

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**EFEITO DO ESTRESSE SUBLETAL COM A UTILIZAÇÃO DE LED NO
DESENVOLVIMENTO E NA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

LUIS EDUARDO VERGARA PEREZ

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**EFEITO DO ESTRESSE SUBLETAL COM A UTILIZAÇÃO DE LED NO
DESENVOLVIMENTO E NA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

LUIS EDUARDO VERGARA PEREZ

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia Animal, Área
de Reprodução Animal, Curso de Mestrado, da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da UNESP – Campus de Botucatu

Orientadora: Prof^a Dr^a *Fernanda da Cruz
Landim Alvarenga.*

Botucatu – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Perez, Luis Eduardo Vergara.

Medico Veterinario e Zootecnista / Luis Eduardo Vergara Perez. - Botucatu,
2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Mateus Jose Sudano

Capes: 50504002

1. Embrião. 2. Stress oxidativo. 3. Células - Proliferação. 4. Células -
Crescimento. 5. Apoptose. 6. Fertilização in vitro. 7, Biotecnologia de célula
animal.

Palavras-chave: Apoptose; Embriões; Estresse subletal; Irradiação LED;
Vitrificação.

Nome do Autor: Luis Eduardo Vergara Perez

**Título: EFEITO DO ESTRESSE SUBLETAL COM A UTILIZAÇÃO DE LED NO
DESENVOLVIMENTO E NA QUALIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Profa. Eunice Oba
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ-UNESP-Botucatu- SP

Prof. Mateus José Sudano
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
UNIPAMPA-Uruguaiana-RS

Data defesa: 06 de Março de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e namorada, pela dedicação, cumplicidade, incentivo e paciência. Sem vocês este sonho não seria possível!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força, saúde e disposição para todos os dias iniciar a luta pela vida e pelo sucesso profissional, sem ele seria impossível esta batalha.

Aos professores do Curso da UNESP-BOTUCATU, pelos ensinamentos, pela amizade construída e pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

À minha orientadora Professora Doutora Fernanda Landim, exemplo de profissionalismo e ética científica. Incentivou-me e me influenciou muito na decisão de continuar a exercer esta profissão maravilhosa da qual me apaixono mais a cada dia. Meu sincero obrigado.

Aos meus pais Lucy e Luis, minha namorada Tânia, meus irmãos Jahir e Adriana, tios Jimmy, Regina, Maria e primos Edinson A, Edinson C, Ivan Luisa F., Juan C., Jorge L., Lider, Kelly, Alexandra, Melissa, Anderson, Jorge A., Jesus A. Suguey S, Vanessa G, Rafa e Andres, que hoje este primo não esta com nos mais esta com Deus, e cadê de meus novos membro de minha família, meu sogro Dario U., Sogra Ginna B, a minha querida cunhada Valeria U. e os avôs Luz Dary V. Luz Nubia M, Jaime C. A todos os membros de minha querida família, em que confesso o quanto é impossível expressar em palavras o quanto vocês estão presentes em minha vida nesta busca por ser um melhor profissional. Sinto muitas saudades de todos vocês.

Meus companheiros e amigos do Curso de Pós-Graduação; Mateus S, Camila C, Jefferson V, Tatiana R, Midyan D, Daniela P, Leticia C. João F, Paulo P, Isadora A, sempre me lembrar de vocês. Essa é mais uma de nossas vitórias.

Meus companheiros e amigos No Rio Branco - Acre, Jefferson V, Renata A, Ao melhor perfeito do Brasil Raimundo A. Rosano R, Marcos, Marcelo, Pessoal, muito obrigado pelas conversas, boas risadas e, sobretudo pela amizade.

Aos meus verdadeiros amigos que conheci no meio de meu Curso de Graduação; Carlos Arciniega, Clara Reyes, Obrigado pela amizade e sinceridade que até hoje persistem.

Aos amigos que fizeram parte de minha vinda ao Brasil e conheci no transcurso, hoje posso dizer que estou muito agradecido a todos vocês e que têm minha amizade mais sincera, Bruno Evaristo, Thales, Aline, Jose augusto, Fatima, Sr. Antônio, Ivo Pivato, Dorival, Camila e os irmãos Cabarcas; Mario e Jassir.

Obrigado pela amizade e respeito de todos vocês.

*“Quando se combina o saber e a vocação, resulta um trabalho cheio de sabedoria e
paixão que fazem deste algo único.”*

Tania Upegui

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de blastocistos.....	31
Tabela 2	Número de total de células, células apoptóticas e porcentagem de apoptose nos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> frescos (média dos quadrados mínimos $\pm$ SEM).....	31
Tabela 3	Número de total de células, células apoptóticas e porcentagem de apoptose nos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> após a vitrificação, aquecimento e re-cultivo (média dos quadrados mínimos $\pm$ SEM).....	34
Tabela 4	Taxa de Reexpansão.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama demonstrando os comprimentos de onda de espectro de luz visível, desde a faixa ultravioleta até infravermelho, medido por nanômetros.....	10
Figura 2	Fluxograma que sumariza as etapas do estudo.....	28
Figura 3	Fotos dos blastocistos dos embriões frescos. A - Embriões representando o grupo que foi fotoestimulado com LED em 820 nm. B - Embriões representando o grupo que foi fotoestimulado com LED em 633 nm.....	30
Figura 4	Embriões analisados quanto à fragmentação do DNA de seus núcleos, após a fotoestimulação por LED, antes do procedimento de vitrificação. A – Embriões fotoestimulados por LED em 820 nm. B – Embriões fotoestimulados por LED em 633 nm. A coloração azul corresponde à todos os núcleos das células embrionários corados com Hoechst 33342, e a coloração verde corresponde às células marcadas com o corante Fitc, demonstrando que tais núcleos apresentam o DNA fragmentado - Células apoptóticas.....	33
Figura 5	Análise da fragmentação do DNA de embriões, após a fotoestimulação por LED e o procedimento de vitrificação. A – Embriões fotoestimulados por LED em 820 nm. B – Embriões fotoestimulados por LED em 633 nm. A coloração azul corresponde à todos os núcleos das células embrionários corados com Hoechst 33342, e a coloração verde corresponde às células marcadas com o corante Fitc, demonstrando que tais núcleos apresentam o DNA fragmentado - Células apoptóticas.....	35
Figura 6	Blastocistos avaliados após a reexpansão. A – Embriões fotoestimulados por LED em 820 nm. B – Embriões fotoestimulados por LED em 633 nm.....	36

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
Abstract.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Estresse térmico.....	4
2.2. Estresse oxidativo.....	6
2.3. Estresse Osmótico.....	7
2.4. Estresse Óptico.....	9
2.5. Utilização do estresse subletal em embriões.....	11
2.6. Fotobiomodulação.....	13
2.7. Vitrificação de Embriões.....	16
2.8. Apoptose.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Recuperação e classificação dos oócitos.....	21
4.2. Maturação <i>in vitro</i>	22
4.3. Fertilização <i>in vitro</i>	22
4.4. Cultivo <i>in vitro</i>	23
4.5. Irradiação.....	24
4.6. Vitrificação de embriões.....	26
4.7. TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling).....	27
4.8. Análise Estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO.....	37
7. CONCLUSÕES.....	45
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
9. REFERÊNCIAS.....	47

RESUMO

O sistema de cultivo *in vitro* de embriões apresenta menor eficiência em relação ao *in vivo*, sendo caracterizado por menores taxas de desenvolvimento e de adesão, além de uma menor tolerância à certas alterações que provocam estresse, como agentes físicos, químicos, térmicos, osmóticos, oxidativos, radioativos, entre outros. De acordo com a intensidade do estresse, pode-se estimular uma resposta celular favorecendo o desenvolvimento embrionário, adquirindo maior tolerância através de aceleração no metabolismo, proliferação e crescimento celular. O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito do estresse óptico em diferentes momentos ao longo do cultivo e conhecer as possíveis aplicações, a partir do estresse subletal e da bioestimulação promovida pela irradiação com diodo emissor de luz (LED). Com isto, os resultados demonstraram que em alguns estágios do desenvolvimento embrionário, tal como em blastocistos, o uso do estresse óptico pode ser benéfico ao embrião, protegendo-o de eventos como a apoptose. Os principais resultados demonstram que na produção de blastocistos houve aumento na produção dos mesmos nos grupos irradiados, apesar de não haver diferença estatística (Controle 23,2; IRD3inf 31,3; IRD6Infra 33,3). O estímulo por LED prévio à vitrificação mostrou que a irradiação por infravermelho em D3 pode estimular o aumento, em média, do número de células (Controle: 91,9; IRD3inf: 112,8). Em relação às células apoptóticas, grupos irradiados com luz infravermelha mostraram menos número de células envolvidas neste processo (Controle: 11,6; IRD6inf: 6,6; IRFIVinf: 7,8), e a irradiação por luz vermelha pareceu aumentar a apoptose (IRD3verm: 15,6; IRD6verm: 16,1). Em relação à taxa de reexpansão, o a irradiação por luz vermelha teve efeito sobre o grupo irradiado em D3, mostrando uma diminuição significativa para o mesmo (Controle: 70,5; IRD3verm: 39,3). De acordo com os resultados obtidos, a irradiação com luz infravermelha demonstrou efeito na produção de blastocistos, o que é economicamente importante para a PIV de embriões. Além disso, as análises de apoptose demonstraram que a associação entre as técnicas aplicadas neste estudo são importantes para que a produção *in vitro* de embriões possa ser usada de forma conjunta com o uso de diodo emissor de luz (LED - *Light Emitting Diode*), de modo a interferir positivamente em processos bioquímicos e moleculares envolvidos no desenvolvimento *in vitro*.

Palavras chave: Embriões, estresse subletal, *Light Emitting Diode*, vitrificação, apoptose.

Abstract

The *in vitro* embryo culture system has lower efficiency compared to *in vivo*, because the *in vitro* system is characterized by lower rates of development, deployment, and a lower tolerance to certain changes that cause stress, such as physical, chemical, thermal, osmotic, oxidative and radioactive among others. According to the stress intensity it is possible to stimulate a cellular response promoting embryonic development and acquiring greater tolerance by the acceleration of metabolism, cell proliferation and growth. The objective of this study was to analyze the effect of the optical stress at different periods throughout the embryo development and understand the possible applications for this stimulation, from sublethal stress and biostimulation promoted by irradiation with lasers. Therefore, the results showed that optical stress can be beneficial to the embryos at certain stages of their development, such as blastocysts stage, protecting them from apoptosis. The main results show that an increase in blastocysts production for infrared irradiated groups, although there was no statistical difference (control 23.2; IRD3inf 31.3; IRD6Inf 33.3). The infrared LED stimulus prior to vitrification showed a higher number of cells for embryos in D3 (control: 91.9; IRD3inf: 112.8). Also, infrared irradiation appeared to decrease the number of apoptotic cells, when compared to controls (control: 11.6; IRD6inf: 6.6; IRFIVinf: 7.8), and red light irradiation appeared to increase apoptosis (IRD3verm: 15.6; IRD6verm: 16.1). Regarding re-expansion rate, the red light irradiation in D3 is related a significant decrease in the rate (control: 70.5; IRD3verm: 39.3). According to the results, irradiation with infrared light effect is shown in blastocyst production, which is economically important to embryos IVP. Moreover, the apoptosis analysis showed that the association between the techniques applied in this study are important for the *in vitro* production of embryos can be used jointly with the use of light emitting diode (LED - Light Emitting Diode), in order to positively interfere in biochemical and molecular processes involved in developing *in vitro*.

Keywords: Embryos, sublethal stress, Light Emitting Diode, vitrification, apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil alcançou o posto de maior produtor mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV). Na divulgação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a PIV de embriões bovinos no Brasil em 2011 é equivalente a 85% do total de embriões bovinos produzidos no mundo (Stroud, 2012).

Além disso, grandes avanços nos sistemas de PIV foram observados de forma geral, com a melhoria dos métodos de cultivos e novos conhecimentos sobre a fisiologia do embrião, ultraestrutura e morfologia (Gardner, 2008; Abe et al., 2002; Rizos et al., 2002, 2003). Atualmente a PIV é aplicada com sucesso no mercado de embriões bovinos. Porém, apesar de todo aperfeiçoamento da técnica de PIV de embriões alcançado ao longo das últimas décadas, a sua eficiência na produção de blastocistos ainda permanece ao redor de 30-45% do total de oócitos submetidos à maturação *in vitro* (Kane, 2003).

A redução no número de embriões viáveis para transferência pode estar relacionada a diversos fatores, tais como redução da resposta à hiperestimulação, baixa taxa de fertilização e diminuição da qualidade embrionária, o que pode estar associados a eventos que causam estresse embrionário. Os embriões PIV possuem grande sensibilidade quando submetidos a estresse, através agentes físicos, químicos, térmicos (calor e frio), soluções hiper ou hipo osmóticas, oxidativos, radiativos, entre outros, cujas reações iniciam o processo de morte celular. As características mais frequentes observadas são o desencadeamento de uma serie de injúrias intracelulares como alterações cromossômicas, modificações da zona pelúcida, alterações ultraestruturais do citoesqueleto e das membranas mitocondriais, e fragmentação do ácido

desoxirribonucleico (DNA) resultando no processo de apoptose e morte celular (Hansen et al., 2001).

Apesar de o estresse ser um agente de injúria celular, dependendo dos diferentes níveis de intensidade, ele pode estimular uma resposta celular positiva frente a este processo lesivo e desencadear uma série de eventos que culminam no favorecimento do desenvolvimento celular (Feder & Hoffman, 1999). Ao serem submetidas a um estresse leve a moderado, as células conseguem se adaptar completamente as novas condições, e a taxa de crescimento celular não é afetada. Baixos níveis de estresse podem causar adaptação transitória ou uma resposta adaptativa, acompanhada por mudanças fisiológicas temporais que muitas vezes resultam em uma maior tolerância ao estresse (Yousef e Courtney, 2003). Entretanto, se o nível do estresse ultrapassar o limite crítico de tolerância, o mesmo irá desencadear o processo de apoptose (morte celular não seguida de autólise) ou necrose (Hansen, 2007).

Recentemente, foi sugerido um novo enfoque o uso do estresse subletal para aumentar o desenvolvimento dos embriões PIV. Foi demonstrado que, previamente ao processo de vitrificação, existe uma melhora na taxa de sobrevivência de blastocistos de camundongos, bovinos e suínos submetidos ao estresse subletal oriundo de pressão hidrostática (Pribenszky et al., 2010). Acredita-se que o estresse subletal pode ser aplicado em tratamentos cujos objetivo é induzir uma resistência temporal as células. Ativando a transcrição de genes que produzem proteínas específicas que permitem a adaptação ao estresse e resultado na sobrevivência. Tais proteínas de stress altamente conservadas que desempenham papéis essenciais na reparação de injurias intracelular e na contribuição para a interrupção do processo de apoptoses. (Wouters et al, 1999). Este conceito tem sido empregado em diferentes biotécnicas da reprodução e também pode ser aplicado na produção *in vitro* de embriões visando o aumento da eficiência da

técnica com consequente produção de embriões de melhor qualidade (Pribenzkyet al., 2005b, 2012; Du et al., 2008).

