como revisado anteriormente, o oócito se mantém parado em prófase I até o pico pré-ovulatório de LH, quando alterações evidentes na morfologia das células do *cumulus* ocorrem. Como resultado da ação do LH, as junções gap



entre oócito e células granulares reduzem significativamente, permitindo a retomada da meiose, o rearranjo do citoesqueleto das células do cumulus, e a síntese de matriz extracelular enriquecida com ácido hialurônico, a qual é depositada em espaços extracelulares, levando ao processo de expansão (EPPIG, 1979; SUTOVSKY et al., 1993; NEMCOVA et al., 2007). Em condições *in vitro*, a síntese do ácido hialurônico é estimulada pelo FSH via ativação da PKA dependente de AMPc (EPPIG, 1979), sendo que, assim como no desenvolvimento folicular, esse processo realizado pelo FSH depende da ativação simultânea do IGF1R e do seu principal alvo, a AKT (BAUMGARTEN et al., 2014), comprovando a importância do IGF-I nesse processo.

Tendo em mente as funções do IGF-I na reprodução da fêmea, seus efeitos ovarianos e sua presença no fluido folicular, estudos têm sido conduzidos usando sua adição aos meios de maturação (IVM) e produção *in vitro* (IVP) de embriões em suínos (XIA; TEKPEY; ARMSTRONG, 1994; CUI et al., 2005; KIM et al., 2006; OBERLENDER, G.; MURGAS, L. D.; ZANGERONIMO, M. G.; et al., 2013; WASIELAK et al., 2013), bovinos (BLOCK et al., 2008; ISPADA et al., 2011; MEIYU; LIU; ROTH, 2015; ARAT et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016; ASCARI et al., 2017) e equinos (PEREIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). De forma geral, a suplementação de meios de maturação oocitária e cultivo embrionário com IGF-I estimula a maturação oocitária e promove o desenvolvimento de blastocistos (Kocyigit e Cevik, 2015; Pan et al., 2015; Arat et al. 2016, Chen et al., 2017). Em suínos, embora tenha sido relatado que o IGF-I promove a síntese de ácido hialurônico e a expansão de células do cumulus (Nemcova et al., 2007), seu papel na MIV permanece incerto e tem dado resultados inconsistentes. Oberlender, Guilherme et al. (2013), para avaliar os efeitos do IGF-I sobre as taxas de maturação *in vitro* de oócitos suínos, dividiu os oócitos aspirados em dois grupos, (1) oócitos provenientes de pequenos folículos (2-4mm), e (2) oócitos provenientes de grandes folículos (5-8mm), e os submetem a MIV na presença de 100ng/ml de IGF-I. Os autores observaram que a adição de IGF-I ao meio IVM aumentou as taxas de maturação de folículos pequenos, ao passo que, o IGF-I não teve efeito sobre esse parâmetro nos oócitos provenientes de grandes folículos. Esses dados indicam que, durante o crescimento folicular, mudanças cruciais para a maturação dos oócitos ocorrem nas células do cumulus e nos fatores

presentes no fluido folicular, sendo que a capacidade de desenvolvimento oocitário esta diretamente relacionada ao estágio folicular, o que pode influenciar os resultados.

Além da ação sobre a maturação, vários estudos relatam que a adição de IGF-I nos meios de MIV e CIV diminui a apoptose em oócitos bovinos (WASIELAK; BOGACKI, 2007; RODRIGUES et al., 2016; ASCARI et al., 2017) e em blastocistos suínos (WASIELAK et al., 2013). Finalmente, além de reduzir a apoptose, estudos *in vitro* também demonstram que o IGF-I também aumenta a expressão da proteína de ligação ao RNA induzível pelo frio, que protege as células do estresse térmico (PAN et al., 2015).

## 2.5 Criopreservação

A criopreservação é o processo pelo qual células, tecidos e embriões são armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C) por tempo indeterminado. Essa técnica tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células e tecidos possam ser conservados por longos períodos, possibilitando a retomada do seu desenvolvimento normal após o reaquecimento. Isso é possível porque, na temperatura criogênica, todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares, estão suspensas, sendo que, teoricamente, uma célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente (SHEIKHI et al., 2011). Entretanto, durante a redução da temperatura, ocorrem alterações físicas e químicas nas estruturas celulares, que podem vir a inviabilizar o processo. Portanto, o sucesso dessa técnica depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis.

Para compreender os efeitos das temperaturas muito baixas sob as células e tecidos, deve-se reconhecer que muitas estruturas e processos celulares dependem da temperatura e, conseqüentemente, a refrigeração gera condições que estão muito distantes da fisiologia celular normal (PEGG, 2007). De forma geral, os efeitos biológicos do congelamento são definidos pela taxa de congelamento da água, a qual determinará a quantidade de gelo formado e a concentração final dos solutos que permaneceram dissolvidos na fase líquida remanescente. Dessa forma, a lesão celular decorrente do congelamento da água pode ocorrer de forma direta, pelas injúrias mecânicas devido à formação de cristais de gelo, como também pelos efeitos secundários oriundos das alterações na composição da fase líquida, lesões osmóticas.

Medidas que minimizem os danos gerados pela criopreservação estão diretamente relacionadas com as taxas de formação de gelo e com o controle da osmolaridade intracelular. Para atingir esse objetivo, é necessário remover o máximo possível de água das células antes de se proceder com a sua congelação, pois se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão no meio intracelular, lesionando severamente a estrutura celular (PEGG, 2007). No entanto, deve-se tomar cuidado com a desidratação celular, pois a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (FAHY; WOWK, 2015).

A desidratação celular é desencadeada basicamente pela adição de crioprotetores não permeáveis a célula no meio de congelamento, os quais geram uma pressão osmótica no meio extracelular, fazendo com que a água saia das células na tentativa de manutenção do equilíbrio osmótico. Dessa forma, como haverá pouca água no citoplasma, essa não irá resfriar abaixo do seu ponto de congelamento, e todo o gelo formado estará no meio extracelular. Além da pressão osmótica, a taxa de transporte água através da membrana celular também é dependente da taxa de redução da temperatura. Taxas elevadas de resfriamento gera um ineficiente transporte de água para fora da célula, predispondo a célula a congelar internamente (MAZUR; RALL; LEIBO, 1984). Por outro lado, se a velocidade de congelamento for muito lenta, a desidratação ocorrerá de forma exacerbada levando ao “efeito solução”, sendo que, nessa situação, os componentes celulares precipitam, comprometendo funções biológicas de enzimas e proteínas (SZÉLL; SHELTON, 1986). Portanto, o ideal para processos de congelamento seria um método capaz de evitar a formação de cristais de gelo sem causar o efeito solução (MAZUR; RALL; LEIBO, 1984).

Além dos crioprotetores extracelulares, há aqueles com capacidade de ultrapassar a membrana celular, e agirem no interior da célula. Essas substâncias atuam protegendo as organelas e estabilizando membranas durante o congelamento (DOBRINSKY et al., 2000). Os crioprotetores permeáveis mais comumente utilizados para a criopreservação de oócitos são o etilenoglicol (EG), glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol (PG), e acetamida. A escolha do crioprotetor dependerá da sua permeabilidade e toxicidade para a célula que será congelada, sendo que o etilenoglicol tem sido relatado como o melhor crioprotetor para oócitos suínos, principalmente devido a sua elevada permeabilidade e baixa toxicidade (WU et al., 2006).

### 2.5.1 Congelamento de oócitos

A criopreservação oocitária pode ser importante para a aplicação das outras tecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões, engenharia genética, e transferência nuclear (GUPTA; UHM; LEE, 2007). Tentativas para criopreservação de oócitos de muitas espécies de mamíferos têm sido relatadas, mas as taxas de fertilidade e de desenvolvimento posteriores foram muito menores do que aquelas obtidas para oócitos frescos (NOHALEZ et al., 2015).

O oócito é uma das maiores células dos mamíferos e, por este motivo, é caracterizada por uma baixa relação entre superfície e volume. Isto certamente tem um impacto sobre os resultados de criopreservação, considerando que o transporte de água e a penetração de crioprotetores através da membrana plasmática são pontos críticos para a desidratação do meio intracelular, e, então, para a redução da formação de gelo intracelular e controle do estresse osmótico (COTICCHIO et al., 2004). Outra barreira à circulação de água e dos crioprotetores para dentro e para fora do oócito é a zona pelúcida, camada glicoproteica que envolve todo o oócito. Além da barreira mecânica da zona pelúcida, o processo de congelamento oocitário suíno desencadeia a prematura liberação dos grânulos corticais, os quais levarão ao endurecimento da zona pelúcida, tornando a penetração espermática e a fertilização impossível (ROJAS et al., 2004; WU et al., 2006).

Outro obstáculo ao congelamento é a presença de um grande número de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas nos oócitos, pois os lipídios reduzem a criotolerância celular e causam danos irreversíveis à estrutura da membrana (NAGASHIMA et al., 1999; GUPTA; UHM; LEE, 2007). Em comparação com outras espécies domésticas, o oócito suíno apresenta alto teor de lipídios intracelular, tornando-o mais susceptível ao armazenamento em baixa temperatura, com consequente diminuição da taxa de sobrevivência e progressão apoptótica após o descongelamento (GALEATI et al., 2011; VALLORANI et al., 2012). Avaliando a quantidade de ácidos graxos em oócitos imaturos, oócitos suínos apresentam duas vezes mais lipídios em comparação aos oócitos bovinos, e três vezes mais que em oócitos da espécie ovina (MCEVOY et al., 2000).

Devido a essas limitações, oócitos de mamíferos, principalmente de suínos, continuam sendo um dos tipos de células mais difíceis de criopreservar, sendo que o baixo sucesso dessa técnica é decorrente da sua elevada sensibilidade ao resfriamento (ROJAS et al., 2004). As principais alterações celulares desencadeadas pelo resfriamento são a exocitose prematura cortical, aumento da ativação partenogenética e danos aos elementos do citoesqueleto do oócito (WU et al., 2006). Quaisquer alterações a esses recursos terão repercussões sobre a fertilização normal e sobrevivência oocitária.

## **2.6 Vitrificação oocitária**

Há basicamente duas técnicas utilizadas para a criopreservação de oócitos, o congelamento lento e o ultrarrápido (Vitrificação). As tentativas iniciais para congelar oócitos utilizavam os mesmos métodos de congelação lenta que foram considerados como o padrão de ouro para a criopreservação de embriões. No entanto, congelamento lento oocitário não gerou taxas de sobrevivência e fertilização satisfatórias, sendo que, com o tempo, novos protocolos que priorizavam o aumento da taxa de resfriamento e da concentração de crioprotetores foram preconizados (EDGAR; GOOK, 2012).

Com a introdução e avanço das técnicas de vitrificação, houve uma melhoria significativa na eficácia da criopreservação de oócito (CHIAN; WANG; LI, 2014). Com relação aos oócitos suínos, o primeiro sucesso na criopreservação, isto é, a capacidade da célula em manter sua viabilidade e competência meiótica, foi conseguida através da técnica de solidificação vítrea por resfriamento ultrarrápido (vitrificação) na presença de concentrações elevadas de agentes crioprotetores.

O princípio da vitrificação consiste em submeter as células a altas taxas de resfriamento e altas concentrações de crioprotetores, com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares (KUWAYAMA et al., 2005). Dessa forma torna-se possível resfria-las, passando-as do estado líquido ao estado vítreo sem a formação de cristais de gelo. Assim, a vitrificação simplifica e melhora o processo de criopreservação, já que elimina a lesão mecânica dos cristais de gelo, além de eliminar a necessidade de encontrar taxas de resfriamento e aquecimento ideais, mas complica os efeitos osmóticos e tóxicos oriundo da alta adição e remoção de agentes crioprotetores (FAHY; WOWK, 2015).

O sucesso da vitrificação depende basicamente de três fatores: viscosidade do meio de congelamento; taxas de resfriamento; e volume de amostra (YAVIN; ARAV, 2007). A alteração da viscosidade é alcançada a partir da adição de crioprotetores ao meio de vitrificação. Mayer (1985) afirmou que, para água pura, seria necessário aplicar uma taxa de -10 milhões de graus por segundo a fim de conseguir transformar o líquido em vidro, ao passo que, para soluções de crioprotetores, a redução de 100-1000°C/min é suficiente para alcançar a vitrificação. Entretanto, tentar influenciar as propriedades da solução de vitrificação utilizando concentrações muito elevadas de agentes crioprotetores permeáveis não é aconselhável, pois essas substâncias tendem a ter efeitos tóxicos e hipertônicos quando utilizados em excesso (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Portanto, a seleção dos crioprotetores que serão utilizados deve ser criteriosa, observando sempre a sua permeabilidade e toxicidade. A combinação de diferentes crioprotetores é uma estratégia utilizada a fim de ultrapassar esta limitação (NOHALEZ et al., 2015). Os crioprotetores mais comumente utilizados para a criopreservação de oócitos suínos são EG, DMSO e PG. Entre eles, o etilenoglicol, o qual apresenta elevada permeabilidade e baixa toxicidade, tem sido demonstrado como o mais eficaz (WU et al., 2006).

Com relação ao volume da amostra, ao reduzi-la consegue-se diminuir a quantidade de líquido que tem que ser resfriado, e aumentar a taxa de resfriamento, reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo. A técnica "tamanho mínimo de gota" foi descrita pela primeira vez em 1992, quando foi definida como o volume mínimo em que pode ser mantido oócitos e embriões sem danos (ARAV et al., 2002). Os métodos de vitrificação de oócitos suínos consideram essa teoria, utilizando mínimas quantidades de amostras na criopreservação. Portanto, a fim de obter uma probabilidade máxima de vitrificação, todos esses fatores que afetam o processo devem ser cuidadosamente equilibrados.

A redução da temperatura não depende somente da taxa de resfriamento, mas também da metodologia de envase utilizada. Steponkus et al. (1990) observaram que quando a solução a ser vitrificada entra em contato direto com o nitrogênio líquido, sem o isolamento produzido pelas paredes de plástico das palhetas, a redução de temperatura ocorria de forma muito mais acentuada. Através dessa observação surgiu o conceito de metodologias abertas de vitrificação, nas quais as estruturas a serem vitrificadas ficam em contato direto com o

nitrogênio. Vale ressaltar que a chave para o sucesso destes métodos também depende dos demais fatores já descritos, sendo que é de extrema importância a redução da quantidade de meio de vitrificação em torno de um oócito, o que lhes permite passar rapidamente através de uma zona de temperatura crítica, na presença de um agente crioprotetor (VAJTA, 2000; ARAV et al., 2002).

Dentre as novas metodologias de vitrificação utilizadas em suínos, as técnicas de palhetas abertas e esticadas (open pulled straw - OPS), a cryotop, e a vitrificação em superfície sólida (solid surface vitrification - SSV), são as mais utilizadas. A técnica de open pulled straw (OPS) desenvolvida por Vajta et al. (1998), provocou um grande impacto no uso da vitrificação sendo uma técnica bastante utilizada para oócitos e embriões de várias espécies de mamíferos. Em suínos essa técnica vem sendo utilizada para a vitrificação de oócitos (ROJAS et al., 2004; MEN et al., 2006; LIU et al., 2008; MARCO-JIMÉNEZ; CASARES-CRESPO; VICENTE, 2014; DAI et al., 2015), entretanto as taxas de clivagem são em torno de 10% a partir de oócitos vitrificados.

A técnica da superfície sólida de vitrificação (SSV) foi desenvolvida na tentativa de reduzir ao máximo o efeito do isolamento térmico causado pelos dispositivos de plástico, uma vez que utiliza o metal como condutor de temperatura (DINNYES, 2000). Nesse método, os oócitos, junto à solução de crioprotetores, são depositados diretamente sobre uma superfície de metal pré-resfriada a  $-150^{\circ}\text{C}$ , a qual é posteriormente mergulhada em nitrogênio líquido.

Com base na teoria do volume mínimo, o mais recente método desenvolvido é o cryotop (Kuwayama et al., 2005). Esta técnica consiste de uma fina haste de polipropileno nas quais os oócitos são depositados em volumes mínimos ( $0,1 \mu\text{L}$ ). Uma vez que os oócitos estão colocados no Cryotop, quase toda a solução de carga é removida por aspiração antes da imersão direta em nitrogênio líquido, por isso esse volume reduzido. Portanto, a principal vantagem deste método é que a velocidade de resfriamento é rápida ( $-23000^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ), evitando assim as lesões pelo frio (KUWAYAMA et al., 2005). O volume extremamente pequeno também é útil para alcançar taxas de aquecimento ainda mais elevadas ( $-42000^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ), evitando assim a recristalização (GALEATI et al., 2011).

Outra vantagem do método é que, no Cryotop, as concentrações de crioprotetores permeáveis é reduzida para 30%, minimizando assim possíveis efeitos tóxicos (KUWAYAMA

et al., 2005). Liu et al. (2008) demonstraram que o dispositivo e as soluções Cryotop são mais eficientes do que os da técnica de OPS para a vitrificação de oócitos suínos, resultando em taxas relativamente elevadas de clivagem e blastocisto, após ativação partenogênica. Ao avaliar o método cryotop para vitrificação de oócitos suínos maturados, Vallorani et al. (2012) obtiveram 61,1% de oócitos viáveis após o reaquecimento.

### 2.6.1 Estágio Vitrificação

Já é descrito que oócitos suínos em diferentes estágios de meiose respondem diferentemente a criopreservação, ou seja, as fases meióticas de oócitos influenciam a capacidade de célula sobreviver ao resfriamento (ROJAS et al., 2004; ZHOU; LI, 2009; SOMFAI; KIKUCHI; NAGAI, 2012; NOHALEZ et al., 2015). Os oócitos passam por transições do status nuclear durante a maturação, sendo que as propriedades associadas com cada fase meiótica incluem o tamanho das células, a permeabilidade da membrana plasmática, a presença ou ausência de uma membrana nuclear, e a presença ou ausência de uma configuração de fuso e cromossomo (WU et al., 2013). Por isso, a fase do ciclo celular em que a célula se encontra durante a meiose e maturação afeta o resultado da criopreservação.