Uma das formas de bioestimulação embrionária refere-se a fotobioestimulação. Nesta a utilização de lasers de baixa potência demonstrou aumentar os níveis energéticos celulares além de suprir o déficit energético resultantes do cultivo *in vitro* de embriões, de forma que contribui para o desenvolvimento embrionário (KARU et al., 1988). De forma geral, só existem trabalhos que demonstraram os efeitos benéficos de fotobioestimulação por diodo emissor de luz (light-emitting diode – LED).

Na célula, o efeito da luz vermelha e infravermelha na foto-irradiação (630 – 1000 nm) para cicatrização de feridas foi relacionado ao aumento de proliferação celular, da produção de colágeno e de fatores de crescimento (Sommer et al., 2001). Estudos clínicos já demonstraram que a fotobioestimulação é capaz de acelerar a cicatrização de feridas, induzir a regeneração após isquemia cardíaca e melhorar a recuperação de nervos ópticos após lesão (Whelan et al., 2001, Eells et al., 2004).

Considerando a aplicação LED para a indução de estresse embrionário, ainda não existem, resultados que demonstrem os efeitos deste tipo de bioestimulação na literatura. Desta forma, o presente estudo teve como finalidade avaliar a contribuição da aplicação de LED no cultivo de embriões PIV, além de avaliar os efeitos apoptóticos do estresse subletal promovido pela irradiação LED em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Na espécie bovina, ao longo dos primeiros estágios de clivagem, ocorre uma perda considerável dos embriões produzidos *in vitro*, sendo que menos da metade dos oócitos que chegam a clivar atingem o estágio de blastocisto (Bavister et al., 1995). Esta elevada mortalidade embrionária ao longo deste período está frequentemente associada a condições desfavoráveis do cultivo *in vitro*, que de alguma forma estressam os embriões levando a apoptose ou necrose celular. Agentes físicos, químicos, térmicos (calor ou frio), solução hiper ou hipo osmóticos, oxidativos, radioativos, entre outros, são exemplos de fatores estressantes que podem causar injúrias aos embriões ao longo do cultivo *in vitro* (Schumacher & Fisher, 1988).

A principal resposta embrionária frente ao estresse é o desencadeamento da apoptose celular, o que de acordo com o nível da intensidade do estresse (leve, moderado, forte e extremo) afetará o desenvolvimento embrionário, reduzindo a produção de blastocistos. Entretanto, o estresse pode eventualmente aumentar a produção de blastocistos (Bavister et al, 1995; Hardy et al., 1999; Thompson et al., 2000).

Os tipos de estresse mais prováveis no cultivo embrionários são os estresses térmico, oxidativo, osmótico, e óptico.

2.1. Estresse térmico

Utilizando sistema de cultivo *in vitro*, um estudo mostrou que a maior causa da redução da sobrevivência embrionária induzida pelo estresse térmico calórico (ETC) é originada pelos afeitos adversos das temperaturas elevadas entre o final da maturação oocitária, e os primeiros dias após a fertilização (Al-Katanani & Hansen, 2002),

reduzindo a sobrevivência em estágios iniciais no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões.

A hipersensibilidade dos oócitos ao ETC se deve a falta de produção das proteínas que atuam na prevenção do mesmo como, por exemplo, as heat shock proteins (HSP) e glutathione (GSH) (Edwards & Hansen 1996). Da mesma maneira, embriões de duas células não são capazes de sintetizar HSP70 em resposta ao estresse calórico (Souza et al., 1998). A síntese das HSP ocorre a partir da completa ativação do genoma embrionário entre 8-16 células (3º dia de fecundação), pois a partir desse momento, o embrião começa a adquirir resistência contra altas temperaturas (Ealy et al. 1993). Estas proteínas podem modular a apoptose celular, que é um dos mecanismos envolvidos na proteção embrionária durante a exposição ao ETC (Al-Katanani & Hansen, 2002; Neuber et al., 2002).

A exposição dos complexos cúmulus-oócito (cumulus-oocyte complexes - COCs) de bovinos, a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro*, compromete a arquitetura do citoesqueleto, reduz a maturação nuclear (Roth & Hansen, 2007), altera a síntese de novas proteínas (Edwards & Hansen, 1997), promove o aumento de radicais livres e induz a apoptose (Roth & Hansen, 2004). Estes efeitos deletérios diminuem a capacidade dos oócitos em se desenvolver até o estágio de blastocisto, após a fertilização *in vitro* (Edwards et al., 1997).

Embriões de raças zebuínas são mais resistentes ao ETC do que os de raças taurinas e mestiços (Paula-lobos 2003; Barros 2002; Barros 2006). Além disso, Edwards & Hansen (1996), observaram que a exposição de oócitos ao ETC de 41°C por 12 horas reduziu seu desenvolvimento até a fase de blastocisto (30% vs 10% para oócitos cultivados a 39 e 41°C, respectivamente).

Resultados semelhantes foram relatados em outro experimento realizado por Edwards & Hansen (1997; 35% vs 18% para oócitos cultivados a 39 e 41°C, respectivamente). Além disso, Rivera & Hansen (2001) observaram que o ETC a 41°C, aplicado durante a fertilização e nos estágios de uma ou duas células possui efeito prejudicial no desenvolvimento embrionário.

2.2. Estresse oxidativo

No metabolismo aeróbico ocorre a produção das espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS), tais como os radicais livres ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$). Vários pesquisadores já constataram que as ROS estão envolvidas na função fisiológica e patológica do trato reprodutivo. São moléculas chaves de sinalização e modulação de diferentes funções reprodutivas, como por exemplo, a foliculogênese, a maturação folicular, ovulação e função do corpo lúteo (Sugino et al., 1996; Sabatini et al., 1999). No entanto, as ROS podem manifestar-se por várias vias metabólicas e enzimáticas que podem originar-se de fontes endógenas ou exógenas.

Fontes endógenas: as reações da fosforilação oxidativa, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e xantina oxidase, são as principais fontes das ROS em oócitos e embriões, embora a contribuição de cada fonte dependa da espécie, fase de desenvolvimento, e também das condições de cultivo (Thompson et al, 2000).

Fontes exógenas: a tensão atmosférica de oxigênio (O_2) (Pabonet al., 1989), cátions metálicos como o ferro e cobre, a luz visível (Beehler et al, 1992), e o soro fetal bovino (Alvarez et al., 1996).

Altas tensões atmosféricas de O_2 favorecem a formação de ROS, responsável por vários tipos de danos ao embrião, como por exemplo, a peroxidação lipídica, a

modificação oxidativa de proteínas e ácidos nucleicos, alterações mitocondriais, fragmentação do DNA e a expressão de genes envolvidos na apoptose (Munné & Estop, 1991; Takahashi et al., 2000). Alguns compostos possuem funções antioxidantes e atuam como um mecanismo de defesa contra a produção das ROS. Esses compostos podem ser divididos em antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, as vitaminas A, C e E, o piruvato, glutathione (GSH), e as CSH (hipotaurina taurina e cisteína); e antioxidantes enzimáticos incluindo superóxido desmutase/Mn-SOD, catalase e glutathione peroxidase/GPX (Gardner et al, 1998).

Nas biotecnologias reprodutivas, a lipoperoxidação decorrente do estresse oxidativo é considerada uma das principais causas da baixa fertilidade dos espermatozoides submetidos aos processos de criopreservação e da baixa eficiência dos sistemas de cultivo oocitário e embrionário *in vitro* (Nasr-Esfahani , 1990; Chatterjee , 2001).

Evidências indicam que o excesso de ROS na PIV induz o bloqueio do desenvolvimento e compromete a viabilidade oocitária e embrionária. Estes comprometimentos ocorrem devido às lesões estruturais e funcionais promovidas pela deteriorização oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (Wang, 2002).

2.3. Estresse osmótico

As células de mamíferos mantêm um ambiente homeostático interno regulado, onde estão expostas a mudanças de temperatura e osmolaridade em condições fisiológicas normais. Os oócitos têm propriedades únicas que os tornam mais suscetíveis a danos durante a exposição ao estresse (Van Blerkom & Davis, 1994).

No entanto, a determinação dos limites de tolerância devido ao estresse osmótico depende da resposta celular frente as mudanças físicas e bioquímicas durante a mudança

osmótica (Williams & Shaw, 1980; King et al., 2004). Em soluções com alta concentração de partículas de soluto iônico (hiperosmótico) o fluido intracelular se movimenta rapidamente em movimento de saída de água através da membrana semipermeável, resultando na contração das células. Já o oposto ocorre quando as concentrações de partículas de soluto estão presentes no meio intracelular e o fluido extracelular se movimenta do ambiente hipo-osmótico para o interior da célula até saturá-la, correndo até o risco de romper a membrana; ambas as movimentações de fluidos, agem afetando a tonicidade da membrana semipermeável e o volume celular (King et al., 2004).

O estresse osmótico é evidente principalmente em estudos que analisam técnicas de criopreservação de gametas ou embriões, cujas células são expostas a soluções altamente concentradas e contendo crioprotetores tanto nas soluções de congelamento como eventualmente nas de descongelamento (Vajta, 2000; Kaidiet al., 2001). O estresse osmótico pode provocar grandes alterações no volume celular, colocando em risco a viabilidade e desenvolvimento do embrião (Mazur & Schneider, 1986). Além disso, outras alterações oriundas do estresse osmótico submetidos a oócitos/embriões são: alterações na metáfase II, alterações cromossômica, modificações da zona pelúcida, e alterações ultraestruturais como do citoesqueleto, das membranas mitocondriais, grânulos corticais e dos nucléolos que podem levar a apoptose (Gómez et al., 2008).

As injúrias causadas pelo estresse osmótico em oócitos ou embriões já foram descritas em camundongos (Mazur&Schneider, 1986), bovinos, suínos e humanos (Hassold& Hunt, 2001).

2.4. Estresse óptico

O desenvolvimento de embriões de hamsters, coelhos e outras espécies pode ser prejudicado pela exposição à luz visível (Lane & Gardner, 2005). Os experimentos conduzidos para testar o efeito nocivo do estresse oriundo da exposição dos embriões a luz visível indicaram que a redução da sua viabilidade pode ser decorrente de lesões ao DNA (Takahashi et al., 1999), atraso na divisão celular (Schumacher & Fisher, 1988), aumento da expressão das heat shock proteins de 70KDa (HSP 70) (Ealy et al. 1993; Edwards & Hansen, 1996), geração de ROS intracitoplasmática, e ao aumento do número de células apoptóticas em resposta ao estresse (Paula-lobes & Hansen, 2002). Além disso, Wang (1974) observou que os intervalos próximos aos raios ultravioletas com comprimento de ondas de (300-400 nm) podem causar um efeito negativo, causando a morte de diferentes células.

Uma vez que a radiação da luz visível (350-800 nm – figura 1) passa através de células embrionárias ocorre a produção das ROS. Do mesmo modo, a região azul (450-500 nm) da luz é prejudicial devido ao seu alto conteúdo energético e capacidade de penetrar tecidos, causando danos (Godley et al., 2005). Além disso, os raios infravermelhos (700 a 4000 nm) induzem o estresse oxidativo e a morte celular (Konig et al., 1996).

A resposta ao estresse celular é um mecanismo de defesa da célula frente às alterações ambientais (Feder & Hoffman, 1999). Todos os processos que desencadeiam alguma forma de estresse são apontados como causas da ocorrência de apoptose em resposta ao estresse ocasionado. Dependendo dos diferentes níveis de intensidade, o estresse pode estimular uma resposta celular favorecendo seu desenvolvimento, adaptando-se e adquirindo tolerância ao estresse (Yousef & Courtney 2003). Quando o estresse melhora a função celular, considere-se como um impacto positivo.

Atualmente, o uso de LED em fibroblastos em cultivo, em condições hiperglicêmicas, demonstrou-se eficiente em promover um processo de cicatrização de tecidos, o que poderia ser aplicável à pacientes diabéticos. Neste caso, pode-se observar que o estresse causado pela irradiação por LED, em 570 nm (luz verde) apresentou um resultado positivo, uma vez que o estudo encontrou uma diferença signicante em relação à proliferação celular (Vink et al., 2005). Além disso, outro trabalho demonstrou no mesmo tipo celular que houve proliferação de fibriblastos em cultura, através do efeito da irradiação de LED, em diferentes faixas do espectro de luz, sugerindo a aplicabilidade da técnica na medicina (Vink et al., 2003).

Em relação à tecnologias de reprodução assistida, o uso de laser teve início ao final de 1970 e, com o aprimoramento de seu uso, passou a ter utilidade para o tratamento de infertilidade, através do sua associação as técnicas de fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoides, o que também alcançou o mercado de produção de embriões de animais com finalidade comercial (Karu,2012).

Nos últimos anos têm sido empregadas técnicas que desencadeiam uma resposta de tolerância ao estresse e estímulos de crescimento no metabolismo celular, os quais são apresentados a seguir.

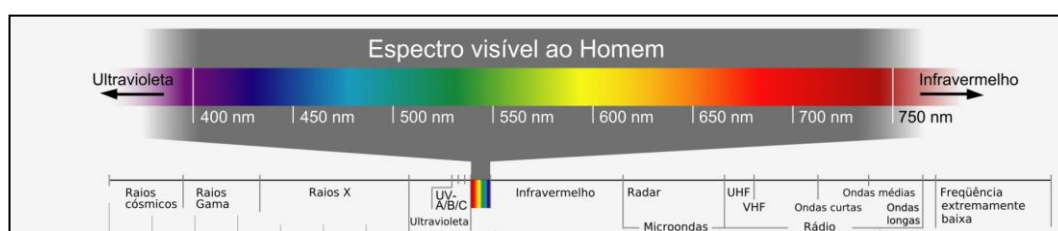


Figura 1: Diagrama demonstrando os comprimentos de onda de espectro de luz visível, desde a faixa ultravioleta até infravermelho, medido por nanômetros.

2.5. Utilização do estresse subletal em embriões

O estresse subletal pode ser aplicado em tratamentos cujo objetivo é induzir uma resistência temporal as células, ativando a transcrição de genes que produzem proteínas específicas que permitem a adaptação ao estresse e resultando na sobrevivência (Feder & Hoffman, 1999). O estresse subletal tem sido observado em todos os níveis de vida, desde as bactérias até os organismos multicelulares. Os efeitos do estresse, a nível celular, são graduais e dependem do tempo, atingindo primeiro a membrana celular e prosseguindo, gradualmente até o núcleo da célula.

Atualmente tem sido indicado como uma forma alternativa de melhorar a produção de embriões mamíferos *in vitro*, resultando em embriões de melhor qualidade e mais resistentes aos processos de criopreservação. Dentre estes o tipo de estresse mais estudado tem sido a alta pressão hidrostática (Pribenszky & Vajta, 2011).