Oócitos em meiose II (MII) resistem melhor a danos da criopreservação, que os oócitos na fase de vesícula germinativa (VG) (ROJAS et al., 2004), apesar de que os oócitos imaturos apresentam menores sensibilidades microtubulares à refrigeração e não apresentam fuso meiótico (WU et al., 2006). No trabalho de Rojas et al. (2004), ao avaliar o efeito da vitrificação em oócitos imaturos e maturados *in vitro*, a taxa de clivagem dos oócitos foi de 10% para aos maturados, ao passo que os oócitos imaturos não tiveram nenhum desenvolvimento.

Esta sensibilidade à criopreservação dependente da fase de oócitos pode ser explicada pelas alterações estruturais na membrana celular durante a maturação, o que afeta a temperatura de transição de fase de lipídios da membrana, um fator determinante para a criotolerância de células (GHETLER et al., 2005). Além disso, oócitos imaturos apresentam menor permeabilidade aos crioprotetores, em comparação com oócitos maturados (NOHALEZ et al., 2015), o que pode resultar em baixas taxas de sobrevivência. Ao mesmo tempo, a presença de células do *cumulus* afeta a permeabilidade oocitária, diminuindo a eficácia dos



protocolos de vitrificação. Entretanto, a desnudação não é uma opção para a resolução deste problema, uma vez que as células do *cumulus* são importantes para a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos (ATEF et al., 2005).

De forma geral, oócitos em MII são tradicionalmente preferidos para vitrificação, mas, apesar da taxa de sobrevivência dos oócitos maturados *in vitro* após a vitrificação serem relativamente altas, a taxa de fertilização e a competência de desenvolvimento embrionário são seriamente comprometida (SOMFAI; KIKUCHI; NAGAI, 2012). Vitrificação de oócitos MII acarreta em falha na formação pronuclear masculina, além de induzir a partenogênese e reduzir os níveis de glutatona citoplasmáticos (SOMFAI et al., 2007). Em contraste, os oócitos vitrificados como complexos *cumulus-oophorus*, no estágio de vesícula germinal (VG), apresentam baixas taxas de sobrevivência, mas mantêm a capacidade de se submeter a fertilização normal, e, como não apresentam fuso meiótico, evita danos a essa estrutura (ISACHENKO et al., 1998; SOMFAI; KIKUCHI; NAGAI, 2012), a qual é a mais afetada na vitrificação de oócitos MII.

### 2.6.2 Principais crioinjúrias

As alterações relacionadas à estrutura oocitária, aos cromossomos e ao citoesqueleto, são as principais causas de insucesso da criopreservação de oócitos (WU et al., 2006; SHI et al., 2007; GALEATI et al., 2011). Isso ocorre porque o processo de criopreservação, incluindo a exposição aos crioprotetores, resulta em extrema desorganização dos fusos meióticos, levando ao comprometimento da fertilização e do crescimento de embriões (SHI et al., 2007). Os fusos meióticos são estruturas dinâmicas que consistem em micro túbulos, sendo que sua desorganização pode levar a dispersão cromossômica, aneuploidia ou poliploidia dos oócitos criopreservados (CHEN; YANG, 2009), além da falha de fertilização normal e de desenvolvimento embrionário. Vale ressaltar que a ruptura do citoesqueleto, ou seja, lesões no sistema microtubular, também pode conduzir à liberação prematura dos grânulos corticais e o endurecimento da zona pelúcida (GHETLER et al., 2006).

De forma geral, o processo de criopreservação reduz tanto a porcentagem de oócitos com fusos organizados, quanto a porcentagem de oócitos com cromossomos íntegros (WU et al., 2006). Galeati et al. (2011), ao avaliarem o efeito da vitrificação sobre oócitos maturados,

observaram que esse processo levou a um aumento significativo de fusos danificados e cromossomos deslocados a partir da placa metafásica e dispersos no citoplasma. Liu et al. (2003) observaram que a despolimerização do fuso começa após o resfriamento dos oócitos suínos a 24°C e a sua desmontagem completa ocorre quando os oócitos são resfriados para 4°C. Além disso, eles relataram que os danos ao fuso e ao cromossomo não são reversíveis através da incubação de oócitos após o aquecimento. Em seres humanos, o período de 1 a 3 horas de incubação após a descongelação tem demonstrado aumentar de forma significativa a taxa de fuso normal (CIOTTI et al., 2009). No entanto, com relação aos oócitos porcinos vitrificados, a taxa de fusos normais permaneceu baixa após 30 minutos de incubação pós-aquecimento (SHI et al., 2007). Galeati et al. (2011) também não observaram qualquer melhoria na organização do fuso meiótico e da distribuição cromossômica em oócitos examinados imediatamente após o aquecimento em comparação com aqueles incubados durante duas horas, sugerindo que a configuração normal do fuso não é restaurada durante a incubação, em oócitos suínos.

Com relação às características estruturais da célula oocitária, essa se liga intimamente com a zona pelúcida através de vilosidades projetadas pelas células do *cumulus* que atingem o oolema através de junções *gap*. As funções fisiológicas das junções *gap* no folículo são diversas, fornecendo suporte nutricional, transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito, as quais são responsáveis pela propagação dos sinais induzidos pela estimulação hormonal (ATEF et al., 2005). Desta maneira, a interação entre as células do *cumulus* e do oócito é imprescindível para o desenvolvimento oocitário e a obtenção de células viáveis para fertilização.

Entretanto, essas estruturas são afetadas pelo processo de vitrificação, foto esse responsável por uma das causas de redução da eficiência do processo. Wu et al. (2006) constataram que, após a vitrificação de oócitos suínos, essas células exibiram vários graus de lesões. As principais observações foram que as células do *cumulus* de alguns oócitos foram separadas do complexo *cumulus oophorus*, e a zona pelúcida adjacente foi rompida. Além disso, houve rupturas também nas junções comunicantes entre as células do *cumulus* e oócito, e muitas microvilosidades foram interrompidas, tiveram sua quantidade reduzida, ou desapareceram.

Várias outras estruturas oocitárias são lesionadas com o processo de congelamento celular, como as mitocôndrias, alterando o seu potencial de membrana (LEI et al., 2014) e, por consequência, o metabolismo energético celular (MOMOZAWA et al., 2013). O processo de criopreservação também pode gerar um aumento na produção de radicais livres (GUPTA; UHM; LEE, 2007), os quais, além de atingirem diretamente as estruturas celulares, podem ativar a cascata da apoptose (VALLORANI et al., 2012).

Dessa forma, melhorias nos protocolos de congelamento têm sido buscadas, na tentativa de aumentar a sobrevivência oocitária pós descongelamento, assim como melhoras taxas de fertilização e de clivagem. Nesse cenário a vitrificação oferece uma nova perspectiva em matéria de criopreservação de oócitos, com menos prejuízo para celulares que o congelamento lento (LEI et al., 2014).

## **2.7 Resposta oocitária frente ao estresse**

O desenvolvimento de gametas e embriões pode ser influenciado por uma ampla gama de estressores ambientais, os quais afetam até mesmo aos embriões de mamíferos que se desenvolvem no ambiente protegido do trato reprodutivo materno, sendo mais expressivo nas biotecnologias em reprodução assistida (LATHAM, 2016). Os tipos potenciais de estresse incluem os térmicos, osmóticos, oxidativos, restrição de nutrientes, pH, entre outros. O processo de *maturação in vitro* e vitrificação oocitária são considerados dois fatores estressantes, já que alteram diretamente o microambiente e o metabolismo celular.

As respostas celulares à maioria desses estressores convergem no retículo endoplasmático (ER), com a indução da resposta proteica, afetando diretamente a capacidade da célula de sintetizar, dobrar, transportar e realizar modificações pós-tradução das proteínas, ou alterar as características do retículo endoplasmático, por exemplo, teor de cálcio, oxidação lipídica, concentração de espécies reativas de oxigênio (YOON et al., 2014; HARADA et al., 2015; LATHAM, 2016). A ativação das vias de estresse leva ao desencadeamento das cascatas de apoptose, levando a degeneração celular.

No caso do cultivo *in vitro* e criopreservação de oócitos, além das características de pH e osmolaridade dos meios, fatores como o estresse térmico e oxidativo assumem grande importância. Portanto, é necessário que os oócitos submetidos a esses processos modulem as

respostas celulares, na tentativa de combater esses estressores, e evitar a ativação das vias de estresse.

### **2.7.1 Alteração na expressão gênica**

Nos últimos anos, foi demonstrado que a vitrificação altera a expressão gênica em oócitos e embriões. Em bovinos, Spricigo et al. (2017) observaram regulação positiva na expressão de genes relacionados ao estresse térmico (Hsp70), estresse oxidativo, (superóxido dismutase – SOD) e com o transporte de glicose (SLC2A1), em oócitos bovinos vitrificados às 2 h de pós-aquecimento. Diferentemente, os autores observarão uma redução na expressão do gene GPX, responsável pela síntese da glutathiona peroxidase, enzima importante no combate ao estresse oxidativo. De maneira semelhante, em outro estudo, oócitos bovinos vitrificados apresentaram regulação positiva genes próapoptóticos, proteína X associada a BCL2 (Bax), e regulação negativa de genes antiapoptóticos, como célula B/linfoma 2 tipo 1 (BCL2L1) (XUE-MING et al., 2016).

Apesar de haver vários trabalhos que avaliem a expressão gênica em oócitos e embriões vitrificados de outras espécies (TAN et al., 2013; TRAPPHOFF et al., 2016; XUE-MING et al., 2016; SPRICIGO et al., 2017; LI et al., 2018; SARAIVA et al., 2018), estudos avaliando oócitos e embriões suínos ainda são poucos. Diferentemente do que foi observado para bovinos, Dai et al. (2015) observaram regulação negativa do gene SOD, Bax e BCL2L1 em oócitos suínos vitrificados. Entretanto, ao avaliar a expressão dos genes apoptóticos e relacionados ao estresse oxidativo, (NIU et al., 2016) observarão que o processo de vitrificação de oócitos suínos diminuiu os níveis de transcrição das caspases 3,8,9, do TNF- $\alpha$ , e do gene Bax, mas aumentou a expressão dos genes Bcl-2 e SOD. Devido à divergência de resultados, é importante continuar conduzindo trabalhos que avaliem o efeito da vitrificação sobre a expressão gênica em oócitos suínos.

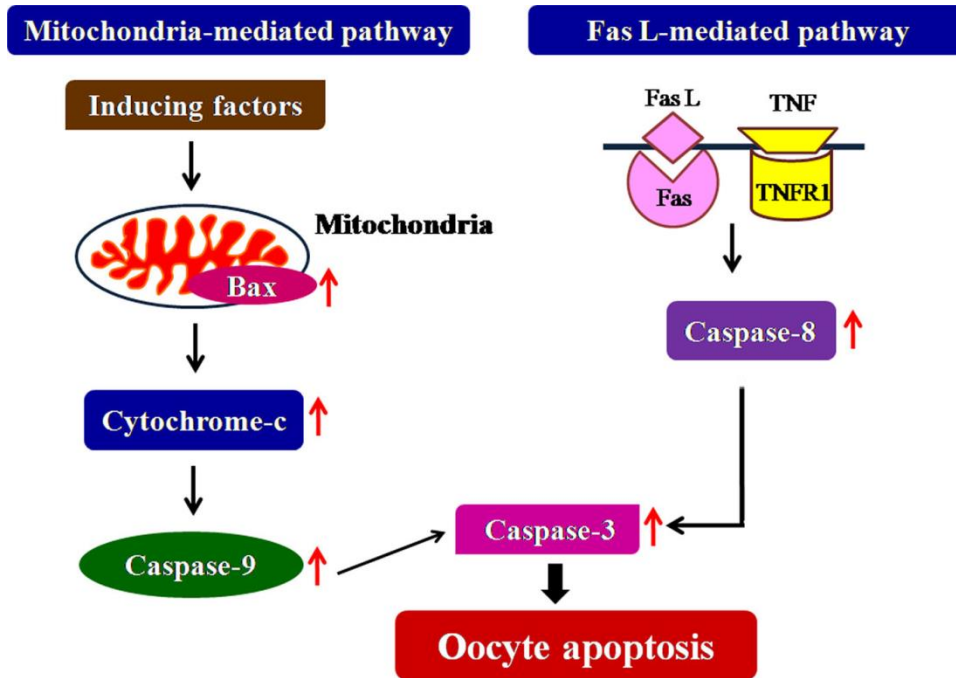
### **2.7.2 Apoptose celular**

A apoptose, denominada como morte celular programada, é um processo fisiológico e desempenha um papel importante na eliminação de células germinativas em todas as etapas da oogênese e mesmo após a ovulação (TIWARI et al., 2015). Mais de 99% das células

germinativas são eliminadas do ovário por apoptose através da atresia folicular, enquanto menos de 1% chegam ao estágio de ovogônia (ALBERTINI et al., 2001). Entretanto, fatores externos a fisiologia celular podem levar a alterações no metabolismo celular, considerados estressantes para a célula, podem desencadear o processo de apoptose, reduzindo a viabilidade celular.

A apoptose em oócitos envolve tanto vias mediadas pelas mitocôndrias (intrínseca) como vias relacionadas a receptores de superfície celular (extrínseca) (figura 13) (TIWARI et al., 2015). As vias intrínsecas de apoptose envolve alteração da dinâmica e potencial de membrana mitocondrial. Fatores envolvidos no estresse oxidativo e que levam a um aumento intracelular de íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) estimula a apoptose mediada por mitocôndrias em oócitos. O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induz a formação do íon peróxido que, juntamente com os radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo, afetam a relação de expressão de genes pro e antiapoptóticos (BAX:BCL2) na mitocôndria, alterando seu potencial de membrana (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000). A mudança no potencial da membrana mitocondrial desencadeia a liberação de citocromo c no citoplasma celular, o que levará a ativação das caspases intracelulares, enzimas responsáveis pela apoptose celular (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000; ZHANG et al., 2006). Já a via apoptótica extrínseca é iniciada pela ativação da família de receptores do fator de necrose tumoral (FAS e TNFR1) (TIWARI et al., 2015), a qual também ativará a via das caspases. A caspase 3, principal enzima apoptótica, é responsável pela clivagem das principais proteínas estruturais e reguladoras celular, resultando na fragmentação do DNA oocitário, uma característica marcante da apoptose (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000).

Figura 13 - Diagrama esquemático mostrando o envolvimento das mitocôndrias e receptores de membrana na via de apoptose em oócitos de mamíferos.



Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2015)

Vários fatores estressores podem desencadear a cascata de apoptose (figura 14), sendo que a privação oocitária de várias moléculas sinalizadoras, fatores de sobrevivência e fatores de crescimento oriundos das células da granulosa, assim como excesso de substâncias nocivas (ROS), desencadeiam a suscetibilidade de oócitos à apoptose (LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2000; ATEF et al., 2005). Um fator importante para a manutenção da homeostase oocitária é a comunicação cruzada entre as células da granulosa e os oócitos, a qual é essencial para a sobrevivência de ambos os tipos de célula (ATEF et al., 2005). Portanto, a apoptose da célula da granulosa e/ou a remoção prematura das células da granulosa circundantes privam o oócito dos fatores de crescimento, nutrientes e fatores de sobrevivência que podem levar à apoptose de oócitos cultivados *in vitro* (CHAUBE et al., 2005).

Figura 14 - Representação esquemática mostrando vários fatores que podem desencadear a apoptose de ovócitos, como a falha de comunicação entre oócito e células da granulosa, sinalização molécula ( $\text{Ca}^{2+}$ , AMPc e GMPc), fatores oxidantes ( $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{OH}^-$ ), fatores de sobrevivência, fatores pró-apoptóticos (Bax, citocromo c, caspases 8 e 9) e fatores apoptóticos (caspase 3 e fragmentação do DNA). Casp 3: Caspase 3; Frag DNA: Fragmentação de DNA, Cit c: Citocromo c; Casps 8, 9: Caspases 8 e 9



Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2015)

Adicionalmente, a relação entre fatores anti e próapoptóticos é importante para determinar a taxa de sobrevivência celular. Fatores que indiretamente impulsionam oócitos para iniciar a morte celular apoptótica são denominados fatores pró-apoptóticos, ao passo que os fatores apoptóticos estão diretamente envolvidos na ruptura da histoarquitetura celular, levando ao aparecimento de características apoptóticas morfológicas (TIWARI et al., 2015). Já os fatores antiapoptóticos tendem a inibir a via de inicialização da apoptose, protegendo a célula da morte programada. Em oócitos, a redução desses fatores, como o BCL2, leva ao aumento intracelular dos fatores próapoptóticos e apoptóticos, desencadeando a apoptose (CHAUBE et al., 2005). Portanto, a relação entre um promotor (como a expressão de Bax) e um supressor apoptótico (como a expressão de Bcl2) em uma célula determina se a mesma sofrerá apoptose ou sobreviverá (CHAUBE et al., 2005).

### 2.7.3 Proteínas do Choque térmico (heat shock proteins – HSP)

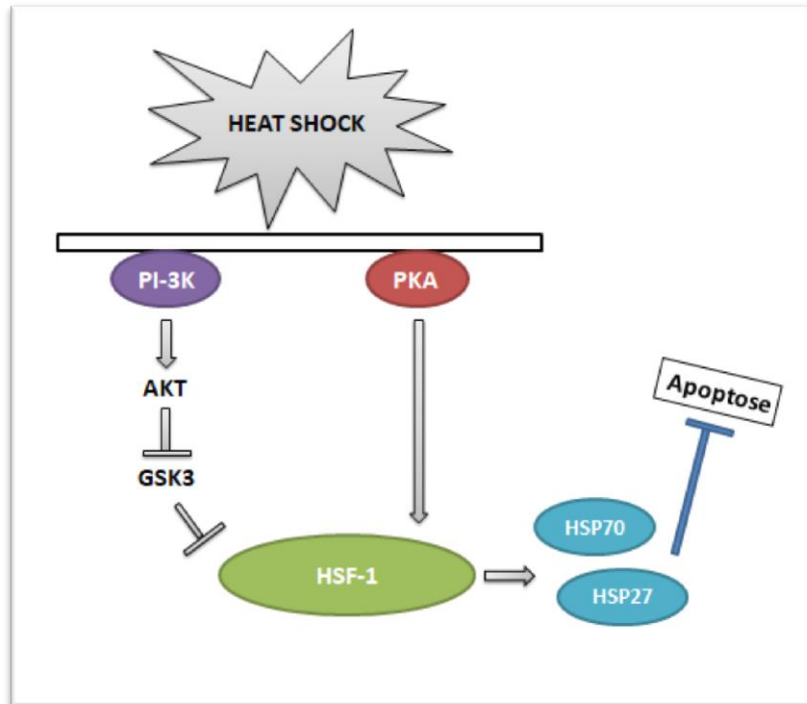
As proteínas de choque térmico (HSPs) desempenham um papel crítico na resposta celular a estímulos estressantes ambientais, incluindo o estresse oxidativo gerado durante a maturação e cultivo *in vitro* de oócitos e embriões (BERNARDINI et al., 2004), e o estresse térmico causado pelos processos de vitrificação/reaquecimento (CASTILLO-MARTIN et al., 2015). As HSPs são um conjunto de proteínas altamente conservadas sintetizadas em resposta ao estresse, que atuam como chaperonas moleculares, que inibem as alterações em proteínas decorrentes do estresse que levam à desnaturação, agregação e morte celular (CALDERWOOD et al., 2010). Além disso, HSPs têm outras propriedades desejáveis, incluindo a capacidade de antagonizar diretamente as vias de morte celular, incluindo a apoptose dependente de caspases (GARRIDO et al., 2006).

A resposta ao estresse térmico (heat shock response – HSR) é regulada a nível transcricional pelo fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1). Para isso, o HSF-1 liga-se aos promotores de todos os genes codificantes de HSP após o estresse, e desencadeia a regulação positiva da síntese de mRNA das HSPs (ZOU et al., 1998). Ainda não está claro qual seria o gatilho inicial para ativação do HSF-1, porém, uma das teorias propostas envolvem as próprias HSPs (CALDERWOOD et al., 2010). Garrido et al. (2006) demonstraram que células expostas ao estresse apresentam elevados níveis de HSP70 e HSP90, as quais são responsáveis pelo início da HSR e ativação da via do HSF-1. Além disso, o estresse térmico pode levar a ativação de uma série de proteínas quinases, as quais estão envolvidas na ativação do HSF-1 e consequentemente da HSR. Dentre essas vias, a indução da via da fosfatidilinositol-3 quinase esta envolvida na resposta ao estresse. O choque térmico ativa PI-3K levando ao acúmulo de fosfatidilinositol-1, 4-bisfosfato, fosfatidilinositol-1, 4, 5-trifosfato e ativação de PI-3K (CHU et al., 1996). A ativação de PI-3K leva à ativação da AKT que, embora não age diretamente sobre a fosforilação do HSF1, pode causar ativação indireta através da inibição da glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) (CHU et al., 1996). A GSK3 é um inibidor da HSF1 e sua inibição pela AKT pode promover a ativação da HSF1. Adicionalmente, a HSF1 é fortemente ativada pelo PKA dependente de AMP cíclico (CHOI et al., 1991). A ativação da HSR inclui a expressão da Hsp70 e a fosforilação da Hsp27 que



antagonizam os efeitos pró-apoptóticos das quinases do estresse e aumentam a sobrevivência celular (CALDERWOOD et al., 2010) (Figura 15).

Figura 15 - Imagem ilustrativa de duas cascatas de sinalização de quinase ativadas por choque térmico. PI-3K: fosfatidilinositol-3 quinase; AKT: proteína quinase B; GSK3: glicogênio sintase quinase 3; PKA: proteína quinase A; HSF-1: fator de transcrição do choque térmico 1; HSP70 e 27: proteína do choque térmico 70 e 27.



Fonte: Adaptado de Calderwood et al. (2010)

Podemos observar que algumas vias de sinalização do choque térmico são as mesmas envolvidas na sinalização intracelular do IGF-I (rever figura 13). Portanto, o IGF-I pode estar diretamente relacionado à via celular de resposta ao estresse, auxiliando a célula a enfrentar os desafios ambientais. Baseado nisso, Chiang et al. (2012) demonstraram que a resposta intracelular do IGF-I está diretamente relacionada com a ativação da HSF-I, sendo esse fator de transcrição um dos mediadores dos efeitos de sobrevivência e longevidade celulares desencadeados pelos IGF-I.

As HSPs são agrupadas em diferentes famílias com base no seu tamanho molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSP27/28. A família HSP70s contém membros distintos

em muitos compartimentos celulares, sendo que alguns são constitutivamente expressos (HSC70) enquanto outros são induzidos por vários estressores (HSP70) (NEUER et al., 1999). Lanska et al. (2006), ao avaliar oócitos suínos, observaram a presença da HSP70 logo após a aspiração folicular, confirmando que a isoforma induzível da HSP70 é sintetizada durante o crescimento oocitário. Esta condição em suínos é diferente da apresentada em camundongos, já que Curci et al. (1991) não observaram a expressão de HSP70 em oócitos de camundongos em crescimento. Adicionalmente, a fim de avaliar a resposta dos oócitos suínos frente ao estresse térmico, Lanska et al. (2006) submeteram os oócitos em crescimento a altas temperaturas e avaliaram a expressão da HSP70. De acordo com os resultados, esses autores observaram que após uma hora da exposição às temperaturas elevadas, houve a expressão máxima de HSP70, a qual ia reduzindo com o passar do tempo. Esses resultados demonstram que oócitos suínos podem responder ao estresse térmico com a produção das formas induzíveis das HSP's, sendo que a expressão da HSP70 está diretamente relacionada com a termotolerância oocitária (BASIRICÒ et al., 2011).

#### **2.7.4 Estresse oxidativo**

Os processos de vitrificação e reaquecimento, assim como outros fatores de estresse, como a maturação (MIV) e cultivo *in vitro* (CIV), foram relatados como perturbadores do estado de oxidação-redução celular (redox), gerando redução do conteúdo intracelular de glutathiona (GSH) e aumentando os níveis de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em oócitos (SARAGUSTY; ARAV, 2011) e blastocistos suínos cultivados *in vitro* (CASTILLO-MARTIN et al., 2014).

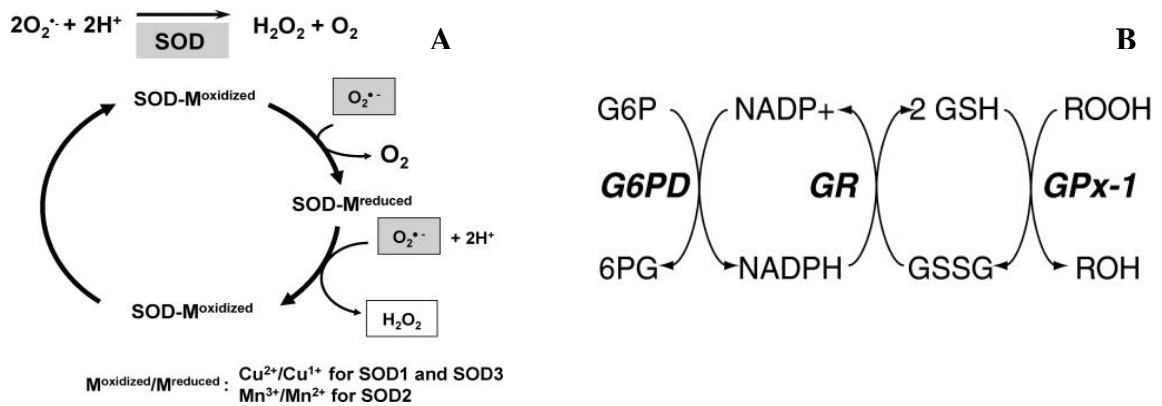
A formação de ROS ocorre durante o metabolismo oxidativo celular ocorre, e são considerados intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio. Em uma célula saudável, 1 a 2% do oxigênio são convertidos em algum intermediário reativo, os quais podem ser o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), óxido nítrico ( $NO^\cdot$ ) ou peroxinitrito (ONOO), revisado por Bathgate (2011). O estresse oxidativo ocorre quando as quantidades de ROS presentes no meio superam a capacidade da célula em degradá-los. Ou seja, quando o equilíbrio fisiológico entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes celulares é perdido, o que pode ocorrer durante a exposição a estímulos

estressantes, a célula fica exposta ao estresse oxidativo, o qual resultará em danos aos ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001).

Um dos meios para controlar a formação excessiva de ROS é a sua degradação por enzimas antioxidantes. No sistema antioxidante, a superóxido dismutase citosólica (SOD1) e a superóxido dismutase dependente de manganês mitocondrial (SOD2) são as enzimas iniciais que permitem a conversão de  $O_2^-$  para  $H_2O_2$  (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). O peróxido de hidrogênio é então transformado em água pela catalase (CAT) e pela glutathiona peroxidase (GPX) que estão presentes no citoplasma e na mitocôndria (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A glutathiona redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) também estão envolvidas no ciclo redox da glutathiona, como participam da regeneração de GSH e NADPH (LONERGAN et al., 2003; HANSEN; HARRIS, 2015).

A principal defesa celular contra o  $O_2^-$  e o peroxinitrito é um grupo de oxidoredutases conhecidas como superóxido dismutases (SODs), as quais catalisam a dismutação do  $O_2^-$  em oxigênio e  $H_2O_2$  (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). O mecanismo de dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  pela SOD envolve redução e reoxidação de um metal de transição redox ativo, como o cobre (Cu), para a SOD 1 e 3, e o manganês (Mn), para a SOD2, no sítio ativo da enzima (Figura 16A) (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011). Em contrapartida, a glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima citosólica que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, além de catalisar a redução de radicais peróxidos em álcoois e oxigênio (KNAPEN et al., 1999). Para regular o estado redox celular a GPx utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como cofator para reduzir o peróxido de hidrogênio, resultando na formação de glutathiona oxidada (GSSG). Posteriormente, a enzima glutathiona redutase (GR) recicla GSSG para GSH usando NADPH como uma fonte de equivalentes redutores, e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) mantém reservas celulares de NADPH (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011) (Figura 16B). A relação entre GSH e GSSG (GSH/GSSG) é um indicador de saúde celular, sendo um dos principais indicadores do potencial redox (MARI et al., 2009).

Figura 16 - (A) Mecanismo de conversão do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD), e (B) Vias de redução/oxidação envolvidas na manutenção dos cofatores necessários para a atividade da glutatona peroxidase (GPx). Mn: manganês; Cu: cobre. GP6: glicose-6-fosfato; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; 6-fosfogluconato; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada.



Fonte: Lubos; Loscalzo Handy (2011) (A) e Fukaie Ushio-Fukai (2011) (B)

## 2.8 Glutaciona reduzida (GSH)

A glutaciona reduzida (GSH) é o principal composto sulfidrílico não proteico presente nas células de mamíferos, e é bem conhecida por desempenhar um importante papel na proteção das células contra os efeitos nocivos dos ROS (MEISTER; ANDERSON, 1983), desempenhando um papel crucial como protetor celular e na manutenção do status redox intracelular (HANSEN; HARRIS, 2015). As propriedades químicas e físicas inerentes do radical tiol redox-ativo da GSH permite o ciclos de oxidação e redução celular sob condições fisiológicas, servindo como um removedor de radicais livres, um redutor catalítico, um doador de elétrons, um depósito de armazenamento fisiológico de cisteína, e um determinante crítico do estado redox celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Na função reprodutiva, o GSH participa da descondensação espermática e da formação do pronúcleo masculino, durante a fertilização em ratos (PERREAULT; BARBEE; SLOTT, 1988), suínos (YOSHIDA et al., 1993) e bovinos (SUTOVSKY; SCHATTEN, 1997). Adicionalmente, a adição de GSH ou dos precursores da sua síntese, como a cisteína, ao meio de cultivo de oócitos, melhora a eficiência de maturação através do aumentando do conteúdo de GSH

oocitário em ratos (TRAPPHOFF et al., 2016; MOAWAD; TAN; TAKETO, 2017), suínos (WHITAKER; CASEY; TAUPIER, 2012; LI et al., 2018), bovinos (DE MATOS; FURNUS, 2000; CURNOW et al., 2010) e ovinos (DE MATOS et al., 2002). Dessa maneira, variações no conteúdo intracelular de GSH ou no potencial redox, relação entre GSH/GSSG ( $E_{GSH}$ ) podem induzir o envelhecimento pós-ovulatório, comprometer a formação pronuclear masculina, aumentar a apoptose e prejudicar o desenvolvimento embrionário (LI et al., 2011).

A GSH é sintetizada exclusivamente no citosol e é compartimentalizada em “pools redox” no retículo endoplasmático (ER), núcleo e mitocôndria (TRAPPHOFF et al., 2016). A GSH é sintetizada pelo durante a maturação oocitária tanto pelo oócito quanto pelas células do cumulus, sendo que sua maior concentração intraoocitária é encontrada no estágio MII (HANSEN; HARRIS, 2015). Entretanto, Somfai et al. (2007) relataram que o processo de maturação *in vitro* e vitrificação oocitária reduz significativamente o conteúdo total de GSH em oócitos de suínos. Baseado nisso, Moawad; Tane Taketo (2017) adicionaram 1mM de GSH aos meios de vitrificação e reaquecimento de oocitos e observaram que essa suplementação aumentou a taxa de desenvolvimento embrionário de oocitos de ratos criopreservados. Além da suplementação dos meios de criopreservação, a maturação oocitária na presença de GSH produz oocitos com maior conteúdo citoplasmático de GSH, melhorando a função mitocondrial e a regulação da homeostase redox dos oocitos após a vitrificação, o que levou a redução dos níveis intracelulares de ROS (TRAPPHOFF et al., 2016).

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O sucesso na criopreservação de oócitos traria uma significativa contribuição para o desenvolvimento de biotecnologias embrionárias. A técnica de criopreservação já é aplicada com êxito na criopreservação de algumas espécies de mamíferos, mas ainda precisa ser aprimorada para a espécie suína. De forma geral, os oócitos são considerados como sendo uma das células mais difíceis de serem criopreservadas, sendo que, o oócito suíno, devido as suas características estruturais e composição, apresenta uma elevada sensibilidade ao resfriamento. Ainda não há um protocolo de criopreservação pré-definido para suínos, e sim algumas considerações sobre o processo.

Como uma alternativa à tradicional metodologia de congelamento (congelamento lento), a vitrificação trouxe um avanço importante na criopreservação de oócitos suínos. Essa técnica tem como objetivo eliminar as lesões geradas pela formação intercelular de gelo, passando a célula diretamente do estado líquido para o estado vítreo. Entretanto esse processo tem alguns pontos-chaves, sendo que o seu sucesso depende da viscosidade e do tamanho da amostra, e da taxa de resfriamento.

Com base nos aspectos acima mencionados, o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação para oócitos suínos pode ser conseguido por várias abordagens diferentes, levando em consideração a taxa de resfriamento e a composição dos meios. Em relação à composição dos meios de vitrificação, o uso de substâncias antioxidantes, como a glutatona, auxilia o oócito a combater as espécies reativas ao oxigênio formadas no processo de criopreservação, reduzindo os danos às membranas e DNA oocitário. Dessa forma, pode-se gerar oócitos de melhor qualidade após o descongelamento.

Além disso, outra alternativa que possa proporcionar o descongelamento de oócitos de melhor qualidade, envolve uma preparação do oócito para o processo de vitrificação. Substâncias que auxiliam a célula oocitária a modular sua resposta frente ao estresse térmico, são consideradas promissoras. Baseado nisso, o IGF-I, por ser um fator que além de estar envolvido na maturação oocitária e na comunicação entre os oócitos e as células da granulosa, participa dos processos de expressão de genes relacionados ao estresse e as vias de apoptose, pode ser utilizado durante a maturação oocitária de forma com que se produza um oócito mais preparado para o processo de vitrificação.