Em condições fisiológicas, as células normalmente estão expostas a uma pressão hidrostática menor que 0,2 Mpa (Pribenszky et al., 2010). Surpreendentemente, o limite tolerável da pressão hidrostática em oócitos e embriões é ao redor de 20 a 80 MPa, onde as células sobreviveram durante 30-120 minutos sem sofrer nenhuma perda de sua viabilidade. Mostrando um exemplo em que blastocistos bovinos foram expostos a uma pressão de 60 MPa durante 1 hora antes da vitrificação apresentaram uma maior criotolerância (Pribenszky et al., 2008a). Além disso, esses resultados são reforçados pelos dados obtidos em outros estudos feito em embriões ovinos com aumento significativo de 68,7% na produção de blastocistos (Ledda et al., 2010), e na espécie suína onde a exposição a 20 MPa durante 60 minutos resultou em aumento na sobrevivência dos blastocistos após da vitrificação (Du et al. 2008b).

Oócitos também apresentam melhora na taxa de clivagem e produção de blastocistos quando submetidos a uma pressão durante 70 ou 130 minutos (Du et al.,

2008). Lin e Vajta. (2009) verificaram aumento nas taxas de produção de blastocistos quando submeteram oócitos suínos a estresse osmótico subletal. Da mesma forma, quando oócitos foram expostos a estresse oxidativo subletal, através da exposição ao peróxido de hidrogênio, foi observada uma maior produção de blastocistos (Vandaele et al., 2010).

Outros tipos de estresse também tem sido utilizados. De acordo com Ju et al, (1999) e Tseng (2006) a exposição dos embriões a temperaturas baixas (3,5°C e 4,5°C) durante 60-120 minutos, não favoreceu o desenvolvimento embrionário, pelo contrario, provou uma redução na produção de blastocistos nas espécies bovina e suína. Porém, em oócitos suínos submetidos a 42°C durante 9 horas, foi observado uma melhora do desenvolvimento (Isomet et al, 2009). Entretanto, a interpretação destes dados requerem maiores estudos, haja vista a necessidade da padronização das doses subletais nas diferentes espécies (Pribenszky et al, 2010).

Oh et al. (2007) mostraram que o uso da exposição de luz com densidade de 200 *lux* (lúmen/m^2) teve efeito significativo no aumento do desenvolvimento de mórulas (96%) e blastocistos (62%), assim como, o uso do comprimento de onda gama vermelho (620-750 nm) aumentou a produção de blastocistos de hamster (Korhonen & Peippo, 2008). Ambos trabalhos mostraram diferenças tanto nas taxas de desenvolvimento embrionário como na qualidade morfológica entre os grupos controle e tratado com filtros de comprimentos de onda com preferência para a faixa verde (500-575 nm). A explicação para esta contradição pode ser devido ao uso de diferentes filtros nestes estudos.

Um estudo recente, realizado por Obokata e colaboradores (2014), descobriu um fenômeno inesperado de reprogramação de células somáticas em pluripotência, através da exposição destas células a um estímulo subletal, o qual foi designado como aquisição

de pluripotência disparada por estímulos (STAP) e os autores reportaram que a reprogramação celular por STAP pode contribuir para tecidos embrionários e placentários, de forma a converter as células provenientes destes tecidos em células semelhantes às células-tronco embrionárias com estado de pluripotência. Neste trabalho, as células somáticas recuperaram pluripotência depois de submetidas a um baixo pH (pH=5,7), de forma que as células começaram a expressar o marcador de células pluripotentes Oct4. Em seguida, os autores observaram que as células passaram a adquirir competência para a diferenciação dos três folhetos embrionários por volta do dia 7 (Obokata et al., 2014).

2.6. Fotobiomodulação

A fototerapia ganhou atenção nos últimos anos e tem sido empregado frequentemente em múltiplas especialidades da odontologia, da medicina humana e veterinária, e biotecnologias. De maneira resumida, há três principais áreas de aplicação de irradiações: (a) cicatrização de feridas, reparação de tecidos e prevenção da morte tecidual; (b) diminuição da inflamação em doenças crônicas e injúrias associadas à dor e edema; (c) diminuição da dor neurogênica (Hamblin & Demidova, 2006).

O efeito da luz vermelho e infravermelha na fotoirradiação (630 – 1000 nm) em cicatrização de feridas está relacionado ao aumento da proliferação celular, aumento da produção de colágeno e a produção de fatores de crescimento (Sommer et al., 2001). Estudos clínicos já demonstraram que a fotobioestimulação é capaz de acelerar a cicatrização de feridas, induzir a regeneração após isquemia cardíaca e melhorar a recuperação de nervos ópticos após lesão (Whelan et al., 2001, Eells et al., 2004).

Os estudos sugerem que o espectro de luz vermelha e infravermelha é causado pela excitação eletrônica de componentes da cadeia respiratória mitocondrial

estimulando a proliferação e a citoproteção (Karu, 1999). As evidências tem demonstrado que a citocromo-c oxidase é um foto-receptor chave para o espectro de luz vermelho e infravermelho, através da absorção da luz pelos íons Cu^{+2} , nos quais esta enzima é rica (Karu 2003).

Com a absorção da irradiação, ativa-se o transporte de elétrons na cadeia respiratória e a ocorrência do processo de oxidação, levando a mudanças no estado redox tanto da mitocôndria, quanto do citoplasma, o que pode afetar a permeabilidade de membrana e determinar mudanças na proporção Na^+/K^+ , aumentando os níveis de Na^+ , na atividade da K^+/ATPase e interferindo no fluxo de Ca^{2+} , envolvido na produção de nucleotídeos, os quais modulam a síntese de DNA e RNA e, finalmente, a proliferação celular (KARU et al., 2003).

Dados obtidos no estudo desenvolvido por Cohen et al. (1998), os quais mostraram que as taxas de fertilização após a irradiação de espermatozóides murinos com laser de HeNe (630 nm) foram elevadas em relação as dos grupos não irradiados, apresentando uma superioridade de 37% durante 5 minutos de irradiação e 32% durante 10 minutos irradiados, quando comparados aos grupos controle.

Recente trabalhos realizado por Silva et., al (2008) com laser visível e infravermelho com embriões *in vitro*, mostraram suas avaliações em seção por segundos os efeitos da irradiação sobre maturação oocitária, efeitos na fertilização *in vitro* e no cultivo. Os oócitos irradiados com laser infravermelho não apresentaram diferenças na produção de clivados, nem na produção total embrionária, em relação aos grupos controle. No entanto no grupo com maior tempo de irradiação (180 seg.), houve taxa de produção embrionária numericamente maior (44,16%) em relação ao seu grupo controle correspondente (40,83%).

Em relação à proporção de blastocistos iniciais, blastocistos expandidos, e blastocistos eclodidos, os mesmo autores mostram que os grupos tratados com laser infravermelho apresentaram médias semelhantes em relação ao seu grupo controle (Silva et al., 2008).

Uma diferença significativa entre lasers e LEDs, é a forma como a energia da luz é entregue. ou seja, a potência máxima de LEDs é medida em miliwatts, enquanto a dos lasers são medidas em watts. Desta forma, os LEDs fornecem uma entrega muito mais suave dos mesmos comprimentos de onda de luz em comparação ao uso de lasers e em uma saída de energia substancialmente inferior com a possibilidade de não gerar calor sem reações adversas (Barolet et.,al 2009). Diodo emissores de luz não fornecem energia suficiente para danificar os tecidos e não têm o mesmo risco de dano acidental com os olhos que os lasers. Outras vantagens sobre lasers incluem a possibilidade de combinar comprimentos de onda com uma matriz de vários tamanhos, que vão desde a luz ultravioleta (UV) para uma largura de banda visível de infravermelho próximo (247 a 1300 nm). O LED dispersa mais luz em área de superfície maior do que os lasers, resultando num tempo de tratamento mais rápido. (Barolet et al., 2008). Desde então, o tratamento é aplicado a milhares de pessoas em todo o mundo a cada dia para várias condições médicas.

Karu et., al (2005), mostraram que fibroblastos sob exposição de LED aumenta a produção de ATP, a modulação de espécies reativas de oxigênio (espécies de oxigênio), a redução e prevenção de apoptose, a estimulação da angiogênese, o fluxo de sangue, e a indução de fatores de transcrição (Barolet et., al 2009). Estas vias de transdução de sinal levam ao aumento da proliferação celular e migração (particularmente por fibroblastos), a modulação dos níveis de citosinas (por exemplo, interleucinas, fator de necrose tumoral), fatores de crescimento, mediadores inflamatórios, expressão de genes

citoprotectores, proteínas de choque térmico (Chen et., al 2009) e aumento de proteínas antiapoptóticas (Whelan, 2001; Barolet et., al 2009).

2.7. Vitrificação de Embriões

Inicialmente, a PIV foi desenvolvida como uma ferramenta de pesquisa e então aplicada para coletar oócitos a partir de animais que eram abatidos. Entretanto, além da aplicação em gados, a PIV se tornou importante para a produção de embriões a partir de animais doadores vivos, como uma alternativa aos processos de ovulação múltipla seguida por transferência de embriões (Galli et al., 2001)..

A qualidade e a viabilidade embrionária são principalmente afetadas pelo sistema de cultivo seguido do procedimento de FIV (Rizos et al., 2002; Galli et al., 2001). Isto significa que a viabilidade de um embrião produzido *in vitro* pode variar de acordo com cada laboratório e com diferentes protocolos.

Um dos fatores que pode afetar a qualidade e viabilidade embrionária está relacionado ao processo de vitrificação de embriões. Dentre os métodos de criopreservação, o procedimento de vitrificação é o mais utilizado e o mais eficiente para a PIV de embriões, visto que este tipo de célula é mais sensível às lesões derivadas de congelamento do que as células produzidas *in vivo* (Vajta et al., 1998; Pollard & Leibi, 1994). A vitrificação consiste num processo no qual o congelamento da célula acontece sem a formação de cristal de gelo. Entretanto, a vitrificação envolve o uso de altas concentrações de crioprotetores e/ou com aumento extremo das taxas de resfriamento e aquecimento (Vajta et al., 2006).

Trabalhos realizados por Ambrose (1999) e por Drost (1994) realizaram análises significativas a respeito dos efeitos causados pelo congelamento e vitrificação. Há algum tempo, foi observado que as taxas de prenhes observadas a partir de embriões

congelados produzidos *in vitro* mostraram-se menores do que de embriões produzidos *in vivo*, o que sugere que embriões produzidos *in vitro* podem não sobreviver ou então tem seu desenvolvimento danificado por processos de congelamento e descongelamento (Ambrose et al., 1999; Drost et al., 1994).

Estudos mais recentes demonstram que a vitrificação está gradualmente substituindo o congelamento lento devido a uma melhor taxa de sobrevivência após descongelamento (Herrero et al., 2011). Uma revisão da literatura recente concluiu que a vitrificação não está exatamente associada com uma alta probabilidade de prenhes, mas apresenta uma taxa de sobrevivência maior após o descongelamento em relação à clivagem e estágio de blastocisto dos embriões, o que pode ser um resultado positivo uma vez que menos embriões foram perdidos durante o processo. É importante ressaltar que a maioria dos resultados positivos nas análises de embriões pós vitrificação foram obtidos com o uso de sistemas abertos, como a técnica de Cryotop (Kolibianakis et al., 2009). Embora os resultados da vitrificação sejam positivos, ainda existem controvérsias sobre qual seria o melhor estágio para a criopreservação de embriões, uma vez que os resultados a respeito podem variar de acordo com a experiência de diferentes laboratórios (Herrero et al., 2011).

2.8. Apoptose

O termo apoptose foi cunhado em 1972 para designar a morfologia específica de morte celular fisiológica, a partir da palavra grega usada para o cair de folhas das árvores ou pétalas de flores (Kerr et al., 1972).

Apesar da alteração de sua definição, o termo apoptose é frequentemente utilizado como sinônimo de morte celular programada, indicando que a morte resulta da ativação regulada de um programa de morte pré-existente codificado pelo genoma. Este

tipo de morte celular, diferentemente da necrose, caracteriza-se por encolhimento da célula, condensação nuclear, formação de vesículas de membrana, membrana ligada a fragmentação em corpos apoptóticos, e alterações nas membranas que eventualmente levam a fagocitose da célula afetada. Mesmo parecendo um mecanismo nocivo, é importante considerar que a apoptose apresenta um papel importante em diversos processos, tais como na formação de cavidades e separação de dígitos, além da eliminação de estruturas vestigiais que tiveram sua função durante a embriogênese (Saikumar et al., 1999).

Considerando os mecanismos moleculares, a apoptose é rigidamente controlada e orquestrada principalmente pela ativação da cascata da caspase. Para isto, existem duas vias principais que levam à ativação das caspases. A primeira via depende da ativação da mitocôndria (independente de receptor) e a segunda envolve a interação de um receptor de morte com o seu ligante (Zimmermann et al., 2001).

Em relação à via dependente da ativação da mitocôndria, sabe-se que esta organela tem um papel importante na apoptose de várias formas, como na liberação de fatores apoptóticos como o citocromo c e do espaço intermembranar para o citoplasma, o que ativa a fase de execução da apoptose (Zimmermann et al., 2001). Durante a apoptose, os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 são ativados e passam por uma mudança em sua conformação levando à exposição do domínio BH3 (Desagher et al., 1999 ; Zha et al., 1996) e translocação para a mitocôndria. Esta translocação dá início à liberação do citocromo c, o qual é acoplado com um grupo heme para tornar-se a molécula holocitocromo c, o que induz a ativação da caspase (Yang et al., 1997).

Por outro lado, o mecanismo de morte celular ligada à receptores envolve os receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), como TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL, e o ligante indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL) / receptores de Apo-2L

(TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Estes “receptores da morte”, como são chamados, também tem uma extensão de aminoácidos intracelular no terminal carboxilo do receptor de chamada de “domínio de morte”. Quando estes receptores de morte estão ligados por ligantes (TNF ou linfotoxina, o ligante de Fas (FasL), o ligante para o DR3, ou TRAIL/Apo-2L, respectivamente), a apoptose pode ocorrer como consequência. Este processo de apoptose também ocorre por ativação da cascata de caspases para indução da morte celular ou então leva à ativação de vias de sinalização que resultam na expressão de genes através do fator nuclear κB e/ou ativador da proteína 1 (Zimmermann et al., 2001). Além disso, a interação Fas-FasL corresponde à forma mais simples de compreender a via de sinalização do receptor de morte a apoptose induzida. A ligação Fas-FasL estimula a formação de complexos de sinalização de indução de morte rápida (Ashkenazi e Dixit, 1998).

Curiosamente, também foi sugerido que há uma família de receptores adicionais que não apresentam o motivo de sinalização (domínio de morte) e que estes receptores funcionam “sequestrando” os ligantes apropriados, atuando como inibidores de apoptose (Ashkenazi & Dixit, 1999).

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a contribuição do diodo emissor de luz (*Light Emission Diode* - LED) no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em comparação ao procedimento padrão.