## REFERÊNCIAS

- ADAMO, M. L.; NEUENSCHWANDER, S.; LEROITH, D. Structure, expression, and regulation of the IGF-I gene. . **Adv Exp Med Biol**, v. 343, p. 1–11, 1993.
- ADAMS, T. E. et al. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 57, n. 7, p. 1050-1093, Julho 2000.
- AJDUK, A.; MAŁAGOCKI, A.; MALESZEWSKI, M. Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 8, n. 1, p. 3-22, Março 2008.
- ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 5, p. 647-653, Maio 2001.
- ANEKE, C. S. et al. Changes in IGF-I and its Binding Proteins Are Associated with Diabetes in Older Adults. **Journal of the American Geriatrics Society**, New York, v. 63, n. 5, p. 902-909, Maio 2015.
- ANNUNZIATA, M.; GRANATA, R.; GHIGO, E. The IGF system. **Acta diabetologica latina**, Berlin, v. 48, n. 1, p. 1-9, Março 2011.
- ARAT, S. et al. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of cloned bovine embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 24, n. 4, p. 554-562, Agosto 2016.
- ARAV, A. et al. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 77-81, Fevereiro 2002.
- ASCARI, I. J. et al. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domest Anim Endocrinol**, Stoneham, v. 60, p. 50-60, Julho 2017.
- ATEF, A. et al. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 71, n. 3, p. 358-367, Julho 2005.
- BACH, L. A. Endothelial cells and the IGF system. **J Mol Endocrinol**, Bristol, v. 54, n. 1, p. R1-13, Fevereiro 2015.
- BAKER, J. et al. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 10, n. 7, p. 903-918, Julho 1996.
- BASIRICÒ, L. et al. Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1

- genetic polymorphisms in Holstein lactating cows. **Cell Stress and Chaperones**, New York, v. 16, n. 4, p. 441-448, Julho 2011.
- BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46 Suppl 2, p. 23-25, Setembro 2011.
- BAUMGARTEN, S. C. et al. IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human Cumulus granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 99, n. 8, p. 2995-3004, Agosto 2014.
- BERNARDINI, C. et al. Expression of HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 69, n. 3, p. 303-307, Novembro 2004.
- BLOCK, J. et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 75, n. 5, p. 895-903, Maio 2008.
- CALDERWOOD, S. K. et al. Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. **Signal Transduction Insights**, Auckland, v. 2, p. 13-24, 2010.
- CARABATSOS, M. J. et al. Characterization of Oocyte and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient Mice. **Developmental Biology**, New York, v. 204, n. 2, p. 373-384, Dezembro 1998.
- CASTILLO-MARTIN, M. et al. Comparative effects of adding beta-mercaptoethanol or L-ascorbic acid to culture or vitrification-warming media on IVF porcine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 26, n. 6, p. 875-882, Julho 2014.
- CASTILLO-MARTIN, M. et al. Addition of L-ascorbic acid to culture and vitrification media of IVF porcine blastocysts improves survival and reduces HSPA1A levels of vitrified embryos. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 27, n. 7, p. 1115-1123, Setembro 2015.
- CHAUBE, S. K. et al. Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, New York, v. 84 Suppl 2, p. 1163-1172, Outubro 2005.
- CHEN, S.-U.; YANG, Y.-S. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**, Hong Kong, v. 48, n. 1, p. 15-22, Março 2009.
- CHIAN, R. C.; WANG, Y.; LI, Y. R. Oocyte vitrification: Advances, progress and future goals. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 31, n. 4, p. 411-420,



Abril 2014.

CHIANG, W.-C. et al. A complex containing DDL-1 and HSF-1 links insulin-like signaling to heat-shock response in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v. 148, n. 1-2, p. 322-334, Janeiro 2012.

CHOI, H. S. et al. cAMP and cAMP-dependent protein kinase regulate the human heat shock protein 70 gene promoter activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 18, p. 11858-11865, Junho 1991.

CHU, B. et al. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 48, p. 30847-30857, Novembro 1996.

CIOTTI, P. M. et al. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. **Fertility and Sterility**, New York, v. 91, n. 6, p. 2399-2407, Junho 2009.

CONTI, M. et al. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 356, n. 1-2, p. 65-73, Junho 2012.

COTICCHIO, G. et al. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 115, n. SUPPL., p. S2-S7, Julho 2004.

COTICCHIO, G. et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 427-454, Julho 2015.

CROCOMO, L. F. et al. Aspectos Bioquímicos E Ultraestruturais Da Maturação Oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 542-552, Março 2011.

CUI, X. S. et al. Insulin-like growth factor-I alters apoptosis related genes and reduces apoptosis in porcine parthenotes developing in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 4, p. 1070-1080, Março 2005.

CURCI, A. et al. Developmental regulation of heat-shock response in mouse oogenesis: identification of differentially responsive oocyte classes during Graafian follicle development. **Developmental Biology**, New York, v. 144, n. 2, p. 362-368, Abril 1991.

CURNOW, E. C. et al. Developmental potential of bovine oocytes following IVM in the presence of glutathione ethyl ester. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 22, n. 4, p. 597-605, Julho 2010.

DAI, J. et al. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. **Cryobiology**, San Diego, v. 71, n. 2, p. 291-298, Outubro 2015.

DAUGHADAY, W. H. et al. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. **Nature**, London, v. 235, n. 5333, p. 107, Janeiro 1972.

DAUGHADAY, W. H. et al. On the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 121, n. 5, p. 1911-1912, Novembro 1987.

DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. **Endocr Rev**, New York, v. 10, n. 1, p. 68-91, Fevereiro 1989.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, Los Altos, v. 53, n. 3, p. 761-771, Fevereiro 2000.

DE MATOS, D. G. et al. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. **Theriogenology**, Los Altos, v. 57, n. 5, p. 1443-1451, Março 2002.

DENDULURI, S. K. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. **Genes Dis**, v. 2, n. 1, p. 13-25, Mar 01 2015.

DENDULURI, S. K. et al. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. **Genes Dis**, Chongqing, v. 2, n. 1, p. 13-25, Março 2015.

DINNYES, A. High Developmental Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, In Vitro Fertilization, and Somatic Cell Nuclear Transfer. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 2, p. 513-518, Agosto 2000.

DOBRINSKY, J. R. et al. Birth of Piglets After Transfer of Embryos Cryopreserved by Cytoskeletal Stabilization and Vitrification. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 3, p. 564-570, Março 2000.

EDGAR, D. H.; GOOK, D. A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 536-554, Setembro 2012.

EPPIG, J. J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. **Nature**, London, v. 281, n. 5731, p. 483-484, Outubro 1979.

FAHY, G. M.; WOWK, B. Principles of Cryopreservation by Vitrification. In: WOLKERS, W. F. e OLDENHOF, H. (Ed.). Third. New York, NY: Springer New York, v.1257, 2015. p.21-82. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-4939-2192-8.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 5, p. 836-848, Março 2009.

FINLAY, D.; CANTRELL, D. Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 1183, p. 149-157, Janeiro 2010.

FROESCH, E. R. et al. ANTIBODY-SUPPRESSIBLE AND NONSUPPRESSIBLE INSULIN-LIKE ACTIVITIES IN HUMAN SERUM AND THEIR PHYSIOLOGIC SIGNIFICANCE. AN INSULIN ASSAY WITH ADIPOSE TISSUE OF INCREASED PRECISION AND SPECIFICITY. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 42, n. 11, p. 1816-1834, Novembro 1963.

FRYSTYK, J.; SKJAERBAEK, C.; DINESEN, B. Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. . **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 348, p. 185–191., Julho 1994.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, Nova York, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, Julho 2011.

GALEATI, G. et al. Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n. 1-2, p. 43-49, Agosto 2011.

GARRIDO, C. et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 5, n. 22, p. 2592-2601, Novembro 2006.

GE, Z. et al. Insulin-like growth factor I receptor mRNA and protein expression in pig corpora lutea. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 109-114, Setembro 2000.

GHETLER, Y. et al. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. **Fertility and Sterility**, New York, v. 86, n. 1, p. 210-216, Julho 2006.

GHETLER, Y. et al. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 12, p. 3385-3389, Dezembro 2005.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human**

**Reproduction**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 175-189, Dezembro 2001.

GUPTA, M. K.; UHM, S. J.; LEE, H. T. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 2, p. 238-248, Janeiro 2007.

HAN, J. et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, New York, v. 265, n. 5173, p. 808-811, Agosto 1994.

HAN, S. J. et al. Wee1B Is an Oocyte-Specific Kinase Involved in the Control of Meiotic Arrest in the Mouse. **Current Biology**, London, v. 15, n. 18, p. 1670-1676, Setembro 2005.

HANSEN, J. M.; HARRIS, C. Glutathione during embryonic development. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 1850, n. 8, p. 1527-1542, Agosto 2015.

HARA, N. et al. Insulin-like growth factor-1 is associated with regulation of the luteinizing hormone production in men receiving androgen deprivation therapy with gonadotropin-releasing hormone analogues for localized prostate cancer. **Urol Oncol**, New York, v. 30, n. 5, p. 596-601, Setembro 2012.

HARADA, M. et al. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. **Gynecological endocrinology** London, v. 31, n. 10, p. 783-787, Outubro 2015.

HASTIE, P. M.; HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 92, n. 3-4, p. 284-299, Maio 2006.

HIKAKE, T. et al. The role of IGF1 on the differentiation of prolactin secreting cells in the mouse anterior pituitary. **J Endocrinol**, Bristol, v. 203, n. 2, p. 231-240, Novembro 2009.

HOSOE, M.; SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. **Zygote**, London, v. 5, n. 04, Novembro 1997.

ISACHENKO, V. et al. Vitrification of Immature Porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant. **Cryobiology**, San Diego, v. 36, n. 3, p. 250-253, Maio 1998.

ISPADA, J. et al. Insulin-like growth factor-1 exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 24, n. 1, p. 209-209, Março 2011.

KHANDWALA, H. M. et al. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. **Endocr Rev**, Chevy Chase, v. 21, n. 3, p. 215-244, Junho 2000.

KIDDER, G. M.; MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 5, p. 613-620, Maio 2002.

KIM, S. et al. Anti-apoptotic effect of insulin-like growth factor (IGF)-I and its receptor in porcine preimplantation embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 12, p. 1523-1530, Dezembro 2006.

KNAPEN, M. F. C. M. et al. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: A review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 171-184, Fevereiro 1999.

KOOIJMAN, R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. **Cytokine Growth Factor Rev**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 305-323, Agosto 2006.

KUWAYAMA, M. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 608-614, Novembro 2005.

LANSKA, V. et al. Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 154-164, Novembro 2006.

LATHAM, K. E. Stress signaling in mammalian oocytes and embryos: a basis for intervention and improvement of outcomes. **Cell Tissue Res**, Berlin, v. 363, n. 1, p. 159-167, Janeiro 2016.

LAVIOLA, L.; NATALICCHIO, A.; GIORGINO, F. The IGF-I signaling pathway. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 13, n. 7, p. 663-669, Março 2007.

LEGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **The Journal of physiology**, London, v. 576, n. Pt 3, p. 923-933, Novembro 2006.

LEI, T. et al. Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**, Wuhan, v. 34, n. 1, p. 99-102, Fevereiro 2014.

LEROITH, D.; ROBERTS, C. T., JR. The insulin-like growth factor system and cancer. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 127-137, Junho 2003.

LI, Q. et al. Glucose metabolism in mouse cumulus cells prevents oocyte aging by maintaining both energy supply and the intracellular redox potential. **Biology of Reproduction**, New York, v. 84, n. 6, p. 1111-1118, Junho 2011.

- LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 141-152, Março 2013.
- LI, Z. et al. Preincubation with glutathione ethyl ester improves the developmental competence of vitrified mouse oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Netherlands, v. 35, n. 7, p. 1169-1178, Junho 2018.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 62, n. 6, p. 1745-1753, Junho 2000.
- LIU, R.-H. et al. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within in vitro matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 65, n. 2, p. 212-218, Junho 2003.
- LIU, Y. et al. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. **Cryo-Letters**, London, v. 29, n. 4, p. 315-320, Julho 2008.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 255-268, Novembro 2016.
- LONERGAN, P. et al. Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, New York, v. 69, n. 4, p. 1424-1431, Outubro 2003.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, New York, v. 15, n. 7, p. 1957-1997, Novembro 2011.
- MADGWICK, S.; JONES, K. T. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. **Cell Division**, London, v. 2, n. 1, p. 4-4, Janeiro 2007.
- MADGWICK, S. et al. Maintenance of sister chromatid attachment in mouse eggs through maturation-promoting factor activity. **Developmental Biology**, San Diego, v. 275, n. 1, p. 68-81, Novembro 2004.
- MAO, J. et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, Julho 2004.

- MAO, L. et al. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 28, n. 3, p. 284-299, Março 2014.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; CASARES-CRESPO, L.; VICENTE, J. S. Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. **Zygote**, Cambridge, v. 22, n. 02, p. 204-212, Maio 2014.
- MAR<sub>1</sub>, M. et al. Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, New York, v. 11, n. 11, p. 2685-2700, Novembro 2009.
- MARTIN, R. H. Meiotic errors in human oogenesis and spermatogenesis. **Reproductive BioMedicine Online**, Cambridge, v. 16, n. 4, p. 523-531, Abril 2008.
- MAYER, E. New method for vitrifying water and other liquids by rapid cooling of their aerosols. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 58, n. 2, p. 663-667, Janeiro 1985.
- MAZUR, P.; RALL, W. F.; LEIBO, S. P. Kinetics of water loss and the likelihood of intracellular freezing in mouse ova. Influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. **Cell Biophysics**, Totowa, v. 6, n. 3, p. 197-213, Setembro 1984.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocytin). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, Novembro 1969.
- MCEVOY, T. G. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 118, n. 1, p. 163-170, Janeiro 2000.
- MCGINNIS, L. K.; LIMBACK, S. D.; ALBERTINI, D. F. Signaling modalities during oogenesis in mammals. **Curr Top Dev Biol**, New York, v. 102, p. 227-242, Maio 2013.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MEIYU, Q.; LIU, D.; ROTH, Z. IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. **Zygote**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 514-524, Maio 2015.
- MEN, H. et al. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 8, p. 2008-2016, Julho 2006.
- 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**, San Diego, v. 76, p. 98-103, Junho 2017.

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. **J Endocrinol**, Bristol, v. 175, p. 19-31, Outubro 2002.

MOMOZAWA, K. et al. In vitro Development of Porcine In Vitro Matured Oocytes Vitrified After Removal of Cytoplasmic Lipid Droplets. **Journal of Mammalian Ova Research**, Kanagawa, v. 30, n. 1, p. 36-40, Fevereiro 2013.

MORI, T.; AMANO, T.; SHIMIZU, H. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. **Biology of Reproduction**, New York, v. 62, n. 4, p. 913-919, Abril 2000.

NAGASHIMA, H. et al. Survival of Porcine Delipated Oocytes and Embryos after Cryopreservation by Freezing or Vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 45, n. 2, p. 167-176, 1999.

NEMCOVA, L. et al. Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 76, n. 6, p. 1016-1024, Junho 2007.

NEUER, A. et al. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. **Infect Dis Obstet Gynecol**, Cairo, v. 7, n. 1-2, p. 10-16, Julho 1999.

NIU, Y. et al. Positive effect of apoptotic inhibitor z-vad-fmk on vitrified-thawed porcine mii stage oocytes. **Cryo Letters**, London, v. 37, n. 3, p. 188-195, Maio 2016.

NOHALEZ, A. et al. Effects of two combinations of cryoprotectants on the in vitro developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 84, n. 4, p. 545-552, Setembro 2015.

NORRIS, R. P. et al. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. **Development**, Cambridge, v. 135, n. 19, p. 3229-3238, Outubro 2008.

OBERLENDER, G. et al. Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v. 80, n. 4, p. 1-9, Setembro 2013.

OBERLENDER, G. et al. Porcine follicular fluid concentration of free insulin-like growth factor-I collected from different diameter ovarian follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 10, p. 1269-1274, Outubro 2013.



OBERLENDER, G. et al. Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 319-327, Sep 1 2013.

PAN, Y. et al. Developmental competence of mature yak vitrified-warmed oocytes is enhanced by IGF-I via modulation of CIRP during in vitro maturation. **Cryobiology**, San Diego, v. 71, n. 3, p. 493-498, Dezembro 2015.

PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. **Methods in molecular biology**, Clifton, v. 368, p. 3-19, 2007.

PEREIRA, G. R. et al. The effect of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on in vitro maturation of equine oocytes. **Zygote**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 353-360, Novembro 2012.

PEREIRA, G. R. et al. Influence of equine growth hormone, insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and cytoskeleton morphology in equine oocytes. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 1493-1499, Setembro 2013.

PERREAULT, S. D.; BARBEE, R. R.; SLOTT, V. L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, New York, v. 125, n. 1, p. 181-186, Janeiro 1988.

QUESNEL, H. Localization of binding sites for IGF-I, insulin and GH in the sow ovary. **Journal of endocrinology**, Bistol, v. 163, n. 2, p. 363-372, November 1999.

RAWAN, A. F. et al. Insulin-like growth factor-1 regulates the expression of luteinizing hormone receptor and steroid production in bovine granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 2, p. 283-291, Abril 2015.

REBOUCAS, E. L. et al. Expression levels of mRNA for insulin-like growth factors 1 and 2, IGF receptors and IGF binding proteins in in vivo and in vitro grown bovine follicles. **Zygote**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 521-532, Novembro 2014.

REYES, J. M.; ROSS, P. J. Cytoplasmic polyadenylation in mammalian oocyte maturation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Hoboken, v. 7, n. 1, p. 71-89, Janeiro 2016.

RIEDEMANN, J.; MACAULAY, V. M. IGF1R signalling and its inhibition. **Endocr Relat Cancer**, Bristol, v. 13, n. 1, p. 33-43, Dezembro 2006.

RODRIGUES, T. A. et al. Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on in vitro matured bovine oocyte exposed to heat shock. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 8, p. 2028-2039, Novembro 2016.

ROJAS, C. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, San Diego, v. 49, n. 3, p. 211-220, Dezembro 2004.

SALMON, W. D., JR.; DAUGHADAY, W. H. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **J Lab Clin Med**, St. Louis, v. 49, n. 6, p. 825-836, Junho 1957.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 1-19, Outubro 2011.

SARAIVA, H. et al. l-carnitine supplementation during vitrification or warming of in vivo-produced ovine embryos does not affect embryonic survival rates, but alters CrAT and PRDX1 expression. **Theriogenology**, Los Altos, v. 105, p. 150-157, Janeiro 2018.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, Junho 2001.

SHEIKHI, M. et al. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 594-603, Março 2011.

SHI, L.-Y. et al. Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 128-140, Julho 2007.

SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, Los Altos, v. 71, n. 8, p. 1193-1208, Maio 2009.

SILVA, J. R. V.; LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R. Transforming growth factors- $\beta$  superfamily members and control of folliculogenesis in mammals. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 149-160, Março 2009.

SOMFAI, T.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. Factors Affecting Cryopreservation of Porcine Oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 58, n. 1, p. 17-24, Dezembro 2012.

SOMFAI, T. et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, San Diego, v. 55, n. 2, p. 115-126, Outubro 2007.

- SPITSCHAK, M.; HOEFLICH, A. Potential Functions of IGFBP-2 for Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, p. 119, Abril 2018.
- SPRICIGO, J. F. et al. Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on in vitro-matured calf oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 89, p. 47-57, Fevereiro 2017.
- STEPONKUS, P. L. et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**, London, v. 345, n. 6271, p. 170-172, Maio 1990.
- SUTOVSKY, P. et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 49, n. 6, p. 1277-1287, Dezembro 1993.
- SUTOVSKY, P.; SCHATTEN, G. Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization. **Biology of Reproduction**, New York, v. 56, n. 6, p. 1503-1512, Junho 1997.
- SZÉLL, A.; SHELTON, J. N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 78, n. 2, p. 699-703, Novembro 1986.
- TAN, Y. J. et al. Cryoprotectants up-regulate expression of mouse oocyte AQP7, which facilitates water diffusion during cryopreservation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 99, n. 5, p. 1428-1435, Abril 2013.
- TANGHE, S. et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 3, p. 414-424, Março 2002.
- TIWARI, M. et al. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. **Apoptosis**, London, v. 20, n. 8, p. 1019-1025, Agosto 2015.
- TOORI, M. A. et al. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I on Maturation and Fertilization Rate of Immature Oocyte and Embryo Development in NMRI Mouse with TCM199 and alpha-MEM Medium. **J Clin Diagn Res**, India, v. 8, n. 12, p. AC05-08, Dezembro 2014.
- TRAPPHOFF, T. et al. Improved cryotolerance and developmental potential of in vitro and in vivo matured mouse oocytes by supplementing with a glutathione donor prior to vitrification. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 867-881, Dezembro 2016.
- TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V. P.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 223, n. 3, p. n/a-n/a, Junho 2010.

VACCARI, S. et al. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 81, n. 3, p. 595-604, Setembro 2009.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p. 357-364, Julho 2000.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, n. 1, p. 53-58, Setembro 1998.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 1, p. 236-244, Novembro 2006.

VALLORANI, C. et al. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 135, n. 1-4, p. 68-74, Novembro 2012.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 12, p. 2621-2633, Dezembro 2000.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, Los Altos, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, Dezembro 2005.

VAN SOOM, A. et al. Function of the Cumulus Oophorus Before and During Mammalian Fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, n. 3, p. 144-151, Junho 2002.

VON STETINA, J. R.; ORR-WEAVER, T. L. Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York, v. 3, n. 10, p. 53-55, Outubro 2011.

VORONINA, E.; WESSEL, G. M. The Regulation of Oocyte Maturation. **Current Topics in Development Biology**, New York, v. 58, p. 53-110, Maio 2003.

WASIELAK, M.; BOGACKI, M. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. **The Journal of reproduction and development**, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 419-426, Apr 2007.

WASIELAK, M. et al. Transcript abundance and apoptosis in day-7 porcine blastocyst cultured with exogenous insulin-like growth factor-I. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 13, n. 1, p. 58-65, Março 2013.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 13, p. 1-3, Março 2007.

WEBB, R. J. et al. Follicle-Stimulating Hormone Induces a Gap Junction-Dependent Dynamic Change in [cAMP] and Protein Kinase A in Mammalian Oocytes. **Developmental Biology**, New York, v. 246, n. 2, p. 441-454, Junho 2002.

WHITAKER, B. D.; CASEY, S. J.; TAUPIER, R. The effects of N-acetyl-L-cysteine supplementation on in vitro porcine oocyte maturation and subsequent fertilisation and embryonic development. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 24, n. 8, p. 1048-1054, Setembro 2012.

WIGGLESWORTH, K. et al. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 110, n. 39, p. 3723-3729, Setembro 2013.

WU, C. et al. Effects of Cryopreservation on the Developmental Competence, Ultrastructure and Cytoskeletal Structure of Porcine Oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 73, n. 11, p. 1454-1462, Novembro 2006.

WU, G. et al. Nuclear maturation and embryo development of porcine oocytes vitrified by cryotop: Effect of different stages of in vitro maturation. **Cryobiology**, New York, v. 67, n. 1, p. 95-101, Junho 2013.

XIA, P.; TEKPETEY, F. R.; ARMSTRONG, D. T. Effect of IGF-I on pig oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development in vitro, and on granulosa and cumulus cell biosynthetic activity. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 38, n. 4, p. 373-379, Agosto 1994.

XUE-MING, Z. et al. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. **Journal of Pineal Research**, New York, v. 60, n. 2, p. 132-141, Março 2016.

YAKAR, S.; ADAMO, M. L. Insulin-Like Growth Factor-1 Physiology: Lessons from Mouse Models. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, New York, v. 41, n. 2, p. 231-v, 05/15 2012.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reproductive Medicine and Biology**, Tokyo, v. 10, n. 2, p. 69-79, Março 2011.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification

solutions. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 1, p. 81-89, Janeiro 2007.

YESTE, M. et al. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. **Cryobiology**, San Diego, v. 68, n. 2, p. 251-261, Abril 2014.

YOON, S. B. et al. Developmental competence of bovine early embryos depends on the coupled response between oxidative and endoplasmic reticulum stress. **Biology of Reproduction**, New York, v. 90, n. 5, p. 104, Maio 2014.

YOSHIDA, M. et al. Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. **Biology of Reproduction**, New York, v. 49, n. 1, p. 89-94, Julho 1993.

ZHANG, X. et al. Redox-induced apoptosis of human oocytes in resting follicles in vitro. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, New York, v. 13, n. 6, p. 451-458, Setembro 2006.

ZHAO, J. et al. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF-I receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. **Zygote**, Cambridge, v. 10, n. 1, p. 85-94, Fevereiro 2002.

ZHOU, G. B.; LI, N. Cryopreservation of porcine oocytes: Recent advances. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 279-285, Maio 2009.

ZHU, Y. et al. Insulin-Like Growth Factor Axis and Gestational Diabetes Mellitus: A Longitudinal Study in a Multiracial Cohort. **Diabetes**, New York, v. 65, n. 11, p. 3495-3504, Novembro 2016.

ZOU, J. et al. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. **Cell**, Cambridge, v. 94, n. 4, p. 471-480, Agosto 1998.

**SEGUNDA PARTE****ARTIGO – Normas da Revista *Frontiers in Physiology***

(Versão submissão)

Supplementing Maturation Medium with Insulin Growth Factor I and Vitrification-Warming Solutions with Reduced Glutathione Enhances Survival Rates and Development Ability of In Vitro Matured Vitrified-Warmed Pig Oocytes

Barbara Azevedo Pereira<sup>1,2</sup>, Marcio Gilberto Zangeronimo<sup>2</sup>, Miriam Castillo-Martín<sup>1</sup>, Beatrice Gadani<sup>1,3</sup>, Joan Enric Rodríguez-Gil<sup>4</sup>, Sergi Bonet<sup>1</sup>, Marc Yeste<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Unit of Cell Biology, Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology, Faculty of Sciences, University of Girona, Girona, GI, Spain

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Physiology and Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, BO, Italy

<sup>4</sup>Unit of Animal Reproduction, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), B, Spain.

Keywords: growth factors<sup>1</sup>, IGF-I<sup>2</sup>, antioxidants<sup>3</sup>, GSH<sup>4</sup>, apoptosis<sup>5</sup>, cryotolerance<sup>6</sup>, DNA fragmentation<sup>7</sup>, swine<sup>8</sup>

27 *Abstract*

28 The present study sought to determine whether *in vitro* maturation (IVM) of pig oocytes in a medium  
29 supplemented with insulin growth factor-I (IGF-I) and subsequent vitrification with or without  
30 reduced glutathione (GSH) affect their quality and developmental competence, and the expression of  
31 genes involved in antioxidant, apoptotic and stress responses. In Experiment 1, cumulus-oocyte  
32 complexes were matured in the absence or presence of IGF-I ( $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and then vitrified-warmed  
33 with or without 2mM of GSH. Maturation rate was evaluated before vitrification, and oocyte viability,  
34 DNA fragmentation and relative transcript abundances of BCL-2-associated X protein (*BAX*), BCL2-  
35 like1 (*BCL2L1*), heat shock protein 70 (*HSPA1A*), glutathione peroxidase 1 (*GPXI*) and superoxide  
36 dismutase 1 (*SOD1*) genes were assessed in fresh and vitrified-warmed oocytes. In Experiment 2,  
37 fresh and vitrified-warmed oocytes were *in vitro* fertilized and their developmental competence  
38 determined. Whereas the addition of IGF-I to maturation medium had no effect on oocyte maturation,  
39 it caused an increase in the survival rate of vitrified-warmed oocytes. This effect was accompanied by  
40 a concomitant augment in the relative transcript abundance of *HSPA1A* and a decrease of *BAX*.  
41 Furthermore, the addition of GSH to vitrification-warming media increased survival rates at post-  
42 warming. Likewise, the action of GSH was concomitant with an increase in the relative abundance of  
43 *GPXI* and a decrease of *BAX* transcript. Blastocyst rates of vitrified-warmed oocytes did not differ  
44 from their fresh counterparts when IGF-I and GSH were combined. In conclusion, supplementing  
45 maturation medium with  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  IGF-I and vitrification-warming solutions with 2mM GSH  
46 improves the quality and cryotolerance of IVM pig oocytes, through a mechanism that involves *BAX*,  
47 *GPXI* and *HSPA1A* expression.

48 **1 Introduction**

49 Cryopreservation of gametes is considered an efficient tool to maintain genetic resources, contributing  
50 to research and development of assisted reproductive technologies (Zhou and Li, 2009;Galeati et al.,  
51 2011). However, cryopreservation causes damages to the oocyte structure, chromosomes, and  
52 microtubules, including the meiotic spindle (Shi et al., 2006;Wu et al., 2006;Fu et al., 2009).  
53 Furthermore, cold shock alters mitochondrial activity, affecting apoptosis pathways (Dai et al., 2015),  
54 and also induces premature extrusion of cortical granules, thus reducing sperm penetration and further  
55 embryonic development (Ghetler et al., 2006).

56 Pig oocytes are highly sensitive to cooling and freezing due to the large amount of lipids present in the  
57 cytoplasm (Galeati et al., 2011), which increase their susceptibility to oxidative stress and lipid  
58 peroxidation. Furthermore, vitrified pig oocytes have higher levels of reactive oxygen species (ROS)  
59 than their fresh counterparts (Gupta et al., 2010). As a result, developmental competence of pig  
60 oocytes is seriously affected by vitrification (Wu et al., 2013;Santos et al., 2017). Therefore, oxidative  
61 stress during pig oocyte vitrification and warming results in DNA damage and impairs fertilization and  
62 embryonic development (Galeati et al., 2011;Wu et al., 2013;Spricigo et al., 2017).

63 Glutathione (GSH) is a ubiquitous, major non-enzymatic antioxidant that plays a crucial role as a  
64 cellular protector and in the maintenance of intracellular redox status (Hansen and Harris,  
65 2014;Trapphoff et al., 2016). Glutathione may be found in its reduced form (GSH) or oxidized  
66 (glutathione disulfide, GSSG), and the GSH:GSSG ratio is used to estimate the redox state of the cell.  
67 Such a role is important for the protection of the oocyte against oxidative stress during vitrification  
68 (Marı et al., 2009). GSH is synthesized throughout oocyte maturation and its highest concentration is  
69 reached at the MII stage. Variations in intracellular GSH content or GSH-related GSH/GSSG redox  
70 potential ( $E_{\text{GSH}}$ ) can induce post-ovulatory aging, compromise male pronuclear formation, augment



71 apoptosis and impair embryonic development (Li et al., 2012). Somfai et al. (2007) showed that *in*  
72 *vitro* maturation (IVM) and cryopreservation significantly reduce overall GSH content in pig oocytes.  
73 Supplementing maturation media with GSH improves mitochondrial function and regulation of redox  
74 homeostasis (Trapphoff et al., 2016). Moreover, the addition of GSH to cryopreservation media  
75 stabilizes the nucleoprotein structure of frozen–thawed boar spermatozoa (Yeste et al., 2014) and  
76 increases blastocyst development of vitrified–warmed mouse oocytes (Moawad et al., 2017).

77 The composition of *in vitro* maturation media has strong impact on oocyte quality and cryotolerance.  
78 In this regard, supplementation of maturation and culture media with insulin-like growth factor I (IGF-  
79 I) stimulates oocyte maturation and promotes blastocyst development in several species (Kocyigit and  
80 Cevik, 2015;Pan et al., 2015;Arat et al., 2016;Chen et al., 2017). In pigs, although IGF-I has been  
81 reported to promote the synthesis of hyaluronic acid and the expansion of cumulus cells (Nemcova et  
82 al., 2007), its role in IVM remains unclear and has yield inconsistent results. Nevertheless, several  
83 studies reported that the addition of IGF-I during *in vitro* maturation and culture decreases apoptosis in  
84 bovine oocytes (Wasielak and Bogacki, 2007;Rodrigues et al., 2016;Ascari et al., 2017) and in porcine  
85 blastocysts (Wasielak et al., 2013). Wasielak et al. (2013) also demonstrated that adding IGF-1 at a  
86 concentration of 100ng/ml into maturation medium increases the *BCL2L1:BAX* transcript ratio in pig  
87 blastocysts, and the increased expression of anti-apoptotic genes, such as *BCL2*, and a decreased  
88 expression of apoptotic-related genes, such as *BAX*, indicates higher blastocyst quality (Chen et al.,  
89 2017). Finally, besides reducing apoptosis, IGF-I also enhances the expression of cold-inducible  
90 RNA-binding protein (CIRBP), which protects cells from vitrification and warming (Pan et al., 2015).

91 Against this background, the hypotheses were: (1) adding IVM medium with IGF-I improves the  
92 cryotolerance of pig oocytes via anti-apoptotic and heat shock signaling pathways; and (2)  
93 supplementation of vitrification–warming media with GSH protects the oocyte from oxidative stress.  
94 To test these hypotheses, the present study determined whether supplementing IVM medium with  
95 100ng/mL IGF-I and adding 2mM GSH to vitrification–warming media alter the viability, DNA  
96 integrity, developmental competence of vitrified–warmed IVM pig oocytes, as well as the relative  
97 transcript abundance of genes involved in antioxidant (*GPXI* and *SOD1*), apoptotic (*BAX*, *BCL2L1*)  
98 and stress responses (*HSPA1A*).

## 99 **2 Materials and Methods**

### 100 **2.1 Ethics and reagents**

101 The present study was carried out after institutional approval by Universidade Federal de Lavras,  
102 Brazil (UFLA). All experimental protocols accomplished the Ethical Principles of Animal  
103 Experimentation adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee Guidelines from this  
104 institution (protocol number 043/14).

105 Unless otherwise specified, all reagents were purchased from Sigma–Aldrich (St Louis, MO, USA).

### 106 **2.2 In vitro maturation (IVM) of cumulus–oocyte complexes (COCs)**

107 Ovaries were collected from pre-pubertal gilts at a local abattoir (Frigoríficos Costa Brava, S.A.;  
108 Girona, Spain) and immediately transported to the laboratory, inside an isolated recipient filled with  
109 physiological saline solution supplemented with 1mg·mL<sup>-1</sup> kanamycin sulphate and pre-warmed at  
110 38°C. Cumulus–oocyte complexes (COCs) were obtained by aspirating 3–6 mm follicles, using an 8-  
111 gauge needle attached to a 10mL disposable syringe. In each replicated, approximately 50 ovaries,

112 from 25 different gilts, were aspirated. After follicle aspiration, the conical tubes containing the  
 113 aspirated fluid were rested in a water bath at 38.5°C for 10 minutes. After this time, the supernatant  
 114 was removed to produce the follicular fluid necessary for supplementation of the *in vitro* maturation  
 115 media. Additionally, the pellet containing the COCs were transferred to a Petri dish (35mm, Nunc,  
 116 Denmark) prefilled with 3 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) containing 1mg·mL<sup>-1</sup>  
 117 polyvinyl alcohol (PVA), and then selected under a stereomicroscope. Only COCs with complete and  
 118 dense cumulus oophorus and homogenous cytoplasm were used. After three washes in the same  
 119 medium, groups consisting of 50 COCs were transferred into a Nunc 4-well multidish containing  
 120 500µL of modified North Carolina State University 37 (NCSU37) medium (Petters and Wells, 1993),  
 121 supplemented with 0.57mM cysteine, 5mg·mL<sup>-1</sup> insulin, 50µM β-mercaptoethanol and 10% (v/v)  
 122 porcine follicular fluid (PFF). COCs were cultured at 38.5°C in a humidified environment with 5%  
 123 CO<sub>2</sub> content in the air. The medium used for the first 22h of *in vitro* maturation was supplemented  
 124 with 1mM dibutyrylcAMP (dbcAMP), 10 IU·mL<sup>-1</sup> equine chorionic gonadotropin (eCG; Foligon;  
 125 Intervet International, Boxmeer, Netherlands) and 10 IU·mL<sup>-1</sup> human chorionic gonadotropin (hCG;  
 126 Chorulon; Intervet International, Boxmeer, Netherlands). After 20-22h of culture, COCs were  
 127 transferred into fresh maturation medium and cultured for a 20-22h period without any  
 128 supplementation (Funahashi et al., 1997). Besides the hormonal supplementation traditionally used in  
 129 the first 22-24 hours, half of selected oocytes is matured in presence of 100ng·mL<sup>-1</sup> of IGF-I, which  
 130 were added in the maturation media in both periods, in other words, the IGF-I supplementation was  
 131 made in the entire process.

### 132 **2.2.1 Evaluation of *in vitro* maturation**

133 *In vitro* maturation of oocytes was evaluated by orcein staining (Hunter and Polge, 1966). Briefly,  
 134 oocytes were mounted onto glass slides (less than five oocytes per slide) under coverslip (supported  
 135 with paraffin-vaseline corners) and fixed in ethanol: acetic acid (3:1; v: v) for 24h. Then, oocytes were  
 136 stained with 1% orcein (w: v) in 45% acetic acid (v: v) and assessed using a phase-contrast  
 137 microscope at 100x magnification. Oocytes were classified according to the stage of nuclear  
 138 maturation as germinal vesicle (GV), metaphase I (MI) and metaphase II/telophase I (MII/TI) (Fig. 1).