Específicos

- Determinar se o estresse óptico provocado pela radiação emitida por dois LEDs, à luz vermelha (633 nm) e a luz infravermelha (820 nm), irá influenciar o desenvolvimento embrionário;
- Determinar se o momento no qual os embriões serão submetidos ao estresse óptico irá influenciar o desenvolvimento embrionário;
- Determinar apoptose celular em embriões bovinos cultivados *in vitro* submetidos aos LEDs em relação ao cultivo padrão ou grupo controle;
- Verificar se os embriões produzidos sob condições de estresse óptico subletal são mais resistentes ao processo de vitrificação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Com exceção aos reagentes cujo fabricante foi identificado na descrição do método, todos os demais reagentes utilizados no presente estudo foram adquiridos na empresa Nutricell (NUTRICELL®, CAMPINAS, BR).

O presente estudo foi realizado em colaboração dos laboratórios da Estação de Melhoramento e Difusão de Genética Animal (EMDGA / situada dentro da Embrapa de Rio Branco - Acre) e do Laboratório de Fertilização *in vitro* do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ - UNESP – Botucatu / SP).

4.1. Recuperação e classificação dos oócitos

Ovários de abatedouros foram coletados e transportados em PBS (Tampão fosfato-salino) solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio, mantida em uma temperatura entre 30 e 37 °C, até chegar 35 a 45 minutos ao laboratório da Estação de Melhoramento e Difusão de Genética Animal (EMDGA), situada na sede da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Rio Branco- Acre.

As aspirações foliculares foram realizadas utilizando-se uma seringa de 10 ml e agulha 18 G. Os folículos de tamanho entre 2-8 mm foram puncionados e os complexos cúmulos-oócitos imaturos junto com o líquido folicular foram depositados em tubos cônicos (Corning) estéreis de 15 ml e mantidos em banho Maria à 37 °C. Após a sedimentação, o sobrenadante foi eliminado e o pellet suspenso em uma solução de PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foram selecionados 150 oócitos divididos em grupos de 30 oócitos com citoplasma homogêneo e circundados por três ou mais camadas compactas de células do cumulus.

4.2. Maturação *in vitro*

Foram utilizados um total de 1964 oócitos graus 1 e 2 foram lavados em meio TCM 199 com HEPES contendo 10% de SFB, $2 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ de piruvato (solução 100 mM) e $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de gentamicina. Posteriormente, grupos de 20 - 30 oócitos foram distribuídos em gotas contendo 90 μL de meio de maturação composto por TCM 199 com bicarbonato contendo 10% de soro fetal bovino, 0,2 mM de piruvato, $75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de gentamicina, $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de FSH (Pluset®) e $2 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ de hCG (Profasi®), distribuídas em placas de petri e cobertas com óleo mineral. A maturação dos oócitos foi realizada em estufa com umidade saturada e à 38,5 °C, com 5 % de CO₂ em ar, durante 22 a 24 horas.

4.3. Fertilização *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* foi utilizado sêmen proveniente de um único touro da raça Nelore (*Bos indicus*). O descongelamento do sêmen foi realizado em água, à 37 °C por 25 segundos, com posterior avaliação de sua viabilidade. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a superfície do gradiente de Percoll com densidade (45% e 90%) no microtubo (volume de 1mL) e centrifugado a 11500g por 5 minutos. Durante a centrifugação, os oócitos já maturados foram lavados duas vezes novamente em meio TCM 199 com HEPES e uma vez em meio de fertilização, antes de serem transferidos para gotas do mesmo meio (fertilização), cobertas com óleo mineral, em placas de Petri de 35 mm x 10 mm.

Após a centrifugação, os espermatozóides viáveis obtidos do sedimento foram submetidos à avaliação de motilidade e concentração. Desta forma, foi realizada uma diluição correta dos espermatozóides restantes, em volume apropriado de meio de

fertilização, para se obter uma concentração de 2×10^6 espermatozóides . mL⁻¹. Foi utilizado, como meio de fertilização, TL Stock acrescido de BSA livre de ácidos graxos (5 mg . mL⁻¹), 0,2 mM de piruvato, gentamicina (75 µg . mL⁻¹), heparina (11 µg . mL⁻¹) e solução de PHE (44 µL . mL⁻¹). Sendo incubados os oócitos e espermatozóides em estufa, sob as mesmas condições da MIV, por aproximadamente 18 horas. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

4.4. Cultivo *in vitro*

Decorridas às 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados em gotas de TCM 199 HEPES através de pipetagens repetidas para a remoção das células do cumulus (20 estruturas/gota/grupo), em seguida, os zigotos foram lavados duas vezes novamente em meio TCM 199 com HEPES e uma vez em meio de cultivo, sendo então transferidos para placas de cultivo em gotas de 90µL em placas de Petri de 60 mm diâmetro, cobertas de óleo mineral em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂, onde permaneceram até o estágio de blastocisto expandido e eclodido. Como meio de cultivo, foi utilizado o SOFaa (Holm et al., 1999) acrescido de SFB (5%; Gibco) e 0,2 mM de piruvato de sódio e 5mg . mL⁻¹ de BSA livre de ácidos graxos.

Os embriões permaneceram nestas condições de cultivo até o 7º dia (D7), momento este em que foi avaliada a porcentagem de produção de blastocisto, com base no número total de oócitos que foram colocados para maturar e de estruturas clivadas, e atribuído escores com relação ao estágio de desenvolvimento (Blastocisto inicial - 5, Blastocisto - 6, Blastocisto Expandido- 7, Blastocisto Eclodido-8), e grau de qualidade (grau I - excelente- 1, grau II -regular- 2, grau III – pobre- 3 e grau IV - estrutura

degenerada– 4), de acordo com a classificação do manual da *International Embryo Transfer Society* (1998). As eventuais mórulas foram descartadas.

Os embriões do grupo controle foram retirados da incubadora para avaliação no terceiro e sexto dias. Os embriões dos grupos II, III, IV e V foram retirados de incubadora para serem irradiados e avaliados no dia da FIV, no terceiro e sexto dias. Além disso, foram avaliadas as taxas de produção de blastocistos e de blastocistos eclodidos nos dias 7 e 8 após a fertilização, respectivamente. As temperaturas das incubadoras e o teor de CO₂ das mesmas foram rotineiramente mensurados com uso de termômetros de mercúrio e medidor de CO₂.

4.5. Irradiação

Foi utilizado um jogo com quatro LEDs cada, da marca Cromateck® com 3W de potência elétrica, emissão de modo contínuo nos comprimentos de onda de 633nm $\pm$ 10nm (Luz Vermelho) e 820nm $\pm$ 10nm (Luz infravermelho), ambos com potência radiante média de 130mW e lentes lambertianas de ângulo de emissão de 130°. A fonte de alimentação foi desenvolvida junto ao Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociência de Botucatu, o qual também foi responsável pela aferição dos LEDs, através da utilização do equipamento de aferição radiométrica International Light Technologies® modelo IL1400A.

Os embriões foram irradiados em compartimentos limpos e opticamente vedados, para que não houvesse risco de contaminação e para que nenhum indivíduo fosse diretamente exposto à luz LED. Os embriões foram expostos a irradiação de acordo com o esquema abaixo, o qual também detalha a divisão dos grupos. Os grupos experimentais foram compostos por embriões expostos a radiação em cada um dos momentos isolados e ao conjunto de todos os momentos sendo:

Grupo I = controle; foi retirado da estufa e procedido a mesma maneira que os tratados com exceção da indução do LED (n=30);

Grupo II = no momento da incubação dos espermatozoides com os oócitos os gametas receberão dose equivalente à $10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (n=30);

Grupo III = no dia 3 do cultivo embrionário os embriões receberão a mesma dose de irradiação (n=30);

Grupo IV - no dia 6 do cultivo embrionário os embriões receberão a mesma dose de irradiação ($10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) (n=30);

Grupo V - a mesma dose de irradiação ($10 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$) será administrada no momento da fertilização e posteriormente nos dias 3 e 6 de cultivo (n=30).

Os grupos II, III, IV e V foram subdivididos em grupos irradiados com comprimento de onda de 633 nm (R) e com comprimento de onda de 820 nm (IN).

Os embriões permaneceram em cultivo na atmosfera com 5% de CO_2 , 5% de O_2 e 90% N_2 até o 7º dia (168 horas) após a fertilização, quando foram analisados em relação à formação de blastocisto e índice de eclosão. Metade dos embriões foi avaliada quanto ao grau de ocorrência de apoptose, através da técnica de TUNEL e o restante foi submetido a vitrificação (sendo que a re-expansão e o grau de ocorrência de apoptose (TUNEL) foram analisadas posteriormente).

Quadro 1: Cálculo de distância, potência e tempo.

LED de 0.13 watts de Potência		
Distância (cm)	Densidade de Potência (watt/cm^2)	Tempo ($10\text{J}/\text{cm}^2$) (s) – (min)
2	0.029	300.02 – 5
3	0.023	443.05 - 7
4	0.014	724.98 - 12

4.6. Vitrificação dos Embriões

Após o período de cultivo, metade dos embriões formados (blastocistos grau 1 e 2) passaram por um processo de vitrificação previamente descrito (Eldridge-Panuska et al., 2005). Os embriões foram expostos a soluções de vitrificação na temperatura de 22-24 °C, sendo então colocados em uma gota (200 µL) com 1.4 M de glicerol em PBS por 5 minutos, mudando então para outra gota (200 µL) com 1.4 M de glicerol + 3.6 M de etileno glicol por 5 minutos, e então transferida para 30 µL de solução de vitrificação final, contendo 3.4 M de glicerol + 4.6 M etileno glicol (EG/G). Para o envase, 30 µL da solução final de vitrificação contendo o embrião foram colocados dentro de uma palheta de 0,25 mL (IMV, Maple Grove, MN, USA), separada por duas bolhas de ar perfazendo duas colunas (30 µL), seguida de mais duas colunas de solução final de vitrificação (EG/G) e mais duas bolhas de ar. A palheta termina com a colocação de duas colunas (60 µL) com 0.5 M de galactose em base média. O tempo total de exposição dos embriões à solução final de vitrificação e a colocação dentro da palheta (envase) foi menor que 1 minuto. As palhetas foram lacradas e colocadas por 1 minuto dentro de um globete plástico resfriado (10 mm x 120 mm, IMV, Maple Grove, MN, USA) e depois foram mergulhadas em nitrogênio líquido.

No aquecimento a palheta ficou por 10 segundos a temperatura ambiente sendo posteriormente mergulhada em um banho maria a 20°C por 10 segundos. O conteúdo da palheta foi depositado em uma placa de Petri, sendo agitada gentilmente para facilitar a mistura da solução de vitrificação (EG/G) e a solução de diluição (galactose). O embrião foi então transferido para uma gota de 200 µL com 0.25 M de galactose em PBS por 5 minutos e então transferida para o PBS, para posteriormente retornar para um o cultivo adicional de 16 horas, sob as mesmas condições, para avaliar a sobrevivência embrionária. Após este

período e análise dos embriões, foi realizada a técnica de TUNEL para identificar a ocorrência de apoptose.

4.7. TUNEL (Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling)

A outra metade dos embriões, resultante do período de cultivo e que não foram vitrificados, foram submetidos a técnica de TUNEL que identifica *in situ*, a fragmentação internucleossômica do DNA, evento resultante da apoptose. Esta avaliação foi realizada com o “Kit in Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein” (Roche®, Alemanha) conforme as especificações do fabricante.

4.8. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com as características das variáveis estudadas, de forma que, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi realizado o teste ANOVA seguido do post hoc de Tukey. Esta análise permitiu que os grupos controle e irradiados pudessem ser comparados em relação aos diferentes comprimentos de onda aplicados.

Segue, na figura 2, um fluxograma resumindo os passos que foram realizados para o presente estudo:

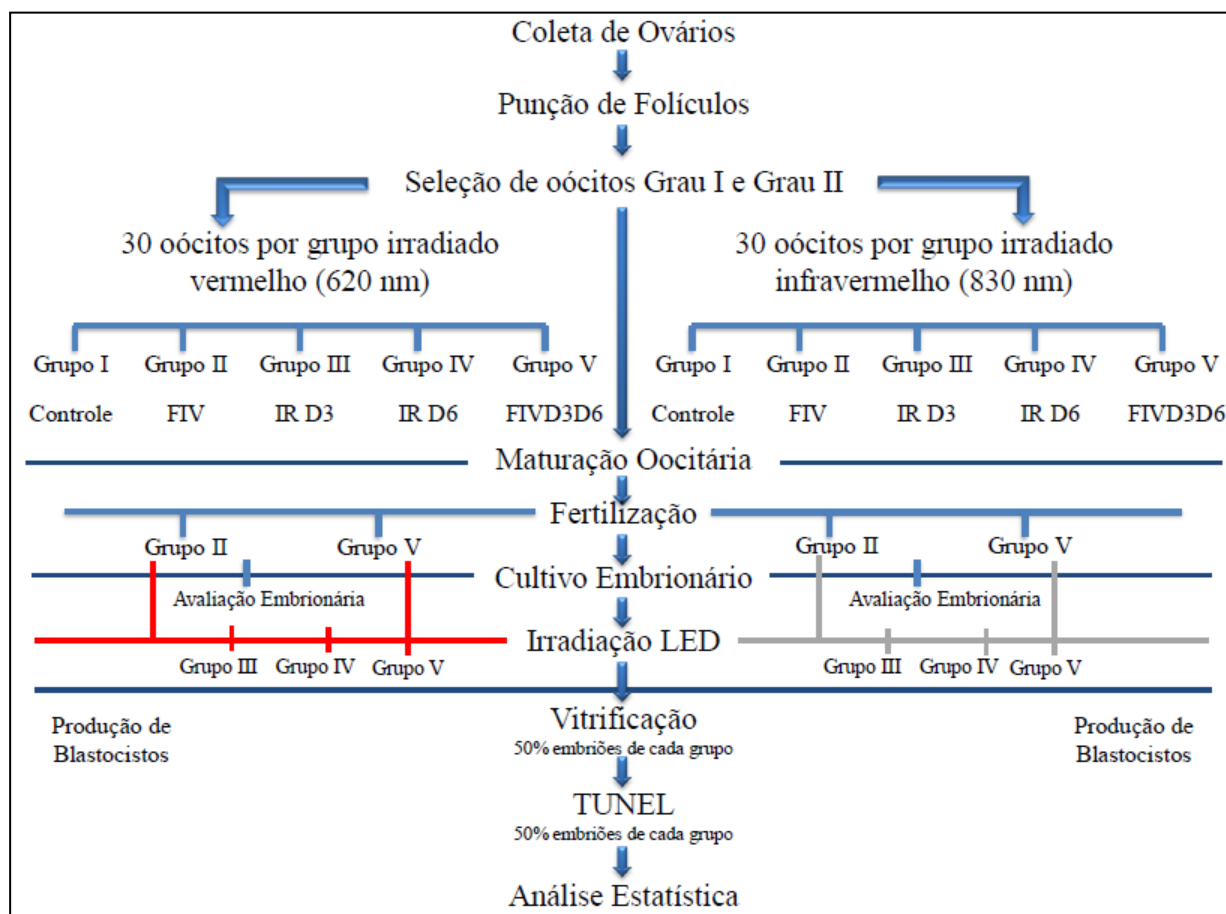


Figura 2: Fluxograma que sumariza as etapas do estudo.