### 139 **2.3 Oocyte vitrification and warming**

140 *In vitro* matured oocytes were vitrified using the Cryotop carrier and the solution described by  
 141 Kuwayama et al. (2005). All manipulations were performed on a hot plate at 38.5°C under a laminar  
 142 flow hood in a room at 25°C. Briefly, immediately after *in vitro* maturation, presumptive matured  
 143 denuded oocytes were transferred into equilibration solution (ES) consisting of 7.5% ethylene glycol  
 144 (EG) and 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) in a holding medium, composed of TCM-199 HEPES and  
 145 supplemented with 20% foetal calf serum (FCS; GIBCO BRL, Invitrogen, Barcelona, Spain). After  
 146 10–15 min at 38.5°C, oocytes were transferred into 20-µL drops of vitrification solution (VS)  
 147 consisting of holding medium supplemented with 15% EG, 15% DMSO and 0.5M sucrose. After 30–  
 148 40s, oocytes were loaded into a manufactured Cryotop device with minimum volume of vitrification  
 149 solution and plunged immediately into liquid nitrogen. The entire process, from VS exposure to  
 150 plunging into liquid nitrogen was completed within 60s.

151 Vitrified oocytes were warmed by submerging Cryotop devices directly in thawing solution (holding  
 152 medium supplemented with 1M sucrose) at 39°C. After 1 min, oocytes were transferred into dilution  
 153 solution (0.5M sucrose dissolved in holding medium) for 3 min. Subsequently, oocytes were washed

154 twice for 5 min in TCM-199 HEPES supplemented with 20% FCS and then cultured in plain IVM  
155 medium for 2h.

## 156 **2.4 *In vitro* fertilization and embryo culture**

157 *In vitro* matured oocytes from all treatment groups were fertilized *in vitro* before and after vitrified-  
158 warmed process. Briefly, oocytes were washed twice with pre-equilibrated modified Tyrode's albumin  
159 lactate pyruvate (TALP) prior to being transferred in groups of 20 into four-well dishes containing  
160 250 $\mu$ L of fertilization medium per well. Fertilization medium consisted of TALP medium described  
161 by (Rath et al., 1999), supplemented with 3mg·mL<sup>-1</sup> fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) and  
162 1.1mM sodium pyruvate.

163 Sperm-rich fractions were collected by the gloved-hand technique from a mature Duroc boar known to  
164 be fertile. For *in vitro* fertilization, sperm cells were selected by washing through a two-step (50% and  
165 80%; v:v) Percoll gradient (Noguchi et al., 2013). Briefly, 2mL of 50% Percoll was layered on top of  
166 2mL of 80% Percoll in a 15mL conic centrifuge tube. Thereafter, 0.5mL of diluted semen (1:1 in BTS)  
167 was added with care to avoid mixing solutions. Samples were subsequently centrifuged at 700xg and  
168 24°C for 20 min. Supernatant layers were removed by aspiration; the resulting sperm pellet was re-  
169 suspended in 10mL pre-equilibrated TALP medium and then washed by centrifugation at 500xg and  
170 24°C for 5 min. The resulting pellet was re-suspended in the same medium and sperm concentration  
171 was determined with a Makler counting chamber (Sefi Medical Instruments; Haifa, Israel). Finally,  
172 and after appropriate dilution in TALP medium, 250 $\mu$ L of sperm suspension was added to each  
173 fertilization well containing oocytes to obtain a final concentration of 1 $\times$ 10<sup>6</sup> spermatozoa·mL<sup>-1</sup>.

174 At 1.5h post-insemination (h.p.i.), oocytes were washed and settled into culture with fresh TALP  
175 medium. After 7.5 h.p.i., extra spermatozoa were removed by repeated pipetting and presumptive  
176 zygotes were washed twice in culture medium and then transferred to 25- $\mu$ L culture droplets (15-20  
177 embryos/drop) under mineral oil (Nidoil; Nidacon, Sweden). The basic culture medium used for  
178 embryo development was a modified NCSU-23 medium (Petters and Wells, 1993) supplemented with  
179 0.57mM cysteine, 5mg·mL<sup>-1</sup> insulin, 10mL·mL<sup>-1</sup> minimum essential medium (MEM) non-essential  
180 amino acid solution, 20mL·mL<sup>-1</sup> basal medium Eagle (BME) amino acid solution and 4mg·mL<sup>-1</sup> BSA.  
181 From Day 0 (the day of IVF) to Day 2, the medium used for embryo culture contained sodium  
182 pyruvate (0.17mM) and sodium lactate (2.73mM) as energy sources. From Day 2 to Day 7, the basic  
183 culture medium contained glucose (5.55mM; (Castillo-Martin et al., 2014a). All incubations were  
184 performed at 38.5°C in a humidified environment with 5% CO<sub>2</sub> in air.

### 185 **2.4.1 Evaluation of fertilization and embryo development**

186 Presumptive zygotes were attached onto glass slides and fixed with the same protocol used to evaluate  
187 oocyte maturation. At 18 h.p.i., oocytes were evaluated under a phase-contrast microscope at 100 $\times$   
188 magnification and the following parameters were assessed: (1) penetration rate (number of fertilized  
189 oocytes/number of inseminated oocytes); (2) monospermy rate (number of oocytes containing only  
190 one male-head sperm pronucleus/number of penetrated oocytes); and (3) total efficiency of  
191 fertilization (number of monospermic oocytes/number of inseminated oocytes). Degenerated and  
192 immature oocytes were not considered. Embryo development was assessed under stereomicroscope  
193 based on of cleavage ( $\geq$  2-cell stage) at 48 h.p.i. and blastocyst rates (number of blastocysts at day  
194 7/number of cleaved embryos).

### 195 **2.5 Evaluation of DNA fragmentation and oocyte membrane integrity**

196 To determine plasma membrane integrity and DNA fragmentation of *in vitro* matured fresh and  
 197 vitrified-warmed oocytes, ethidium homodimer-1 staining (EthD-1) was combined with TUNEL assay  
 198 (In-Situ Cell Death Detection System; Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA) (Fatehi et al., 2005).  
 199 Briefly, denuded oocytes were rinsed in D-PBS containing  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVA and subsequently  
 200 incubated with  $4\mu\text{M}$  EthD-1 (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) in  
 201 PBS at  $37^\circ\text{C}$  in the dark for 5min. Oocytes were washed in PBS containing 0.3% polyvinylpyrrolidone  
 202 (PBS-PVP) and then fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science, Fort  
 203 Washington, PA, USA) in PBS at  $4^\circ\text{C}$  overnight.

204 After fixation, oocytes were washed four times in PBS-PVP and permeabilised with 0.1% (v/v) Triton  
 205 X-100 in PBS for 1h. Then, oocytes were washed twice in PBS-PVP and incubated in TUNEL  
 206 reaction cocktail at  $37^\circ\text{C}$  for 1h in a dark and humidified environment. Positive and negative control  
 207 samples were included in each assessment. Positive control consisted of a previous treatment with  
 208 DNase I ( $50\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in PBS-PVP at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min in the dark. Negative control did not contain the  
 209 terminal transferase. After washing in PBS-PVP, controls and samples were mounted with  $4\mu\text{L}$   
 210 Vectashield Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing 4', 6-diamidino-2-  
 211 phenylindole (DAPI, 1.5 mg/ml) on a microscopic slide, and then covered with a coverslip. Stained  
 212 oocytes were examined under a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1; Carl Zeiss,  
 213 Oberkochen, Germany), at excitation wavelengths of 365nm for DAPI, 485nm for TUNEL  
 214 (conjugated with fluorescein isothiocyanate, FITC) and 580nm for EthD-1.

215 Total number of oocytes (DAPI<sup>+</sup>; blue), number of non-viable oocytes (EthD-1<sup>+</sup>; red stain) and  
 216 number of oocytes with fragmented DNA (TUNEL<sup>+</sup>; green) were counted (Fig. 2). According to the  
 217 obtained colorations, oocytes were classified as: a) viable oocytes with intact DNA (TUNEL<sup>-</sup>/EthD-1<sup>-</sup>  
 218 ); b) non-viable oocytes with intact DNA (TUNEL<sup>-</sup>/EthD-1<sup>+</sup>) and non-viable oocytes with fragmented  
 219 DNA (TUNEL<sup>+</sup>/EthD-1<sup>+</sup>).

## 220 **2.6 RNA extraction and quantitative real-time PCR analysis (qPCR)**

221 *In vitro* matured and vitrified-warmed oocytes from all treatments were collected for analysis.  
 222 Immediately after maturation *in vitro* and vitrification recovery gene expression time denuded oocytes  
 223 were washed three times in D-PBS containing  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVA at  $38.5^\circ\text{C}$ , snap-frozen in liquid nitrogen  
 224 and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until mRNA extraction and reverse transcription.

225 Poly(A)-RNA extraction was performed with pools of 20 oocytes per experimental group, following  
 226 the manufacturer's instructions, using the Dynabeads mRNA Direct Extraction Kit (DynaL Biotech;  
 227 Oslo, Norway) with minor modifications. In brief, each pool of oocytes was lysed in  $50\mu\text{L}$  of Lysis  
 228 buffer for 5 min; the resulting lysate was then hybridized with  $10\mu\text{L}$  pre-washed beads for 5 min. After  
 229 hybridisation, poly(A)-RNA-bead complexes were washed twice in  $50\mu\text{L}$  washing buffer A and twice  
 230 in  $50\mu\text{L}$  washing buffer B. Next, samples were diluted in  $16\mu\text{L}$  elution buffer and heated to  $70^\circ\text{C}$  for 5  
 231 min. Following this,  $4\mu\text{L}$  qScript cDNA supermix (Quanta Biosciences; Gaithersburg, MD, USA) was  
 232 added and the Reverse Transcription (RT) reaction was carried by out using oligo-dT primers, random  
 233 primers, dNTPs and qScript reverse transcriptase. The RT reaction was performed in a thermocycler  
 234 (Quanta Biosciences; Gaithersburg, MD, USA) at the following conditions: first step of 5 min at  $25^\circ\text{C}$ ,  
 235 followed by 1h at  $42^\circ\text{C}$  for RT of mRNA, and 10 min at  $70^\circ\text{C}$  to inactivate the RT enzyme. After RT,  
 236 cDNA was diluted with  $25\mu\text{L}$  elution solution and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

237 The relative abundance of mRNA (cDNA) transcripts was determined by real-time quantitative PCR  
 238 (qPCR) using the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). The

239 qPCR reaction mix contained 10 $\mu$ L Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City,  
 240 California, USA), 0.25 $\mu$ L forward primer and 0.25 $\mu$ L reverse primer (Life Technologies, Madrid,  
 241 Spain) specific for the genes of interest and 2.5 $\mu$ L cDNA template. Final volume of 20 $\mu$ L was reached  
 242 by adding nuclease-free water. PCR amplification was carried out with one step of denaturation at  
 243 95°C for 5 min; 45 cycles of amplification with denaturation step at 94°C for 15 s, annealing step for  
 244 30 s at the appropriate annealing temperature for primers; and extension step at 72°C for 40 s. The  
 245 identity of PCR products was verified with gel electrophoresis (2% agarose gel containing 0.1  $\mu$ L $\cdot$ mL<sup>-1</sup>  
 246 SafeView; Applied Biological Materials, Vancouver, Canada). Three technical replicates per  
 247 biological replicate and individual gene were evaluated. Furthermore, no-RT control, where the  
 248 reverse transcription was carried out without RT enzyme, and no template control (NTC), where PCR  
 249 was conducted without cDNA template, were included for each probe set to ensure that no cross-  
 250 contamination occurred (i.e. negative controls).

251 Five separate genes, BCL-2 associated X protein (*BAX*), BCL2-like 1 (*BCL2L1*), heat shock protein 70  
 252 (*HSPA1A*), glutathione peroxidase (*GPXI*) and cytosolic copper-zinc-containing superoxide dismutase  
 253 (*SOD1*), plus an endogenous control gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*),  
 254 were amplified (Table 1). The comparative threshold cycle ( $C_T$ ) method was used to quantify relative  
 255 gene expression levels and quantification was normalized using the endogenous control (*GAPDH*). To  
 256 determine the threshold cycle for each sample, fluorescence data were acquired after each elongation  
 257 step. Following the comparative  $C_T$  method, the  $\Delta C_T$  value was determined by subtracting the  
 258 *GAPDH*- $C_T$  value of each sample from the  $C_T$  value of each target gene within the sample. Calculation  
 259 of  $\Delta\Delta C_T$  involved using the highest sample  $\Delta C_T$  value (i.e. the sample with the lowest target gene  
 260 expression) as an arbitrary constant to subtract from all other  $\Delta C_T$  sample values. Fold differences in  
 261 relative transcript abundance were calculated for target genes assuming an amplification efficiency of  
 262 100% and using the formula  $2^{(\Delta\Delta C_T)}$ .

## 263 2.7 Experimental design

264 Two experiments were designed to determine whether the addition of IGF-I to conventional IVM  
 265 medium and that of GSH to vitrification-warming media improved oocyte survival and development  
 266 capacity after vitrification and warming. Based on previous reports and preliminary experiments  
 267 conducted in our lab, the treatments tested were IGF-I at 100ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> (Wasielak et al., 2013) and GSH  
 268 at 2 mM (0.62 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) (Yeste et al., 2014).

269 In experiment 1, cumulus–oocyte complexes (COCs) obtained from pre-pubertal gilts ovary were  
 270 selected and matured *in vitro* in conventional IVM medium (control) or in the same medium  
 271 supplemented with 100ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> IGF-I. Between 40 and 44 hours after the onset of IVM, half of the  
 272 oocytes in each treatment group were vitrified and warmed in conventional medium (control vitrified-  
 273 warmed), or in the same medium added with 2mM GSH. The other half of oocytes was used to  
 274 evaluate maturation rates and the quality of non-vitrified IVM oocytes. Before quality evaluations,  
 275 vitrified-warmed oocytes were incubated for an additional 2-h period in their respective IVM medium  
 276 and were then collected to assess viability and DNA fragmentation (n=12 replicates) and gene  
 277 expression (n = 4 replicates). Additionally, the experiment 2 was conducted for evaluated the influence  
 278 of IGF-I and GSH on development embryotic capacity of vitrified-warmed oocytes. In this  
 279 experiment, the process of maturation, vitrification and warming, is the same of experiment 1.  
 280 However, after two hours of vitrification recovery, oocytes from each treatment group were *in vitro*  
 281 fertilized and cultured, and the rates of fertilization, monospermy fecundation, cleavage and  
 282 blastocyst development were determinate.

## 283 2.8 Statistical analyses

284 All statistical analyses were conducted using a statistical package (IBM SPSS for Windows, Version  
285 23.0; Armonk, NY, USA). All parameters were previously checked for normality and homogeneity of  
286 variances (homocedasticity) using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. When necessary, data  
287 were transformed through arcsine square root ( $\arcsin\sqrt{x}$ ).

288 In experiment 1, the effects of supplementing IVM with IGF-I on *in vitro* maturation were determined  
289 with a *t*-test for independent samples. The effects of treatment (i.e. IGF-I, GSH, IGF-I+GSH) and  
290 vitrification (i.e. fresh *vs.* vitrified-warmed) on oocyte viability, DNA fragmentation and relative  
291 expression of *BAX*, *BCL2L1*, *HSPA1A*, *GPX1* and *SOD1* were determined with using a two-way  
292 ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons. In experiment 2, the same  
293 tests were used and independent variables were penetration, monospermy and cleavage rates, total  
294 efficiency of fertilization, and blastocyst formation. When, despite transformed, data did not fit with  
295 parametric assumptions, a non-parametric Scheirer-Ray-Hare ANOVA for ranked data was run. The  
296 Mann-Whitney test was used for pair-wise comparisons.

297 Data are expressed as means  $\pm$  standard error for the mean (SEM). In all cases,  $P \leq 0.05$  was considered  
298 as significant.

## 299 3 Results

### 300 3.1 Effects of supplementing IVM medium with IGF-I and vitrification-warming solutions with 301 GSH on oocyte maturation, viability and DNA fragmentation

302 A total of 654 oocytes from 12 replicates were evaluated after 44h of IVM. Supplementation of IVM  
303 medium with IGF-I did not affect oocyte maturation, as the proportion of oocytes in all nuclear stages  
304 was similar when control and IGF-I groups were compared (Fig. 3).

305 With regard to oocyte viability and DNA fragmentation, the percentages of viable, fresh oocytes with  
306 intact DNA was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that observed for vitrified-warmed oocytes. Non-  
307 vitrified oocytes presented similar viability and DNA fragmentation rates for both treatment groups  
308 (i.e. control and IGF-I) (Fig. 4).

309 As far as in vitrified-warmed oocytes ~~are concerned~~, previous *in vitro* maturation in the presence of  
310  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  IGF-I or supplementation of vitrification-warming solutions with 2mM GSH significantly  
311 ( $P < 0.05$ ) increase the proportion of viable oocytes with intact DNA. Remarkably, the highest  
312 proportion of viable vitrified-warmed oocytes with intact DNA was found when they were  
313 simultaneously *in vitro* matured in the presence of IGF-I and vitrified-warmed in a medium  
314 supplemented with GSH (Fig. 4A). The same results were obtained when the proportion of non-viable  
315 oocytes ~~with~~ to fragmented DNA was evaluated (Fig. 4B).

### 316 3.2 Effects of supplementing IVM medium with IGF-I and vitrification-warming solutions with 317 GSH on the expression of *BAX*, *BCL2L1*, *HSPA1A*, *GPX1* and *SOD1*

318 Data regarding relative transcript abundances produced in response to the presence of both IGF-I in  
319 IVM medium and GSH in vitrification-warming media are shown in Fig. 5. Supplementation of IVM  
320 medium with IGF-I had no effect on the expression profiles of *BAX*, *BCL2L1*, *HSPA1A*, *GPX1* and  
321 *SOD1* genes in fresh oocytes. In contrast, supplementing IVM maturation medium with IGF-I and

322 addition of vitrification-warming solutions with GSH ( $P<0.05$ ) positively affected the expression of  
 323 *BAX*, *HSPA1A* and *GPXI* in vitrified-warmed oocytes but did not alter that of the *SOD1* gene.