5. RESULTADOS

O presente estudo avaliou o efeito do estresse subletal óptico anterior à vitrificação, a partir do uso de LED, em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Para isto, as amostras foram avaliadas em diferentes momentos, considerando os estágios celulares em que se encontravam, os quais envolveram desde a formação do zigoto, até o seu desenvolvimento em blastocisto. As comparações entre os diferentes grupos levaram em conta os embriões antes e após o procedimento de vitrificação, comparando grupos que foram irradiados com LED com o grupo controle que não foi irradiado e, da mesma forma, foi realizada a comparação entre diferentes espectros de luz, através da análise de parte dos embriões que foi irradiada com luz infravermelha (faixa de 820 nm) e a outra parte que foi irradiada com luz vermelha (faixa de 633 nm). Além disso, também foi considerado como os embriões iriam responder ao estresse óptico considerando o processo de vitrificação e reaquecimento das células. Para a análise estatística, foi considerado um intervalo de confiança de 95%, ou seja, os resultados com diferença estatística apresentaram valor de $p < 0,05$.

Em relação à produção de blastocisto de embriões frescos (figura 3), não houve diferença entre os grupos no que se refere à porcentagem de clivagem (definida pela divisão do embrião a partir do terceiro dia de cultivo até a formação do blastocisto). Porém, considerando a porcentagem da taxa Blastocistos/oócitos, observou-se que os grupos FIVD3D6verm e IRD3verm são semelhantes entre si, assim como os grupos IRD3inf e IRD6inf. Entretanto, existe diferença estatística entre a comparação FIVD3D6verm e IRD3verm quando comparado com IRD3inf e IRD6inf. Além disso, existe diferença estatística comparando IRD3verm com IRD3inf, assim como IRD6verm com IRD6inf (Tabela4).

Outra comparação foi feita em relação à porcentagem da taxa Blastocistos/clivados. Esta comparação mostrou que há diferença estatística entre as irradiações de vermelho e infravermelho em FIVD3D6 (FIVD3D6ver tem menor porcentagem de taxa de blastocisto/oócito do que FIVD3D6inf). Considerando a comparação da porcentagem da taxa de Blastocistos/clivados, observou-se e que o grupo FIVD3D6ver apresenta uma porcentagem da taxa menor quando comparada ao controle e ao grupo IRFIVver. Além disso, em relação à irradiação por infravermelho, o grupo IRD6 apresentou uma taxa de blastocistos/clivados estatisticamente maior do que o grupo FIVD3D6, embora ambos não tenham apresentado diferença em relação ao controle (Tabela 1).

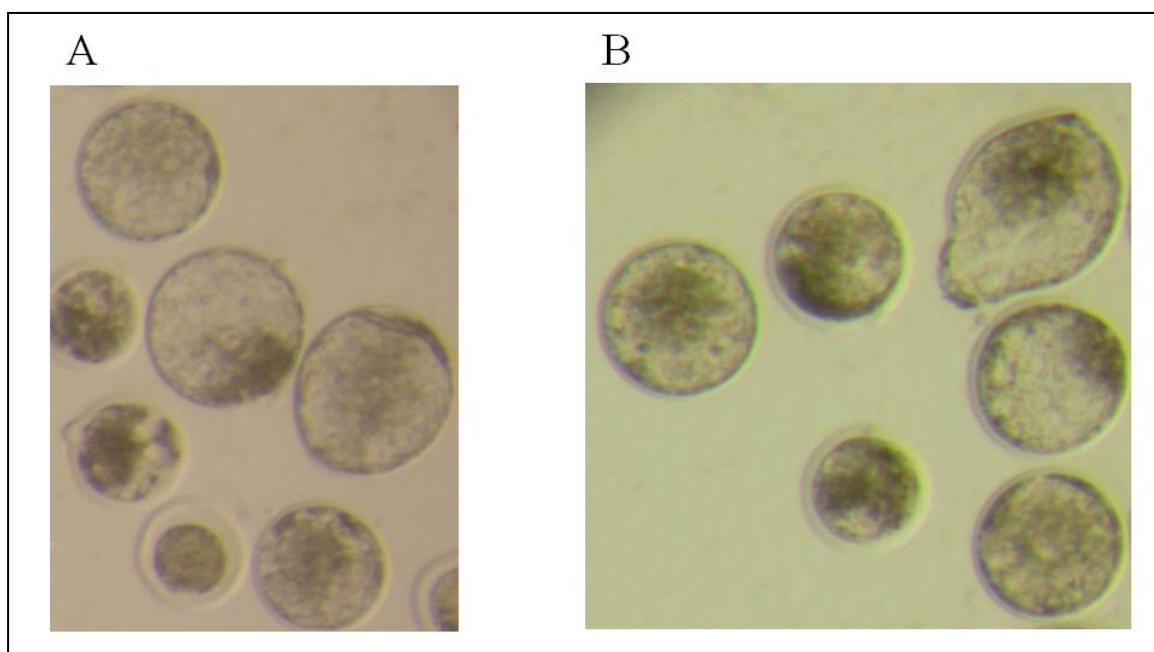


Figura 3: Fotos dos blastocistos frescos. A - Embriões representando o grupo que foi fotoestimulado com LED em 633 nm. B - Embriões representando o grupo que foi fotoestimulado com LED em 820 nm.

Tabela 1: Produção de blastocistos no grupo controle e após a irradiação com LED em diferentes momentos.

Grupo	Oócitos	Clivagem (%)	Blastocistos/oócitos (%)	Blastocisto/clivados (%)
Controle	386	63,5±2,3	23,2±2,9 ^{abc}	36,8±4,6 ^{ac}
FIVD3D6inf	141	74,5±2,4	20,2±4,5 ^{ab}	29,0±7,2 ^a
FIVD3D6verm	250	68,4±2,4	14,8±3,8 ^b	20,9±5,9 ^b
IRD3inf	140	74,3±2,6	31,3±4,5 ^c	41,8±7,2 ^{ac}
IRD3verm	265	60,0±2,9	18,8±3,8 ^b	28,8±5,9 ^{ab}
IRD6inf	139	69,8±2,6	33,3±4,5 ^c	49,1±7,2 ^c
IRD6verm	242	63,2±2,8	19,4±3,8 ^{ab}	34,3±5,9 ^{abc}
IRFIVinf	150	70,0±2,9	28,5±4,5 ^{ac}	42,8±7,2 ^{ac}
IRFIVverm	251	64,5±2,3	29,0±3,8 ^{ac}	44,9±5,9 ^{ac}

^{abcd} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem. N=30 embriões por grupo.

Tabela 2: Número de total de células, células apoptóticas e porcentagem de apoptose nos embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos (média dos quadrados mínimos ± SEM).

Grupo	Células (Nº)	Células apoptóticas (Nº)	Apoptose (%)
Controle	91,9±4,1 ^{ab}	4,3±0,9	4,6±0,9
FIVD3D6inf	92,8±6,3 ^{ab}	4,1±1,4	4,4±1,4
FIVD3D6verm	94,4±5,8 ^{ab}	3,1±1,3	3,4±1,3
IRD3inf	112,8±5,1 ^c	8,3±1,1	7,5±1,1
IRD3verm	91,1±6,3 ^{ab}	4,3±1,4	4,8±1,4
IRD6inf	94,0±4,6 ^{ab}	4,2±1,0	4,5±1,0
IRD6verm	102,0±5,8 ^{bc}	6,1±1,3	5,8±1,3
IRFIVinf	84,5±5,8 ^a	5,4±1,3	6,3±1,3
IRFIVverm	84,8±6,9 ^{ab}	5,8±1,5	7,0±1,5

^{abc} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem. N=30 embriões por grupo.

Considerando os resultados obtidos em relação aos embriões frescos, através da análise de apoptose prévia à vitrificação, com e sem estímulo por LED, pode-se observar que existe diferença em relação ao número total de células presente em cada grupo. Desta forma, pode-se observar principalmente que o grupo IRD3inf diferiu dos demais grupos, com exceção do grupo IRD6verm.

Entretanto, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação aos embriões frescos comparando os grupos controle e irradiados, quando se considera o número de células apoptóticas e a porcentagem de apoptose, indicando que tanto no grupo irradiado com luz infravermelha como no grupo irradiado com luz em comprimento de onda vermelho existir células com núcleo intacto com uma frequência maior (Tabela 2/Fig. 4).

Considerando a comparação entre os grupos, no que se refere à análise de apoptose após a vitrificação, considerando o efeito da radiação por LED, pode-se observar diferença entre os grupos controle com: irradiado com LED 633 nm no dia da fertilização, em D3 e D6 (FIVD3D6verm), irradiado em D3 com LED 633 nm (IRD3verm), irradiado em D6 com LED 820 nm (IRD6inf) e irradiado com LED 820 nm durante a fertilização *in vitro* e irradiado em D6 com LED (IRFIVinf), de forma que todos os grupos que foram irradiados com infravermelho (820 nm) apresentaram uma taxa de apoptose menor quando comparados ao controle e os grupos que foram irradiados com LED na faixa de vermelho (633 nm) apresentaram maior taxa de apoptose quando comparados ao controle (Tabela 3). As imagens que representam a análise de apoptose são apresentadas na figura 5.

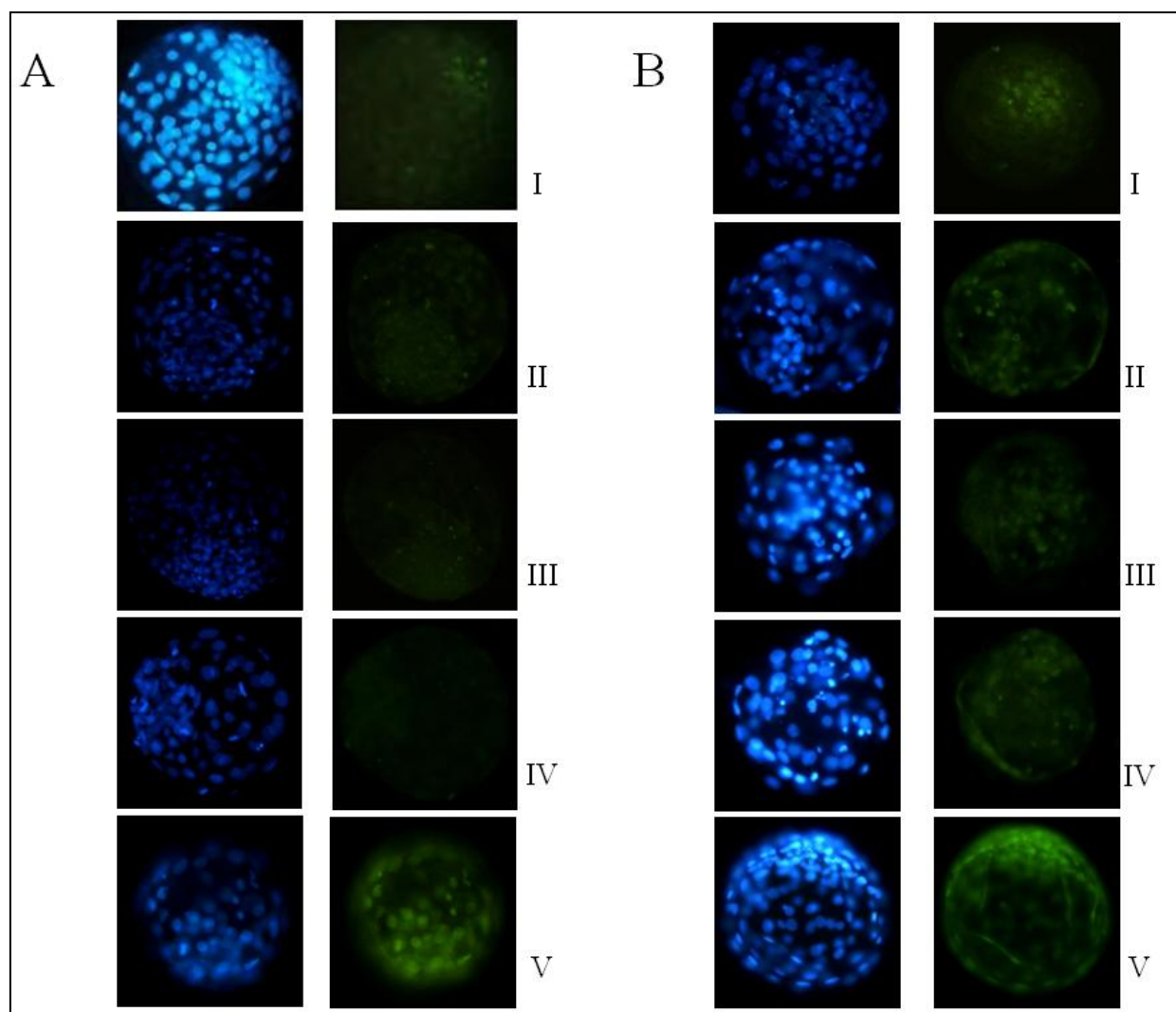


Figura 4: Embriões analisados quanto à fragmentação do DNA de seus núcleos, após a fotoestimulação por LED, antes do procedimento de vitrificação. A – Embriões fotoestimulados por LED em luz infravermelha. B – Embriões fotoestimulados por LED em luz vermelha. A coloração azul corresponde à solução de Hoechst 33342, demonstrando células que possuem o DNA intacto e a coloração verde corresponde às células marcadas com o corante Fic, demonstrando que tais núcleos apresentam o DNA fragmentado - Células apoptóticas. I, II, III, IV e IV: definição dos grupos de acordo com o procedimento realizado em cada um.

Tabela 3: Número de total de células, células apoptóticas e porcentagem de apoptose nos embriões bovinos produzidos *in vitro* após a vitrificação, aquecimento e re-cultivo (média dos quadrados mínimos $\pm$ SEM).

Grupo	Células (No)	Células apoptóticas (No)	Apoptose (%)
Controle	95,3 $\pm$ 2,5	11,6 $\pm$ 0,8 ^a	12,2 $\pm$ 0,8 ^a
FIVD3D6inf	92,4 $\pm$ 4,3	10,2 $\pm$ 1,4 ^{ac}	11,0 $\pm$ 1,4 ^{ad}
FIVD3D6verm	94,6 $\pm$ 3,0	15,8 $\pm$ 1,0 ^b	16,7 $\pm$ 1,0 ^b
IRD3inf	96,3 $\pm$ 4,6	13,5 $\pm$ 1,6 ^{ab}	14,1 $\pm$ 1,5 ^{ab}
IRD3verm	99,9 $\pm$ 3,6	15,6 $\pm$ 1,2 ^b	15,5 $\pm$ 1,2 ^b
IRD6inf	86,1 $\pm$ 4,0	6,6 $\pm$ 1,3 ^c	7,6 $\pm$ 1,3 ^d
IRD6verm	89,3 $\pm$ 4,0	16,1 $\pm$ 1,3 ^b	14,3 $\pm$ 1,3 ^{ab}
IRFIVinf	92,9 $\pm$ 3,6	7,8 $\pm$ 1,2 ^c	8,5 $\pm$ 1,2 ^{cd}
IRFIVverm	87,2 $\pm$ 3,1	9,6 $\pm$ 1,0 ^{ac}	11,1 $\pm$ 1,0 ^{ac}

^{abcd} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem. N=30 embriões por grupo.