324 A higher expression of *HSPA1A* was observed after vitrification-warming in all treatment groups, but  
 325 the extent of that increase was significantly ( $P<0.05$ ) higher in those that were *in vitro* matured in the  
 326 presence of IGF-I, with or without GSH. On the other hand, while the relative abundance of *GPXI*-  
 327 transcripts was significantly higher after cryopreservation, supplementing vitrification-warming  
 328 solutions with GSH led to the highest expression of this gene ( $P<0.05$ ; see Fig. 5). Moreover, relative  
 329 abundance of *GPXI*-transcripts was also significantly ( $P<0.05$ ) higher in vitrified-warmed oocytes that  
 330 had been *in vitro* matured with IGF-I.

331 Relative transcript abundance of *BCL2L1* gene was significantly ( $P<0.05$ ) higher in vitrified-warmed  
 332 oocytes than the fresh oocytes, regardless of supplementing IVM and vitrification-warming media  
 333 with IGF-I and GSH, respectively. Conversely, although relative *BAX*-transcript abundance was  
 334 significantly ( $P<0.05$ ) higher in control vitrified-warmed oocytes, previous *in vitro* maturation with  
 335 IGF-I and addition of vitrification-warming solutions with GSH did counteract that increase (Fig. 5).  
 336 Therefore, the level of transcripts for the *BAX* gene was similar between fresh and vitrified-matured  
 337 treated oocytes. Furthermore, the *BAX:BCL2L1* ratio was significantly ( $P<0.05$ ) higher in fresh  
 338 oocytes than in those vitrified after maturation with IGF-I or vitrified with GSH (Fig 5).

### 339 **3.3 Effects of supplementing IVM medium with IGF-I and vitrification-warming solutions with** 340 **GSH on monospermy and penetration rates, and on embryo development**

341 Addition of IVM with IGF-I did not influence monospermy, penetration, cleavage and blastocyst rates  
 342 in embryos derived from fresh oocytes (Fig. 6). Monospermy, penetration and cleavage rates, as well  
 343 as the blastocyst development, were significantly ( $P<0.05$ ) lower in embryos derived from vitrified-  
 344 warmed oocytes than in those derived from their fresh counterparts (Table 2). However, penetration  
 345 rates of vitrified-warmed control oocytes were significantly ( $P<0.05$ ) lower than those previously  
 346 matured in the presence of IGF-I (Fig. 6). Furthermore, when assessing IVF rates for vitrified-warmed  
 347 oocytes, cleavage rates were significantly ( $P<0.05$ ) higher in oocytes previously matured with IGF-I  
 348 and vitrified-warmed with GSH than in control oocytes (Fig. 6). Conversely, neither the addition of  
 349 IVM medium with IGF-I nor supplementing vitrification-warming solutions with GSH influenced  
 350 monospermy rates.

351 Regarding embryo development, the total number of blastocysts formed was negatively affected by the  
 352 vitrification-warming technique, regardless of the composition of IVM and vitrification-warming  
 353 media (Table 2). Nevertheless, when blastocyst rates were evaluated, that is, the ratio of blastocyst  
 354 formed to cleavage oocytes (% blastocyst at day 7), significant ( $P<0.05$ ) differences between fresh and  
 355 vitrified-warmed oocytes groups were found. Indeed, fresh oocytes matured with IGF-I gave  
 356 significantly ( $P<0.05$ ) higher blastocyst rates than oocytes vitrified-warmed without GSH (Fig. 6). In  
 357 spite of the addition of IGF-I to the maturation medium and GSH in the vitrification and warming  
 358 media did not improve the rate of cleavage and percentage of blastocyst formed, in making the relation  
 359 between these two parameters, vitrified-warmed oocytes in the presence of GSH presented blastocyst  
 360 rate similar to the group of fresh oocytes matured with IGF-I (Table 2).

## 361 **4 Discussion**

362 Our results suggest that supplementing maturation medium with IGF-I and vitrification-warming  
 363 solutions with GSH improve the quality and cryotolerance of IVM pig oocytes. Moreover, addition of

364 IGF-I to IVM medium and/or of GSH to vitrification-warming solutions also has some beneficial  
365 effect on survival rates and developmental competence, and affects the relative transcript abundance of  
366 genes related to apoptosis and heat stress. These results are important, as oocyte cryopreservation is  
367 known to decrease cell viability and DNA integrity, as well as the cleavage and blastocyst rates of  
368 embryos derived from these oocytes. Therefore, a modified composition of IVM and vitrification-  
369 warming media with IGF-I and GSH, respectively, appears to better preserve *in vitro* matured pig  
370 oocytes. This is especially important as, because of the composition of their cytoplasm and plasma  
371 membrane, oocyte cryopreservation in pigs is considered to be more difficult than in other mammalian  
372 species (Galeati et al., 2011).

373 With regard to the addition of IGF-I to IVM medium, it is worth noting that previous studies have  
374 reported its positive effect on follicular cell proliferation, oocyte maturation and steroidogenesis  
375 (Nemcova et al., 2007;Mani et al., 2010;Xie et al., 2016;Sato et al., 2018). However, our results show  
376 that nuclear maturation rates of pig oocytes matured in the presence of  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  IGF-I do not differ  
377 from the control group. Other studies can help us explain these results. Oberlender et al. (2013b)  
378 divided recovered pig oocytes into two groups: (1) oocytes from small follicles (2-4mm) and oocytes  
379 from large follicles (5-8mm), and submitted them to *in vitro* maturation in the presence of IGF-I.  
380 These authors observed that the addition of IGF-I at concentrations around  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  to IVM  
381 medium increased the maturation rates of small follicles. In contrast, IGF-I had no effect on IVM  
382 when used on large follicles. These data indicate that during follicular growth, changes crucial for  
383 oocyte maturation occur in cumulus cells and in the factors present in the follicular fluid. As high  
384 quality oocytes from 3-6mm follicles were used in this experiment, and the average maturation rate  
385 obtained was higher than 80%, regardless of IVM media composition, which is considered as good  
386 (Zhang et al., 2012), the effects of IGF-I on oocyte maturation could have been not apparent enough.  
387 In addition, the fact that IGF-I concentration in pig follicles with 4mm or larger is about  $171\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$   
388 (Oberlender et al., 2013a) could explain why there were no significant effects of IGF-I on IVM rate.

389 Besides the direct influence on oocyte maturation, the anti-apoptotic effect of IGF-I leads to  
390 hypothesize that supplementing maturation media with this growth factor may increase oocyte  
391 cryotolerance. As expected, we observed that vitrification-warming significantly affected the viability  
392 and DNA integrity of pig oocytes. However, when these cells had been previously matured in a  
393 medium supplemented with IGF-I, the percentage of viable oocytes with intact DNA after  
394 vitrification-warming was higher than that observed for oocytes matured and vitrified in standard  
395 media. These results match with previous studies conducted with pig blastocysts in which  
396 supplementing culture medium with IGF-I was found to reduce DNA fragmentation and apoptosis  
397 indexes (Dhali et al., 2011;Ascari et al., 2017) by downregulating the expression of *BAX* and  
398 upregulating that of *BCL-2* (Wasielak et al., 2013;Pan et al., 2015). To explain these results, one  
399 should bear in mind that *BAX* is a pro-apoptotic gene involved in cell death and oocyte degeneration.  
400 Following death stimuli (temperature, toxicants or oxidative stress), the *BAX*-linked pathway is  
401 activated and the apoptosis cascade is initiated (Finucane et al., 1999). In this study, the addition of  
402 IGF-I to oocyte maturation medium significantly reduced the relative abundance of *BAX* transcripts  
403 after vitrification-warming, the levels being similar to those found in fresh oocytes. The apoptotic  
404 process is related with the balance between pro- and anti-apoptotic genes. While *BAX* family indicates  
405 the activation of an apoptosis cascade, the members of the *BCL-2* family (anti-apoptotic gene) form  
406 heterodimers with apoptotic genes and block their function (Kim et al., 2006). However, no changes in  
407 the expression of *BCL2L1* were found, in a similar fashion to that observed for pre-implanted bovine  
408 embryos by (Block et al., 2008). In contrast, Kim et al. (2006) evaluated the effects of IGF-I on IVF  
409 pig embryos and observed that IGF-I enhanced the expression of *BCL2L1* and decreased that of *BAX*.  
410 In addition to the expression of *BAX* and *BCL2L1*, we also calculated the *BAX*: *BCL2L1* ratio, which



411 determines the susceptibility of a cell to apoptosis and determines cell survival or death (Oltvai et al.,  
412 1993). In the current study, although no differences were found in *BCL2L1* expression, the *BAX*:  
413 *BCL2L1* ratio has the lowest in vitrified-warmed oocytes matured in presence of IGF-I and/or  
414 vitrified with GSH. This suggests that IGF-I is able to modulate the apoptotic response (Laviola et al.,  
415 2007) and also supports the protective effect of GSH (Hansen and Harris, 2014).

416 Vitrified-warmed oocytes matured with IGF-I presented the highest relative transcript abundance of  
417 *HSPA1A*. Heat shock proteins (HSPs) play a critical role in the response to environmental stressful  
418 stimuli, including the oxidative stress generated during oocyte maturation and embryo culture  
419 (Bernardini et al., 2004) and the thermal stress caused by vitrification-warming procedures (Castillo-  
420 Martin et al., 2015). HSPs are a set of highly conserved proteins synthesized in response to stress,  
421 which act as molecular chaperones to maintain cellular homeostasis. The intracellular response  
422 triggered by IGF-I is modulated by IGF-1-like signaling (IIS) pathway (Laviola et al., 2007), which  
423 positively regulates the activity of heat shock factor-1 (HSF-1) (Chiang et al., 2012). HSF-1, in turn,  
424 upregulates the transcription of genes involved in the heat-shock response, such as *HSPA1A* (Chiang  
425 et al., 2012). The present study showed that the relative transcript abundance of *HSPA1A* was higher  
426 in vitrified-warmed oocytes, especially in those previously cultured with IGF-I.

427 Cryotolerance of oocytes does not only depend on their quality, but also on the conditions provided  
428 during vitrification and warming processes. These procedures, as well as other stressing factors, have  
429 been reported to disturb the oxidation–reduction (redox) status by both decreasing the reduced  
430 glutathione (GSH) content and increasing intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in mice  
431 (Moawad et al., 2017) and pig oocytes (Somfai et al., 2007; Gupta et al., 2010). Intracellular GSH  
432 content is positively correlated with oocyte quality (Hara et al., 2014) and this study indicates that pig  
433 oocytes that are vitrified-warmed in GSH-supplemented media show better viability and DNA  
434 integrity than those vitrified-warmed in standard media. These results agree with previous works in  
435 which GSH was used to improve gamete preservation. Trapphoff et al. (2016) observed that  
436 supplementing IVM media with GSH increases cryotolerance of mice oocytes by reducing ROS  
437 content and protecting the chromosomal structure. Picco et al. (2010) showed that addition of  
438 maturation medium with zinc increases intracellular GSH content and DNA integrity of cumulus cells  
439 and bovine oocytes, and this has a positive impact on embryo development. Yeste et al. (2014)  
440 demonstrated that supplementing cryopreservation medium with 2mM GSH protects the nucleoprotein  
441 structure and maintains the viability of frozen-thawed boar sperm. It is important to emphasize that, in  
442 this present study, the highest survival rates were found when pig oocytes were previously matured  
443 with 100ng·mL<sup>-1</sup> IGF-I and were vitrified-warmed with 2mM GSH. Therefore, both substances appear  
444 to have a synergistic effect.

445 The pathway through which GSH protects the oocytes from the damage inflicted by vitrification-  
446 warming remains unknown. What is known is that the generation of endogenous GSH in the oocytes is  
447 essential for their protection against the oxidative stress and other forms of cellular injury (Somfai et  
448 al., 2007; Trapphoff et al., 2016; Moawad et al., 2017). Therefore, and in the light of our results, it is  
449 reasonable to suggest that supplementation of vitrification-warming media with GSH partly  
450 counteracts the damaging effects of vitrification by preventing lipid peroxidation in the oocyte and  
451 removing the excessive ROS in the medium. Additionally, the positive effect of GSH on the viability  
452 and DNA integrity of vitrified-warmed oocytes observed in this study could be explained by the  
453 increase in the relative transcript abundance of *GPXI* and the decrease in that of *BAX*. Related with  
454 this, relative *GPXI*-transcript abundance has been correlated with embryo quality in cattle, with  
455 excellent/good blastocysts having higher expression of *GPXI* in comparison with blastocysts of lower  
456 quality (Cebrian-Serrano et al., 2013). Castillo-Martin et al. (2014b) found a positive correlation

457 between *GPXI* and survival rates of vitrified-warmed porcine blastocysts at 24h post-warming.  
458 Glutathione peroxidase is involved in the redox balance of cells and is responsible for scavenging  
459 hydrophilic peroxide species, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Therefore, with an increase in the  
460 antioxidant enzyme content, there is a decrease in the intracellular peroxide levels. Moreover, high  
461 ROS levels causes injury on mitochondrial function, which can trigger the intrinsic apoptotic pathway  
462 in oocytes and granulosa cells (Dai et al., 2015). This helps explain our results as if the increase in  
463 relative *GPXI*-transcript abundance is involved in the reduction of intracellular ROS concentration,  
464 the activation of the apoptosis cascade would be reduced, which would agree with the observed  
465 decrease in the relative *BAX*-transcript abundance.

466 Our data indicate that neither supplementation of IVM with IGF-I nor addition of GSH to vitrification-  
467 warming media improve blastocyst development or cleavage rates of vitrified-warmed oocytes.  
468 However, when pig oocytes are matured with IGF-I and vitrified-warmed with GSH, cleavage rates  
469 are better than matured oocytes vitrified-warmed in standard medium. Moreover, when oocytes are  
470 vitrified-warmed with GSH, the percentage of cleaved embryos that developed into blastocysts is  
471 similar to that of vitrified-warmed fresh oocytes, regardless of the composition of maturation medium.  
472 Oocyte developmental competence is related to meiotic spindle and chromosomal configuration and  
473 vitrified-warmed IVM oocytes show lower blastocyst rates due to meiotic spindle disorganization and  
474 the consequent chromosomal dispersion (Fu et al., 2009; Gupta et al., 2010). Trapphoff et al. (2016)  
475 showed a protective effect of GSH on spindle organization and chromosome alignment of mice  
476 oocytes, and Moawad et al. (2017) found that developmental potential of mice embryos was higher  
477 when vitrified with GSH. The spindle could be particularly protected by GSH because higher GSH  
478 content prevents oxidation of cysteine sulfhydryl-groups of  $\alpha\beta$  tubulin dimers (Zhang et al., 2012). In  
479 spite of this, one should note that the effects of supplementing vitrification-warming media with GSH  
480 could differ between species, as (Hara et al., 2014) reported that high content of GSH in matured  
481 bovine oocytes does not suppress the high incidence of multiple aster formation or improves embryo  
482 development.

483 In conclusion, supplementation of IVM medium with 100ng·mL<sup>-1</sup> IGF-I and addition vitrification-  
484 warming solutions with 2mM GSH improve survival and DNA integrity rate of vitrified-warmed  
485 oocytes, and also increases the relative transcript abundances of *HSPA1A* and *GPXI*, and decreases  
486 that of *BAX*. When added together to maturation and vitrification-warming media, respectively, IGF-I  
487 and GSH increase cleavage rates in comparison of vitrified-warmed oocytes control, and promoted  
488 similar values of blastocyst rates (formed blastocyst: cleavage oocytes) between vitrified-warmed  
489 oocytes and fresh oocytes. Our results support the relevance of the *in vitro* maturation process for  
490 oocyte cryotolerance and demonstrates the suitability of IGF-I and GSH as additives for maturation  
491 and vitrification-warming media.

#### 492 **Acknowledgements**

493 This study was supported by Spanish (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain; Grant Code:  
494 RYC-2014-15581) and Brazil governments (Scheme for Improvement of Higher Level Personnel,  
495 CAPES, Grant Code: PVE 88881.030399/2013-01; and National Council for Scientific and  
496 Technological Development, CNPq, Grant Code: 446288/2014-4 and PQ 305478/2015-0). The  
497 authors would like to thank the staff of TechnoSperm Lab, University of Girona, for their technical  
498 support. The authors also thank the slaughterhouse Frigoríficos Costa Brava, S.A. (Riudellots de la  
499 Selva, Girona, Spain) for kindly providing the pig ovaries.

#### 500 **Author Contribution**

501 B.P., M.Y., M.Z. and J.E. designed the experiments. B.P, M.C., B.G. and B.C. carried out the lab  
 502 work. B.P. wrote the manuscript with the support from M.Y. M.Y. and M.Z. supervised the project.  
 503 M.C., S.B. and J.E. helped supervise the project.

504 **Declaration of interest**

505 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the  
 506 impartiality of the research reported.