Tabela 4: Taxa de Reexpansão dos embriões do grupo controle e irradiados após a vitrificação.

Grupo	Reexpansão (%)
Controle	70,5 $\pm$ 5,8 ^a
FIVD3D6inf	52,6 $\pm$ 10,9 ^{ab}
FIVD3D6verm	64,5 $\pm$ 8,5 ^a
IRD3inf	75,8 $\pm$ 8,8 ^a
IRD3verm	39,3 $\pm$ 8,3 ^b
IRD6inf	75,0 $\pm$ 7,9 ^a
IRD6verm	54,8 $\pm$ 8,5 ^{ab}
IRFIVinf	60,6 $\pm$ 8,3 ^{ab}
IRFIVverm	59,5 $\pm$ 6,9 ^{ab}

^{ab} Letras sobrescritas incomuns na mesma coluna diferem. N=30 embriões por grupo.

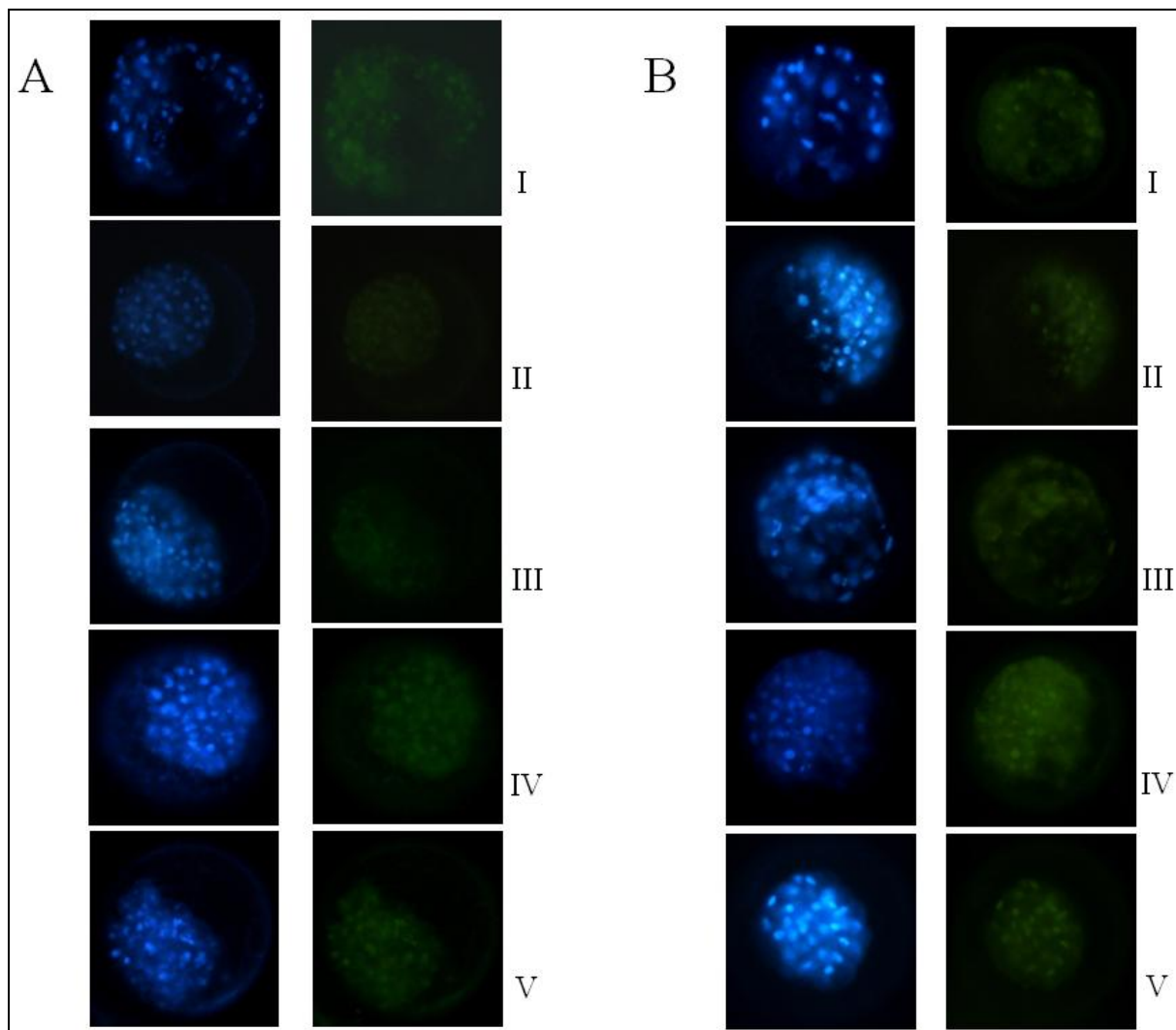


Figura 5: Análise da fragmentação do DNA de embriões, após a fotoestimulação por LED e o procedimento de vitrificação. A – Embriões fotoestimulados por LED em luz infravermelha. B – Embriões fotoestimulados por LED luz vermelha. A coloração Azul corresponde à solução de Hoechst 33342, demonstrando células que possuem o DNA intacto e a coloração verde corresponde às células marcadas com o corante Fic, demonstrando que tais núcleos apresentam o DNA fragmentado - Células apoptóticas. I, II, III, IV e V: definição dos grupos de acordo com o procedimento realizado em cada um.

Ao analisar a taxa de reexpansão após a vitrificação, foi possível observar que houve diferença em relação ao grupo controle quando comparado ao grupo irradiado com LED em luz vermelha em D3, de forma que a porcentagem da taxa de reexpansão pós vitrificação foi maior no grupo controle (Tabela 4). As imagens que representam a análise da taxa de reexpansão dos blastocistos são representadas pela figura 6, através de fotos dos embriões, considerando os diferentes grupos.

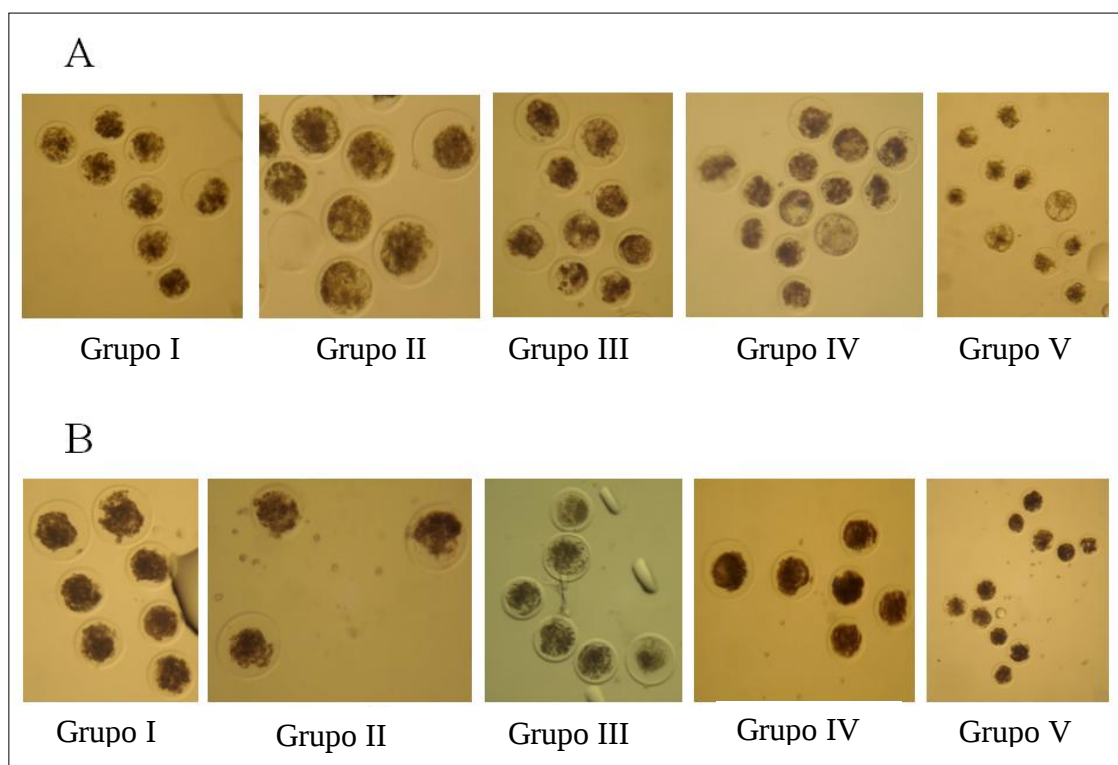


Figura 6: Blastocistos avaliados após a reexpansão. A – Embriões fotoestimulados por LED em 820 nm. B – Embriões fotoestimulados por LED em 633 nm.

6. DISCUSSÃO

As propriedades ópticas dos tecidos correspondem a um importante tópico que merecem atenção. Quando a luz atinge o tecido biológico, parte dela é absorvida, parte é refletida ou dispersa, e parte é mais transmissível. Uma parte da luz é refletida, fenômeno devido a uma alteração do índice de refração do ar e do tecido. De qualquer forma, a maior parte da luz é absorvida pelo tecido, o que faz com que os efeitos desejáveis ao tecido aconteçam. Outro aspecto importante corresponde ao espalhamento da luz no tecido biológico, uma vez que determina o volume de distribuição da intensidade da luz no tecido. Este é o primeiro passo para a interação luz-tecido, a qual é seguida pela absorção (Chung et al., 2012).

A forma como estes fenômenos devem ocorrer no embrião ainda permanece desconhecida, embora a partir dos resultados obtidos possa-se sugerir que existe uma interação rápida entre eles, visto que o metabolismo do embrião encontra-se ativo durante as fases do desenvolvimento analisadas. No presente experimento os embriões foram irradiados no momento da fertilização, no D3 e no D6 de desenvolvimento, bem como repetidamente nos 3 momentos, sendo que não foram observadas alterações no desenvolvimento embrionário entre os momentos de irradiação. Isto indica que independente do estágio de desenvolvimento, os embriões bovinos tem condições de responder a terapia fotoestimuladora com LED mantendo o seu crescimento semelhante ao do grupo controle.

É importante considerar que, quando os embriões foram irradiados, acredita-se que somente os blastômeros mais superficiais foram atingidos, devido à conformação tridimensional do embrião. Isso é mais evidente nos embriões tratados no D6, onde somente as células mais externas do trofotoderma podem ter sofrido o estímulo. Desta

forma, podemos também explicar o motivo de em alguns casos a análise de apoptose ter aparecido mais em algumas células do que em outras. Além disso, independente do estímulo de luz oferecido aos embriões não obtivemos efeito positivo significativo estatisticamente na produção de blastocistos, uma vez que não houve diferença entre os grupos e, da mesma forma, a produção de blastocistos nos grupos irradiados também não foi menor do que o esperado. Entretanto vale a pena ressaltar que numericamente os grupos tratados com LED na faixa infravermelho nos dias 3 e 6 do cultivo tiveram um incremento de quase 10 pontos percentuais na produção de blastocistos/oócitos, o que economicamente é bastante relevante.

A partir das abordagens referidas, a hipótese deste trabalho consistiu em analisar a possibilidade do tratamento com o uso de LED em células embrionárias em diferentes estágios para que se tornem mais resistentes durante um período antes que os embriões sejam transferidos. Neste estudo, sua importância está relacionada ao fato de que a PIV de embriões apresenta-se como uma ferramenta importante para a pesquisa sobre o desenvolvimento embrionário, além de ser uma técnica economicamente significativa no mercado de reprodução animal atual. Apesar de todo o avanço no desenvolvimento dos sistemas de PIV, o processo de criopreservação embrionário surge como um obstáculo à esta tecnologia, devido à alta sensibilidade dos embriões ao procedimento é vitrificação (Mucci et al., 2006).

Assim, uma das formas discutidas atualmente refere-se à indução de estresse embrionário prévio à vitrificação, com o objetivo de estimular o embrião para que o mesmo desenvolva uma maior resistência às condições externas, visto que o mesmo é produzido *in vitro* e também à vitrificação.

Como mencionado anteriormente, o estresse óptico em geral pode prejudicar o desenvolvimento de embriões, levando à sua inviabilidade por lesões ao DNA de suas

células, produção de ROS e morte celular (Lane & Gardner, 2005; Takahashi et al., 1999). Em relação ao uso de luz nas técnicas de reprodução assistida, tem-se o uso de luz como lasers com uma grande aplicabilidade. O laser tem sido útil no tratamento de oócitos e de espermatozoides, de forma que oócitos são tratados para ablação da zona pelúcida ou somente furos através dele. Quanto aos espermatozoides, o uso do laser pode ser útil para avaliação da viabilidade dos mesmos (Karu, 2012).

Ao analisar os resultados encontrados neste trabalho, foi possível observar através da análise de apoptose após a vitrificação que a radiação por LED com luz infravermelha aos embriões logo após a fertilização ou no sexto dia de avaliação apresenta resultado benéfico ao embrião, podendo ter um efeito protetor à apoptose, uma vez que nos grupos citados a taxa de apoptose foi menor em comparação aos outros grupos, incluindo o grupo controle.

Estudos em células neuronais demonstraram que a luz infravermelha pode proteger as células da morte celular induzida por cianeto de potássio, um inibidor da enzima citocromo c oxidase (Wong-Riley et al., 2005). Da mesma forma, para os embriões em D6, acreditamos que a irradiação por infravermelho teve efeito protetor da apoptose, o que poderia estar relacionado com uma interação direta entre a luz e o citocromo c ou indireta, ativando proteínas da família HSP, as quais poderiam ter-se ligado ao citocromo c para sua regulação.

Em contraste com a terapia fotodinâmica, fotobiomodulação utiliza luz para afetar a atividade de uma ou mais enzimas endógenas fotorreceptores, que provavelmente iniciam vias de sinalização celular e alteram o metabolismo das células e de tecidos, bem como a proliferação celular. Embora os mecanismos subjacentes aos benefícios terapêuticos da fotobiomodulação ainda não sejam completamente compreendidos, um primeiro passo importante no entendimento deste fenômeno tem vindo principalmente da constatação de

que citocromo c, a molécula terminal da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é um fotorreceptor que medeia muitos efeitos positivos da fotobiomodulação e a molécula mais importante em células e tecidos, que absorve a luz na faixa entre 630 e 900 nm (responsável por mais de 50 % da absorção superior a 800 nm) promovendo o metabolismo celular (Karu et al., 2005b).