507 **References**

- 508 Arat, S., Caputcu, A.T., Cevik, M., Akkoc, T., Cetinkaya, G., Bagis, H. (2016) Effect of growth  
 509 factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of  
 510 cloned bovine embryos. *Zygote* 24, 554-562.
- 511 Ascari, I.J., Alves, N.G., Jasmin, J., Lima, R.R., Quintao, C.C.R., Oberlender, G., Moraes, E.A.,  
 512 Camargo, L.S.A. (2017) Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of  
 513 bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species,  
 514 mitochondrial activity and oocyte competence. *Domest Anim Endocrinol* 60, 50-60.
- 515 Bernardini, C., Fantinati, P., Zannoni, A., Forni, M., Tamanini, C., Bacci, M.L. (2004) Expression of  
 516 HSP70/HSC70 in swine blastocysts: effects of oxidative and thermal stress. *Mol Reprod Dev*  
 517 69, 303-307.
- 518 Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D., Hansen, P.J. (2008) Effects of insulin-like  
 519 growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in  
 520 vitro. *Mol Reprod Dev* 75, 895-903.
- 521 Castillo-Martin, M., Bonet, S., Morato, R., Yeste, M. (2014a) Comparative effects of adding beta-  
 522 mercaptoethanol or L-ascorbic acid to culture or vitrification-warming media on IVF porcine  
 523 embryos. *Reprod Fertil Dev* 26, 875-882.
- 524 Castillo-Martin, M., Bonet, S., Morato, R., Yeste, M. (2014b) Supplementing culture and vitrification-  
 525 warming media with l-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine  
 526 blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. *Cryobiology* 68, 451-458.
- 527 Castillo-Martin, M., Yeste, M., Pericuesta, E., Morato, R., Gutierrez-Adan, A., Bonet, S. (2015)  
 528 Effects of vitrification on the expression of pluripotency, apoptotic and stress genes in in  
 529 vitro-produced porcine blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 27, 1072-1081.
- 530 Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., Garcia-Rosello, E., Pericuesta, E., Perez-Cerezales, S., Gutierrez-  
 531 Adan, A., Coy, P., Silvestre, M.A. (2013) Effect of the bovine oviductal fluid on in vitro  
 532 fertilization, development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts.  
 533 *Reprod Domest Anim* 48, 331-338.
- 534 Chen, P., Pan, Y., Cui, Y., Wen, Z., Liu, P., He, H., Li, Q., Peng, X., Zhao, T., Yu, S. (2017) Insulin-  
 535 like growth factor I enhances the developmental competence of yak embryos by modulating  
 536 aquaporin 3. *Reprod Domest Anim* 52, 825-835.
- 537 Chiang, W.-C., Ching, T.-T., Lee, H.C., Mousigian, C., Hsu, A.-L. (2012) A complex containing  
 538 DDL-1 and HSF-1 links insulin-like signaling to heat-shock response in *C. elegans*. *Cell* 148,  
 539 322-334.
- 540 Dai, J., Wu, C., Muneri, C.W., Niu, Y., Zhang, S., Rui, R., Zhang, D. (2015) Changes in mitochondrial  
 541 function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and  
 542 developmental ability. *Cryobiology* 71, 291-298.
- 543 Dhali, A., Anchamparuthy, V.M., Butler, S.P., Mullarky, I.K., Pearson, R.E., Gwazdauskas, F.C.  
 544 (2011) Development and quality of bovine embryos produced in vitro using growth factor  
 545 supplemented serum-free system. *Open J Anim Sci* 1, 97-105.

- 546 Fatehi, A.N., Hurk, R.V.D., Colenbrander, B. (2005) Expression of bone morphogenetic protein2 ( BMP2 ), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and  
547 BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development.  
548 63, 872-889.
- 550 Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G., Green, D.R. (1999) Bax-induced  
551 caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by  
552 Bcl-xL. *J Biol Chem* 274, 2225-2233.
- 553 Fu, X.-W., Shi, W.-Q., Zhang, Q.-J., Zhao, X.-M., Yan, C.L., Hou, Y.-P., Zhou, G.-B., Fan, Z.-Q.,  
554 Suo, L., Wusiman, A., Wang, Y.-P., Zhu, S.-E. (2009) Positive effects of Taxol pretreatment  
555 on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in  
556 vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Anim Reprod Sci* 115, 158-168.
- 557 Funahashi, H., Cantley, T.C., Day, B.N. (1997) Synchronization of meiosis in porcine oocytes by  
558 exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence  
559 following in vitro fertilization. *Biol Reprod* 57, 49-53.
- 560 Galeati, G., Spinaci, M., Vallorani, C., Bucci, D., Porcu, E., Tamanini, C. (2011) Pig oocyte  
561 vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration  
562 and in vitro fertilization. *Anim Reprod Sci* 127, 43-49.
- 563 Ghetler, Y., Skutelsky, E., Ben Nun, I., Ben Dor, L., Amihai, D., Shalgi, R. (2006) Human oocyte  
564 cryopreservation and the fate of cortical granules. *Fertility and Sterility* 86, 210-216.
- 565 Gupta, M.K., Ph, D., Uhm, S.J., Ph, D., Lee, H.T., Ph, D. (2010) Effect of vitrification and beta-  
566 mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes  
567 vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 93, 2602-2607.
- 568 Hansen, J.M., Harris, C. (2014) Glutathione during embryonic development. *BBA - General Subjects*,  
569 1-16.
- 570 Hara, H., Yamane, I., Noto, I., Kagawa, N., Kuwayama, M., Hirabayashi, M., Hochi, S. (2014)  
571 Microtubule assembly and in vitro development of bovine oocytes with increased intracellular  
572 glutathione level prior to vitrification and in vitro fertilization. *Zygote* 22, 476-482.
- 573 Hunter, R.H., Polge, C. (1966) Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human  
574 chorionic gonadotrophin. *J Reprod Fertil* 12, 525-531.
- 575 Kim, S., Lee, S.H., Kim, J.H., Jeong, Y.W., Hashem, M.A., Koo, O.J., Park, S.M., Lee, E.G., Hossein,  
576 M.S., Kang, S.K., Lee, B.C., Hwang, W.S. (2006) Anti-apoptotic effect of insulin-like growth  
577 factor (IGF)-I and its receptor in porcine preimplantation embryos derived from in vitro  
578 fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 73, 1523-1530.
- 579 Kocyigit, A., Cevik, M. (2015) Effects of leukemia inhibitory factor and insulin-like growth factor-I  
580 on the cell allocation and cryotolerance of bovine blastocysts. *Cryobiology* 71, 64-69.
- 581 Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O. (2005) Comparison of open and closed methods for  
582 vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive*  
583 *BioMedicine Online* 11, 608-614.
- 584 Laviola, L., Natalicchio, A., Giorgino, F. (2007) The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 13,  
585 663-669.
- 586 Li, S., Bian, H., Liu, Z., Wang, Y., Dai, J., He, W., Liao, X., Liu, R., Luo, J. (2012) Chlorogenic acid  
587 protects MSCs against oxidative stress by altering FOXO family genes and activating intrinsic  
588 pathway. *Eur J Pharmacol* 674, 65-72.
- 589 Mani, A.M., Fenwick, M.A., Cheng, Z., Sharma, M.K., Singh, D., Wathes, D.C. (2010) IGF1 induces  
590 up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of  
591 phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction* 139,  
592 139-151.
- 593 Mari, M., Morales, A., Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C. (2009) Mitochondrial  
594 Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11, 2685-2700.

- 595 Moawad, A.R., Tan, S.L., Taketo, T. (2017) Beneficial effects of glutathione supplementation during  
596 vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage on their preimplantation  
597 development following maturation and fertilization in vitro. *Cryobiology* 76, 98-103.
- 598 Nemcova, L., Nagyova, E., Petlach, M., Tomanek, M., Prochazka, R. (2007) Molecular mechanisms  
599 of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine  
600 oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod* 76, 1016-1024.
- 601 Noguchi, M., Yoshioka, K., Hikono, H., Iwagami, G., Suzuki, C., Kikuchi, K. (2013) Centrifugation  
602 on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing  
603 ability of frozen – thawed boar sperm. *Zygote* 23, 68-75.
- 604 Oberlender, G., Murgas, L.D., Pontelo, T.P., A., M.T., Zangeronimo, M.G., Silva, A.C. (2013a)  
605 Porcine follicular fluid concentration of free insulin-like growth factor-I collected from  
606 different diameter ovarian follicles. *Pesqui. Vet. Bras.* 33, 1269-1274.
- 607 Oberlender, G., Murgas, L.D., Zangeronimo, M.G., Da Silva, A.C., Menezes Tde, A., Pontelo, T.P.,  
608 Vieira, L.A. (2013b) Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian  
609 follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro.  
610 *Theriogenology* 80, 319-327.
- 611 Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved  
612 homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.
- 613 Pan, Y., Cui, Y., He, H., Baloch, A.R., Fan, J., Xu, G., He, J., Yang, K., Li, G., Yu, S. (2015)  
614 Developmental competence of mature yak vitrified-warmed oocytes is enhanced by IGF-I via  
615 modulation of CIRP during in vitro maturation. *Cryobiology* 71, 493-498.
- 616 Petters, R.M., Wells, K.D. (1993) Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48, 61-73.
- 617 Picco, S.J., Anchordoquy, J.M., De Matos, D.G., Anchordoquy, J.P., Seoane, A., Mattioli, G.A.,  
618 Errecalde, A.L., Furnus, C.C. (2010) Effect of increasing zinc sulphate concentration during in  
619 vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 74, 1141-1148.
- 620 Rath, D., Long, C.R., Dobrinsky, J.R., Welch, G.R., Schreier, L.L., Johnson, L.A. (1999) In vitro  
621 production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-  
622 bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci* 77, 3346-3352.
- 623 Rodrigues, T.A., Ispada, J., Risolia, P.H., Rodrigues, M.T., Lima, R.S., Assumpcao, M.E., Visintin,  
624 J.A., Paula-Lopes, F.F. (2016) Thermoprotective effect of insulin-like growth factor 1 on in  
625 vitro matured bovine oocyte exposed to heat shock. *Theriogenology* 86, 2028-2039.
- 626 Santos, E., Somfai, T., Appeltant, R., Dang-Nguyen, T.Q., Noguchi, J., Kaneko, H., Kikuchi, K.  
627 (2017) Effects of polyethylene glycol and a synthetic ice blocker during vitrification of  
628 immature porcine oocytes on survival and subsequent embryo development. *Anim Sci J* 88,  
629 1042-1048.
- 630 Sato, A., Sarentonglaga, B., Ogata, K., Yamaguchi, M., Hara, A., Atchalalt, K., Sugane, N., Fukumori,  
631 R., Nagao, Y. (2018) Effects of insulin-like growth factor-1 on the in vitro maturation of  
632 canine oocytes. *J Reprod Dev* 64, 83-88.
- 633 Shi, W.-Q., Zhu, S.-E., Zhang, D., Wang, W.-H., Tang, G.-L., Hou, Y.-P., Tian, S.-J. (2006) Improved  
634 development by Taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes.  
635 *Reproduction* 131, 795-804.
- 636 Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Kuriani Karja, N.W., Farhudin, M., Dinnyés, A.,  
637 Nagai, T., Kikuchi, K. (2007) Developmental competence of in vitro-fertilized porcine  
638 oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on  
639 oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 55, 115-126.
- 640 Spricigo, J.F., Morato, R., Arcarons, N., Yeste, M., Dode, M.A., Lopez-Bejar, M., Mogas, T. (2017)  
641 Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before  
642 vitrification on in vitro-matured calf oocytes. *Theriogenology* 89, 47-57.

- 643 Trapphoff, T., Heiligentag, M., Simon, J., Staubach, N., Seidel, T., Otte, K., Fröhlich, T., Arnold, G.J.,  
 644 Eichenlaub-Ritter, U. (2016) Improved cryotolerance and developmental potential of in vitro  
 645 and in vivo matured mouse oocytes by supplementing with a glutathione donor prior to vitri fi  
 646 cation. *Mol Hum Reprod* 22, 867-881.
- 647 Wasielak, M., Bogacki, M. (2007) Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in  
 648 vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev* 53, 419-426.
- 649 Wasielak, M., Fujii, T., Ohsaki, T., Hashizume, T., Bogacki, M., Sawai, K. (2013) Transcript  
 650 abundance and apoptosis in day-7 porcine blastocyst cultured with exogenous insulin-like  
 651 growth factor-I. *Reprod Biol* 13, 58-65.
- 652 Wu, G., Jia, B., Mo, X., Liu, C., Fu, X., Zhu, S., Hou, Y. (2013) Nuclear maturation and embryo  
 653 development of porcine oocytes vitrified by cryotop: Effect of different stages of in vitro  
 654 maturation. *Cryobiology* 67, 95-101.
- 655 Wu, J.-T., Chiang, K.-C., Cheng, F.-P. (2006) Expression of progesterone receptor(s) during  
 656 capacitation and incidence of acrosome reaction induced by progesterone and zona proteins in  
 657 boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 93, 34-45.
- 658 Xie, L., Tang, Q., Yang, L., Chen, L. (2016) Insulin-like growth factor I promotes oocyte maturation  
 659 through increasing the expression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor in  
 660 the zebrafish ovary. *Mol Cell Endocrinol* 419, 198-207.
- 661 Yeste, M., Estrada, E., Pinart, E., Bonet, S., Miro, J., Rodriguez-Gil, J.E. (2014) The improving effect  
 662 of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate  
 663 freezability. *Cryobiology* 68, 251-261.
- 664 Zhang, W., Yi, K., Yan, H., Zhou, X. (2012) Advances on in vitro production and cryopreservation of  
 665 porcine embryos. *Anim Reprod Sci* 132, 115-122.
- 666 Zhou, G.B., Li, N. (2009) Cryopreservation of porcine oocytes: Recent advances. *Mol Hum Reprod*  
 667 15, 279-285.

## 669 **Figure legends**

670 **Fig. 1** Classification of porcine oocytes using the orcein staining method: (A) germinal vesicle (GV);  
 671 (B) metaphase I (MI); and (C) metaphase II (MII) stage. Magnification of 100x. Bar: 15  $\mu$ m. CP =  
 672 polar corpuscle.

673 **Fig. 2** Classification of pig oocytes using simultaneous ethidium homodimer-1 (EthD-1) staining and  
 674 TUNEL assay: (A) DAPI<sup>+</sup>; blue, stains all nuclei; (B) TUNEL<sup>+</sup>; green, fragmented DNA; and (C)  
 675 EthD-1<sup>+</sup>; red stain – stains nuclei of non-viable oocytes. Magnification of 400x. Bar: 20  $\mu$ m

676 **Fig. 3** Effects of IGF-I supplementation on in vitro maturation of pig oocytes. Data are shown as mean  
 677  $\pm$  s.e.m. GV: Germinal Vesicle; MI: Metaphase I; MII: Metaphase II; Deg: degenerated. No significant  
 678 differences between control and IGF-I were observed.

679 **Fig. 4** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with  
 680 GSH on oocyte viability and DNA fragmentation before and after vitrification of porcine oocytes.  
 681 Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Different letters indicate significant differences (P<0.05) A: TUNEL-  
 682 /EthD-1-: viable oocytes with intact DNA; B: TUNEL+/EthD-1+: non-viable oocytes with fragmented  
 683 DNA

684 **Fig. 5** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with  
 685 GSH on the relative expression of *BAX*, *BCL2L1*, *HSPA1A*, *GPX1* and *SOD1*, and on the *BAX*:

686 *BCL2L1* ratio before and after vitrification of porcine oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m.  
687 Different letters indicate significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

688 **Fig. 6** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions with  
689 GSH on penetration, monospermy, cleavage and blastocysts rates before and after vitrification of  
690 porcine oocytes. Data are shown as mean  $\pm$  s.e.m. Different letters indicate significant differences  
691 between treatments ( $P < 0.05$ ). % blastocysts at day 7 = number of blastocyst at day 7: number  
692 cleavage oocytes.

### 693 Tables

694 **Table 1.** Primers used for quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction. NCBI,  
695 National Center for Biotechnology Information

NCBI official name (gene symbol)	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	GenBank Accession no.
Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase ( <i>GAPDH</i> )	F:CTCAACGACCACTTCGTCAA R:TCTGGGATGGAAACTGGAAG	233	NM_00120659. 1
BCL2-associated X protein ( <i>BAX</i> )	F:AACATGGAGCTGCAGAGGAT R:CGATCTCGAAGGAAGTCCAG	204	XM_003127290 .2
BCL2-like 1 ( <i>BCL2L1</i> )	F:GGAGCTGGTGGTTGACTTTC R:CTAGGTGGTCATTCAGGTAAG	528	AF216205
Heat Shock Protein 70 kDA ( <i>HSPA1A</i> )	F:ATGTCCGCTGCAAGAGAAGT R:GGCGTCAAACACGGTATTCT	216	NM_001123127 .1
Superoxide dismutase 1soluble ( <i>SOD1</i> )	F:GTGCAGGGCACCATCTACTT R:AGTCACATTGCCCAGGTCTC	222	NM_001190422 .1
Glutathione peroxidase 1 ( <i>GPX1</i> )	F:CAAGAATGGGGAGATCCTGA R:GTCA TTGCGACACACTGGAG	217	NM_2142201.1

696 *F: Forward; R: Reverse; bp: base pairs*

697

698 **Table 2** Effects of supplementing IVM medium with IGF-I, and adding vitrified-warmed solutions  
 699 with GSH on cleavage rates and embryo development.

Groups		Oocytes	D2 Cleaved	D7 Blastocyst	Blastocyst rate
		n	n (%)	n (%)	%
Fresh	Control	163	92 (56.30±1.70) ab	22 (13.49±0.60) a	24.03 ± 0.91 ab
	IGF	167	95 (57.16±1.75) a	29 (17.41±0.56) a	30.56 ± 0.90 a
Vitrified-warmed	Control	95	24 (25.27±1.50) c	5 (5.13±1.72) c	20.00 ± 6.94 b
	IGF	104	34 (31.70±2.38) cd	8 (6.04±1.66) c	18.33 ± 5.09 b
	Control +GSH	98	31 (32.58±1.82) cd	6 (7.50±1.28) c	23.33 ± 4.08 ab
	IGF+GSH	105	36 (34.58±1.82) bd	9 (8.58±1.61) c	24.17 ± 4.72 ab

700 Data are shown as mean ± s.e.m. Different letter indicate significant differences between treatments  
 701 (P<0.05).

702 Blastocyst rate = blastocyst/cleaved

703