No entanto, um estudo relativamente recente, examinou uma série de espectros de diferentes processos biológicos, tais como a proliferação, a adesão das células à matriz, e as taxas de síntese de DNA e RNA de ação. Estes espectros de ação foram medidos em várias intensidades de luz e duração diferentes comprimentos de onda. Na região do espectro vermelho duas bandas de absorção de citocromo c foram encontradas cerca de 620 e 680 nm, os espectros de ação foram comparados com os espectros de absorção de monocamadas de células na região de 600-860 nm e o exame revelou que existe semelhança das principais bandas, em ambos os casos (Karu & Kolyakov, 2005).

Em nosso estudo, o tratamento realizado com o LED foi muito semelhante ao trabalho conduzido por Silva (2008) no qual os embriões produzidos *in vitro* foram irradiados com laser visível e infravermelho, com o objetivo de mostrar os efeitos da irradiação na fertilização *in vitro* e no cultivo. Como resultados, os autores não apresentaram diferenças estatísticas significativas na produção de clivados, nem na produção total embrionária em relação aos grupos controle, considerando a aplicação com laser infravermelho.

Os possíveis mecanismos que podem estar relacionados com a apoptose e/ou sobrevivência dos embriões após a fotobiomodulação seguida de vitrificação não foram molecularmente analisados, entretanto alguns estudos fornecem embasamento para que algumas vias possam ser sugeridas, como por exemplo a ativação de proteínas de sobrevivência.

As HSPs fazem parte de uma família de “proteínas de sobrevivência”, as quais foram reconhecidas por proteger as células de processos como apoptose e necrose, que podem ser causados a partir de estresses como choque térmico e estresse oxidativo. Em um estudo no qual analisaram o papel da HSP contra a apoptose induzida pela radiação em cultivo de células tumorais Jurkat (que correspondem a uma linhagem de linfócitos T derivada da leucemia), foi encontrada uma relação entre os níveis de expressão de HSP27 e a resistência à radiação em células tumorais, principalmente nas linhagens Jurkat1-Hsp27 e Hsp27-Jurkat2, indicando que elas ficam mais resistentes à apoptose quando esta proteína é expressa em uma condição de estresse (Aloy et al., 2008). A forma como as HSP pode atuar na células, prevenindo-as de apoptose, refere-se à ligação da HSP 27 à pró-caspase 3, inibindo sua ativação e consequentemente inibindo toda a cascata de ativação de morte celular (Pandey et al., 2000).

Em contrapartida, Paul e colaboradores (2002) propuseram um mecanismo diferente para a ação da HSP na inibição da apoptose, de forma que sugeriram que a HSP27, dependendo do seu nível de expressão, interfere na liberação do citocromo c da mitocôndria, apesar de o mecanismo molecular envolvido nesta função não ser bem compreendido. Além disso, os autores também sugeriram que mudanças no nível da proteína podem interferir com sinais que ocorrem antes dos eventos da mitocôndria (Paul et al., 2002).

Estudos realizados por Frank e colaboradores (2004) demonstraram, em análises *in vitro*, que a irradiação com luz infravermelha protege os fibroblastos dérmicos humanos normais da citotoxicidade de luz ultravioleta. Para isto, este trabalho realizou análise de atividade de caspase-9 e -3, de forma que a irradiação com luz infravermelha inibe a ativação das caspases que atuam no início dos processos moleculares de apoptose. Acredita-se que este evento ocorreu devido à indução da expressão da proteína Hsp27 através da

prevenção da montagem do apoptossomo. Além disso, foram observadas alterações de membrana mitocondriais, sugerindo que as mitocôndrias das células de fígado de ratos possam ser o alvo da irradiação por luz infravermelha (Frank et al., 2004).

Em sua maior parte, os estudos mencionados estão envolvidos na busca de formas de silenciar as HSP, visto que seus objetivos consistem em encontrar uma forma de tornar estas proteínas alvos para a terapia anticâncer. No entanto, para o presente estudo, a possibilidade da atuação das HSP como um mecanismo de proteção celular aparenta ser benéfico, pois tornaria o embrião mais resistente ao cultivo e vitrificação.

Avaliando o efeito do uso de LED na fotobiomodulação dos embriões em nosso experimento, é possível inferir que o LED gerou estresse em determinadas fases do desenvolvimento embrionário, levando a ativação de genes de sobrevivência como os envolvidos na síntese de proteínas, como a HSP, o que poderia prevenir os embriões de entrarem em apoptose. Neste estudo, foi demonstrado que a utilização do LED infravermelho impediu o desencadeamento de apoptose, o que não está de acordo com os resultados obtidos com a aplicação do LED vermelho, ao qual apresentou uma maior taxa de células em apoptose. Apesar do presente estudo não ter analisado a expressão de genes que possam estar relacionados com o estresse embrionário, esta abordagem parece ser relevante para experimentos futuros.

É importante salientar que apesar de não ter sido encontrada diferença em relação às taxas de apoptose, de forma geral, pode-se inferir que o LED, em relação à irradiação por luz infravermelha apresentou menor taxa de apoptose, enquanto a irradiação por luz vermelha teve um efeito no aumento da apoptose em comparação ao controle.

A vitrificação já é confirmada como um excelente método de criopreservação de células, principalmente de embriões. A vitrificação de embriões, embora tenha surgido ao final da década de 1980, não havia sido aplicada na prática clínica até pouco tempo atrás.

Entretanto, é um procedimento que tem mostrado resultados satisfatórios, uma vez que os métodos aplicados aperfeiçoaram-se através do uso do volume mínimo para a realização do procedimento. Ainda assim, três aspectos importantes precisam ser considerados, os quais são as taxas de congelamento e aquecimento das células; viscosidade do meio no qual os embriões estão suspensos e o volume utilizado para a vitrificação (Arav, 2014). Desde então, estudos relacionando a qualidade do embrião com o procedimento de criopreservação vem sendo publicados, considerando diversos aspectos mencionados acima.

Em um trabalho com células-tronco embrionárias foi demonstrado que a vitrificação oferece poucos danos às células, uma vez que as células da linhagem estudada apresentou a expressão de marcadores pluripotentes conservadas após a vitrificação, comprovando assim que estas células continuaram a apresentar o potencial de se diferenciar em qualquer um dos três tipos de folheto embrionário (Pashaiasl et al., 2013).

Em outro estudo, realizado por Sudano (2011), foi avaliada a suplementação de soro fetal bovino e etosulfato de fenazina em meios de cultura durante a produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação sobre desenvolvimento de embriões PIV, acúmulo lipídico citoplasmático, apoptose e criotolerância. O estudo relacionou a acumulação de lípidos como consequência de uma série de eventos de depreciação na qualidade dos embriões PIV, incluindo a adição de etosulfato de fenazina ao meio de cultura, o desequilíbrio do metabolismo de oxidação-redução (redox) e o aumento de ROS, fatores que podem levar ao aumento da sensibilidade dos embriões para a criopreservação. Além disso, a análise da qualidade do embrião, realizada pela apoptose, em blastocistos frescos, está altamente relacionada à sobrevivência embrionária após a vitrificação (Sudano et al., 2011).

No presente trabalho, a apoptose pode ter sido influenciada também pela vitrificação, considerando a possibilidade de injúrias que a célula pode sofrer devido ao preparo do embrião durante o processo e a alta relação que pode ser estabelecida entre apoptose e vitrificação.

A luz vermelha e infravermelha tem um papel regulador que pode induzir alterações em muitos processos de crescimento, desenvolvimento e metabolismo celular. Os processos de mudanças induzidos pela fotobioestimulação no metabolismo celular podem ser acionados através de vários mecanismos primários, incluindo mudanças nas propriedades de redox de fotoreceptores ou geração de espécies de oxigênio ou ânion superóxido-radical. Estes processos podem envolver a interação do fotoreceptores com oxigênio, bem como a capacidade de dissipação da energia absorvida pelos fotoceptores como calor, alterações na proporção antioxidante em células, ou mesmo a alteração dos gradientes de temperatura e de pressão no local onde a energia da luz foi absorvida (Kreslavskia et al., 2012). O fato dos embriões bovinos aqui estudados terem tido uma melhor resposta a estimulação pelo LED infravermelho, do que o vermelho não pode ser explicado com a metodologia utilizada neste projeto. Desta forma um maior número de estudos envolvendo a produção de HSP e genes relacionados a apoptose precisam ser desenvolvidos.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1- O tratamento dos embriões durante o período estudado, em relação ao tempo de exposição, ao período, e a intensidade (potência), não foi suficiente para demonstrar uma influência direta no desenvolvimento embrionário;
- 2- O tratamento realizado com o LED infravermelho (IRD3inf e IRD6inf) possibilitou uma proteção as células embrionárias no período de tratamento, no entanto, não diferiu da taxa de produção final de blastocistos;
- 3- O tratamento realizado com o LED em luz vermelha (FIVD3D6verm e IRD3verm) apresentou maiores taxas de apoptose após a vitrificação durante os momentos de tratamento, no entanto, não interferiu na taxa de produção final de blastocistos;

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados obtidos com o presente estudo, consideramos importante estudar os mecanismos subjacentes ao metabolismo e sobrevivência embrionária através da utilização de LEDs.

Como alternativas, pode-se utilizar a adição de outros tipos de comprimento de onda, como os nas faixas azul e verde, além dos comprimentos de ondas já trabalhados. Da mesma forma, mais estudos com os mesmos comprimentos de ondas usados neste experimento podem ser realizados com diferentes tempos de exposição à irradiação e diferentes doses, visto que já existem moléculas fotorreceptoras responsáveis do efeito de bioestimulação para cada uma destas ondas, principalmente em relação à fotorregulação de processos celulares como pelos papeis desempenhados por moléculas como porfirinas, citocromos e flavoproteínas, entre outros fotorreceptores atuantes na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial em células de mamíferos.

9. REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**. v. 61(1) p. 57-66, 2002.
- AL-KATANANI, Y.M.; HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction Development**. v. 62 p. 174-180, 2002.
- ALOY, M.T.; HADCHITY, E.; BIONDA, C.; DIAZ-LATOUD, C.; CLAUDE, L.; ROUSSON, R.; ARRIGO, A.P. RODRIGUEZ-LAFRASSE C. Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. v.1;70(2) p. 543-53, 2008.
- ALVAREZ, J.G.; MINARETZIS, D.; BARRETT, C.B. The sperm stress test: a novel test that predicts pregnancy in assisted reproductive technologies. **Fertility and Sterility**. v. 65 p. 400-405, 1996.
- AMBROSE, J.D.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUFLEDGE, M.L.; THATCHER, M-J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 82 p. 2369-2376, 1999.
- ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**. v. 1;81(1) p. 96-102, 2014.

- ASHKENAZI, A., DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**. v. 281 p. 1305– 1308, 1998.
- ASHKENAZI, A.; & DIXIT, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 11 p. 255– 260, 1999.
- BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v. 27 p. 227–238, 2008.
- BAROLET, D.; ROBERGE, C.J.; AUGER, F.A.; BOUCHER, A.; GERMAIN, L. Regulation of skin collagen metabolism *in vitro* using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 129(12) p. 2751–9, 2009.
- BARROS, C.M.; MONTEIRO, F.M.; MELLO, D.S.; CARVALHO, L.M.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L.A.; FREITAS, E.C. Resistance of *Bos indicus* to heat shock, compared to crossbred or *Bos Taurus*, at early stages of *in vitro* embryo development. **International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants, 6th, Scotland**, p. A4, 2002.
- BARROS, C.M.; PEGORER, M.F.; VASCONCELOS, J.L.; EBERHARDT, B.G.; BAVISTER, B.D. Culture of pre-implantation embryos: Facts and artifacts. **Human Reproduction Update**. v. 1 p. 91–148, 1995.
- BEEHLER, B.C.; PRZYBYSZEWSKI, J.; BOX, H.B. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. **Carcinogenesis**. v.13 p. 2003-2007, 1992.
- BROWN, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1411 p. 351-360, 1999.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 117 p. 97–105, 1999.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction Development**. v. 59 p. 451-8, 2001.

CHEN, A.C.H.; ARANY, P.R.; HUANG, Y.Y. Low level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **SPIE**. v. 7165, p. 7165081–10, 2009.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**. v. 40(2) p. 516-33, 2012.

COHEN, N.; LUBART, R.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of *in vitro* fertilization and calcium signals. **Photochemistry and Photobiology**. v. 68 p. 407-413, 1998.

DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **Journal of Andrology**. v. 19 p. 585-594, 1998.

DESAGHER, S., OSEN-SAND, A., NICHOLS, A., ESKES, R., MONTESSUIT, S., LAUPER, S., MAUNDRELL, K., ANTONSSON, B., MARTINOU, J. C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. **The Journal of Cell Biology**. v. 144 p. 891– 901, 1999.

DROST, M.; THATCHER, M. J. D.; CANTRESS, C.K.; WOLFSDORF, K.E.; HASLER, J.F.; THATCHER, W. W. Conception rates after artificial insemination or transfer of frozen/thawed embryos to lactating cows during summer. **Journal of Dairy Science**. v. 77 p. 380, 1994.

DU, Y.; LIN, L.; SCHMIDT, M.; BØGH, I. B.; KRAGH, P. M. High hydrostatic pressure treatment of porcine oocytes before handmade cloning improves developmental competence and cryosurvival. **Cloning Stem Cells**. v. 10 p. 325–330, 2008.

DU, Y.; PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; KUWAYAMA, M.; PEDERSEN, A.M.; VILLEMOES, K.; BOLUNND, L.; VAJTA, G. High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction**. v. 135 p. 13–17, 2008b.

EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**. v. 76 p. 2899- 2905, 1993.

EDWARDS, J.L.; EALY, A.D.; MONTERROSO, V.H.; HANSEN, P.J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 48 p. 25–33, 1997.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. v. 46 p. 138-45, 1997.

EDWARDS, J.L.; HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biology of Reproduction**. v. 55 p. 340-346, 1996.

EELLS, J.T.; WONG-RILEY, M.T.T.; VERHOEVE, J.; HENRY, M.; BUCHMAN, E.V.; KANE, M.P.; GOULD, L.J.; DAS, R.; JETT, M.; HODGSON, B.D.; MARGOLIS, D.; WHELAN, H.T. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**. v. 4 p. 559-567, 2004.

FEDER, M.E.; HOFFMAN G.E. Heat Shock proteins, molecular chaperones and stress response. Evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**. v. 6, 243-282, 1999.

FRANK, S.; OLIVER, L.; LEBRETON-DE COSTER, C.; MOREAU, C.; LECABELLEC, M. T.; MICHEL, L.; VALLETTE, F. M.; DUBERTRET, L.; COULOMB, B. Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 123(5) p. 823-31, 2004.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**. v. 55(6) p. 1341-57, 2001.

GARDNER, D. K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 20(1) p. 9-18, 2008.

GARDINER, C.S.; SALMEN, J.J.; BRANDT, C.J. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically-induced glutathione depletion. **Biology of Reproduction**. v. 59 p. 431-436, 1998.

GIUS, D.; BORETO, A.; SHAH, S.; CURRY, H.A. Intracellular oxidation reduction status in the regulation of transcription factors NF-kB and AP-1. **Toxicology Letters**. v. 106 p. 93-101, 1999.

GJORRET, J.O.; KNIJIN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; HYTTEL, M. Cronology of apoptosis un bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v.69 p. 1193-1200, 2003.

GODLEY, B.F.; SHAMSI, F.A.; LIANG, F.Q.; JARRETT, S.G.; DAVIES, S.; BOULTON, M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280 p. 21061–21066, 2005.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUNOZ, M.; CAAMANO, J.N.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Development and quality of bovine morule cultured in serum-free médium with specific retinoid receptor agonists. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 20 p. 884-891, 2008.

HANDYSIDE, A.H.; HUNTER, S. Cell division in the mouse blastocyst before implantation. Roux's Arch. **Developmental Biology**. v. 195 p. 519-526, 1986.

HANSEN, P.J.; ARÉCHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Animal Science**. v. 77 p. 36-50. 1999.

HANSEN, P.J.; DROST, D.; RIVERA, R.M.; LOPES, F.F.; AL-KATANAMI, Y.M.; KRININGER, C.E.; CHASE, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**. v. 55 p. 91-103, 2001.

HARDY, K. Apoptosis in the human embryo. **Reviews of Reproduction**. v. 4 p. 125-134, 1999.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A.H. Metabolism and cell allocation during parthenogenetic mouse preimplantation development. **Molecular Reproduction and Development**. v. 43 p. 313-322, 1996.

HASEN, P.J. To be or not to be - Determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**. v. 68 p. 40-48, 2007.

HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Reviews Genetics**. v. 2 p. 280-291, 2001.

HERRERO, L.; MARTÍNEZ, M.; GARCIA-VELASCO, J. A. Current status of human oocyte and embryo cryopreservation. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. v. 23(4) p. 245-50, 2011.

ISOM, S.C.; LAI, L.; PRATHER, R.S.; RUCKER, E.B. Heat shock of porcine zygotes immediately after oocyte activation increases viability. **Molecular Reproduction and Development**. v. 76 p. 548-554, 2009.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. programmed cell death in animal development. **Cell**. v. 88 p. 347-354, 1997.

JU, J.C.; PARKS, J.E.; YANG, X. Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short term heat shock. **Molecular Reproduction and Development**. v. 53 p. 336-340, 1999.

KAIDI, S.; BERNARD, P.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 65 p. 1127-1134, 2001.

KANE, M.T. A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**. v. 79 p. 171-90, 2003.

KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 36 p. 307-314, 2005.

KARU, T.I. Low power laser therapy. 2003. Disponible en:

<http://www.isan.troitsk.ru/dls/publ/300.pdf>

KARU, T.I.; KALENDU, G.S.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V.V. Biostimulation of HeLa cells by low intensity visible light. **Il Nuovo Cimento D**. v. 1 p. 828-892, 1982.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. **Lasers in the Life Sciences**. v. 2 p. 53-74, 1988.

KARU, T.I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**. v. 56 p. 691-704, 1989.

KARU, T. I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near I-R radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 49 p. 1-17, 1999.

KARU, T. I. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. **Laser in Medicine and Dentistry**. v. 4159 p. 97, 2000

KARU, T. I.; KOLYAKOV, S.F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 23 p. 355-61, 2005b.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV, S. F.; AFANASYEVA, N. I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 1 p. 98-106, 2005.

KARU, T. I. Lasers in infertility treatment: irradiation of oocytes and spermatozoa. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 30 p. 239-41, 2012.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**. v. 26 p. 239 –257, 1972.

KING, L.S.; KOZONO, D.; AGRE, P. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 5 p. 687–698, 2004.

KOLIBIANAKIS, E. M.; VENETIS, C. A.; TARLATZIS, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: which one is better? **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. v. 21 p. 270–274, 2009.

KONIG, K.; TADIR, Y.; PATRIZIO, P.; BERNIS, M.W.; TROMBERG, B.J. Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa. **Human Reproduction**. v. 11 p. 2162 – 2164, 1996.

KORHONEN, K.; SJOVALL, S.; VIITANEN, J.; KETOJA, E.; MAKAREVICH, A.; PEIPPO, J. Viability of bovine embryos following exposure to the green filtered or wider bandwidth light during *in vitro* embryo production. **Human Reproduction**. v. 24 p. 308–314, 2009.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17 p. 371-378, 2005.

LEDDA, S.; High hydrostatic pressure treatment improves the quality of *in vitro*-produced ovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 22 p. 202, 2010.

LIN, L.; DU, Y.; LIU, Y.; KRAGH, P.M.; LI, J.; PURUP, S.; KUWAYAMA, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; BOLUND, L.; VAJTA, G. Elevated NaCl concentration improves cryotolerance and developmental competence of porcine oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 18 p. 360–366, 2009.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, AM.; KINGSTON, M. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**. v. 126 p. 337–346, 2003.

LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Adaptation to Sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied Environmental Microbiology**. v. 63 p. 1252-1255, 1997.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LEVINSHAL, T.; LAVIE, R.; BREITBART, H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 15 p. 337e41, 1992.

LUND, M.B.; BAIRD PARKER, T.C.; GOULD, G.W. The microbiological safety and Quality of Food. **Aspen Publication**, 2000.

MAZUR, P.; AND SCHENEIDER, U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. **Cell Biophysics**. v. 8 p. 259-285, 1986.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**. v. 65 p. 1551– 62, 2006.

MUNNE, S.; ESTOP, A. Superoxide anion increases after sperm storage and produces chromosome abnormalities. **Biology of Reproduction**. v. 44 p. 681- 687, 1991.

NAGATA, S. Fas Ligand-induced apoptosis. **Annual Review of Genetics**. v. 33 p. 29-55, 1999.

NASR-ESFAHANI, M. H.; AITKEN, J. R.; JOHNSON, M. H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocyte and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or *in vivo*. **Development**. v. 109 p. 501-7, 1990.

NEUBER, E.; LUETJENS, C. M.; CHAN, A. W. S.; SCHATTEN, G. P. Analysis for DNA fragmentation of *invitro* cultured bovine blastocysts using TUNEL. **Theriogenology**. v. 57 p. 2193-2202, 2002.

- NOVAK, J. S.; TUNICK, M. H.; JUNEJA, V. K. Heat treatment adaptations in *Clostridium Perfringen.c* vegetative cells. **Journal of Food Protection**. v. 64 p. 1527-1534, 2001.
- OBOOKATA, H.; SASAI, Y.; NIWA, H.; KADOTA, M.; ANDRABI, M.; TAKATA, N.; TOKORO, M.; TERASHITA, Y.; YONEMURA, S.; VACANTI, C. A.; WAKAYAMA, T. Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. **Nature**. v. 30 p. 676-80, 2014.
- OH, S.J.; GONG, S.P.; LEE, S.T.; LEE, E.J.; LIM, J.M. Light intensity and wavelength during embryo manipulation are important factors for maintaining viability of preimplantation embryos *in vitro*. **Fertility and Sterility**. v. 88 p. 1150 – 1157, 2007.
- PABON, W.E.; FINDLEY, W.E.; GIBBON, W.E. The toxic effect of short exposure to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. **Fertility and Sterility**. v. 51 p. 896-900, 1989.
- PASHAIASL, M.; KHODADADI, K.; RICHINGS, N. M.; HOLLAND, M. K.; VERMA, P. J. Cryopreservation and long-term maintenance of bovine embryo-derived cell lines. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 25 p. 707-18, 2013.
- PANDEY, P.; FARBER, R.; NAKAZAWA, A.; KUMAR, S.; BHARTI, A.; NALIN, C.; WEICHSELBAUM, R.; KUFE, D.; KHARBANDA, S. Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. **Oncogene**. v. 13 p. 1975-81, 2000.
- PARR, A. C. The candela and photometric and radiometric measurements. **Journal of Research of National Institute of Standart and Technology**. v. 106 p. 151 – 186, 2001.

PAUL, C.; MANERO, F.; GONIN, S.; KRETZ-REMY, C.; VIROT, S.; ARRIGO, A. P. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. **Molecular and Cell Biology**. v. 22 p. 816-34, 2002.

PAULA LOPES, F. F.; CHASE JR, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**. v. 125 p. 285-294, 2003.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**. v. 66 p. 1169–1177, 2002.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**. v. 41 p. 101–6, 1994.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gamete and embryo performance? **Reproduction, Fertility and Development**. v. 23 p. 48-55, 2011.

PRIBENSZKY, C.; MATYAS, S. Z.; LOSONCZI, E.; STANCA, C.; BOCK, I.; VAJTA, G. Stress for stress tolerance: improving cell survival by sublethal stress treatment of eggs before vitrification pilot study. **Fertility and Sterility**. v. 94 p. S32, 2010.

PRIBENSZKY, C.; MOLNÁR, M.; HORVÁTH, A.; HARNOS, A.; SZENCI, O. Hydrostatic pressure induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 18 p. 162-163, 2005b.

PRIBENSZKY, C.S.; SIQUEIRA, E.; MOLNAR, M.; RUMPF, R. Improved post-warming developmental competence of open pulled straw- vitrified *in vitro*-produced bovine blastocysts by sublethal hydrostatic pressure pre-treatment. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 20 p. 125, 2008a.

RIVERA, R.M.; DAHLGREN, G.M.; DE CASTRO, E.; PAULA, L.A.; KENNEDY, R.T.; HANSEN, P. J. Actions of thermal stress in two-cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. **Reproduction**. v. 128 p. 33–42, 2004.

RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**. v. 61 p. 234-48, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELOS DE, L. A.; FUENTE, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implication for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**. v. 68 p. 236–243, 2003.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J.; Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**. v. 129 p. 235-44, 2005.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J.; Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biology of Reproduction**. v. 71 p. 1898-1906, 2004.

SABATINI, L.; WILSON, C.; LOWER, A. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**. v. 72 p. 1027-1034, 1999.

SAIKUMAR, P.; DONG, Z.; MIKHAILOV, V.; DENTON, M.; WEINBERG, J. M.; VENKATACHALAM, M. A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. **American Journal of Medicine**. V. 107 p. 489-506, 1999.

SCHUMACHER, A.; FISCHER, B. Influence of visible light and room temperature on cell proliferation in preimplantation rabbit embryos. **Journals of Reproduction and Fertility**. v. 84 p. 197-204, 1988.

SHARMA, K.; WANG, R.X.; ZHANG, L.Y.; YIN, D.L.; LUO, X.Y.; SOLOMON, J.C.; JIANG, R.F.; MARKOS, K.; DAVIDSON, W.; SCOTT, D.W.; SHI, Y.F. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 88 p. 333-347, 2000.

Silva, RB. Efeitos da bioestimulação a laser nas taxas de maturação, fertilização e cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 172. Tese (Mestrado) - universidade estadual paulista “julio de mesquita filho”. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias - Campus de Jaboticabal – 05/2008. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

SOUZA, P. A.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, R.M. Transient expression of a translation initiation factor is conservatively associated with embryonic gene activation in murine and bovine embryos. **Biology of Reproduction**. v. 59 p. 969-977, 1998.

STORZ. G.; HENGGE-ARONIS R. Preface. p. xii-xiv. In G. Storz. and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, **Washington. DC**, 2000.

STROUD, B. (2012) IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO TODA, S.; MAGALHÃES, L. C.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, Fda. C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**. 15; 1211-20, 2011.

SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; ONO, M. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. **Human Reproduction**. v. 11 p. 2484-2487, 1996.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay, **Theriogenology**. v. 54 p. 137–145, 2000.

TAKAHASHI, M.; SAKA, N.; TAKAHASHI, H.; KANAI, Y.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. **Molecular Reproduction and Development**. v. 54 p. 1-7, 1999.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 118 p. 47-55, 2000.

TSENG, J.K.; TANG, P. C.; JU, J.C. *In vitro* thermal stress induces apoptosis and reduces development of porcine parthenotes. **Theriogenology**. v. 66 p. 1073-1082, 2006.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**. v. 60-61 p. 357-364, 2000.

VAJTA G, KUWAYAMA M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**. v. 7 p. 236-44, 2006.

VANBLERKOM, J.; DAVIS, P.W. Cytogenetic, cellular, and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. **Microscopy Research and Technique**. v. 27 p. 165-193, 1994.

VANDAELE, L.; THYS, M.; BIJTTEBIER, J.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; MAES, D.; MEYER, E.; VAN SOOM, A. Short-term exposure to

hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development.

Reproduction. v. 139 p. 505–511, 2010.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development.** v. 51 p. 53-8, 1998.

VINCK EM, CAGNIE BJ, CORNELISSEN MJ, DECLERCQ HA, CAMBIER DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science.** v. 18 p. 95-9, 2003.

VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLERCQ, H.A.; CAMBIER, D. C. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 23 p. 167-71, 2005.

VLADIMIR, D.; KRESLAVSKIA, IRINA R.; FOMINA, A.; DMITRY, A.; LOSC, R. C. KUZNETSOVC V. V., SULEYMAN, I. ALLAKHVERDIEVA. Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.** v. 13 p. 190– 203, 2012.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility.** v. 78 p. 1272-7, 2002.

WEMEKAMP-WOUTERS, K.H.J.A.; DE LEEUW P. P. L. A.; HAIN, T.; CHAKRABORTY T.; ABE E, T. Identification of sigma factor o-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure. and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 70 p. 3457-3466, 2004.

- WHELAN, H. T.; SMITS, R. L.; BUCHMAN, E. V.; WHELAN, N. T.; TUNER, S. G.; MARGOLIS, D. A. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**. v. 19 p. 305–314, 2001.
- WILLIAMS, R.J.; SHAW, S.K. The relationship between cell injury and osmotic volume reduction: II. Red cell lysis correlates with cell volume rather than intracellular salt concentration. **Cryobiology**. v. 17 p. 530-539, 1980.
- WONG-RILEY, M. T.; LIANG, H. L.; EELLS, J. T.; CHANCE, B.; HENRY, M. M.; BUCHMANN, E.; KANE, M.; WHELAN, H. T. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 11 p. 4761-71, 2005.
- WOUTERS, J. A.; ROMBOUTS, F.M.; KUIPERS, O. P.; DE VOS. W. M.; AHEE, I. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 23 p. 165- 173, 2000.
- YANG, J., LIU, X., BHALLA, K., KIM, C. N., IBRADO, A. M., CAI, J., PENG, T. I., JONES, D. P., WANG, X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**. v. 275 p. 1129–1132, 1997.
- YOUSEF. A. E.; COURTNEY. P. D. Basics of stress adaptation and implications in new generation foods, In Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press. **Boca Rutsin**. p. 1-30, 2003.
- ZHA, J., HARADA, H., YANG, E., JOCKEL, J., & KORSMEYER, S. J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). **Cell**. v. 87 p. 619–628, 1996.
- ZIMMERMANN KC, BONZON C, GREEN DR. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 92 p. 57-70, 2001.