



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

CAROLINE MANTOVANI DA LUZ

**Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* na pressão arterial e em
parâmetros metabólicos da prole adulta de murinos**

Ribeirão Preto

2022

CAROLINE MANTOVANI DA LUZ

Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* na pressão arterial e em parâmetros metabólicos da prole adulta de murinos

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia – Opção: Biologia da Reprodução

Orientadora: Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Da Luz, Caroline Mantovani

Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* na pressão arterial e em parâmetros metabólicos da prole adulta de murinos / Caroline Mantovani da Luz; orientadora, Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2022.

75 p.: 13il.; 30 cm

Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

1. Reprodução assistida; 2. Prole; 3. Hipertensão; 4. Hiperglicemia;
5. Ganho de peso.

Nome: DA LUZ, Caroline Mantovani

Título: Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* na pressão arterial e em parâmetros metabólicos da prole adulta de murinos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: 21/12/2022

Banca Examinadora

Profª. Dra.: Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Profª. Dra.: Ana Caroline Japur de Sá Rosa e Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Profª. Dra.: Michele Mazzaron de Castro

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr.: Licio Augusto Velloso

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Julgamento: Aprovada

Para meus pais, Izanete e Jorge.

Para meu marido, Fernando.

Vocês me incentivaram a alçar voos mais altos.

AGREDECIMENTOS

À Deus, por ser luz na minha trajetória.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro, pela amizade, por acreditar no meu potencial, por ter resiliência nos momentos difíceis e por ser exemplo.

À Thalita Souza Berteli que foi inspiração e que me iniciou no mundo da embriologia. Obrigada pela amizade, pela paciência e por partilhar essa trajetória de lutas, nas derrotas e nas conquistas.

À Marília Alves pela amizade, pelo auxílio nos experimentos e pelo apoio nos momentos difíceis, você me ensinou mais do que imagina.

À Nathalia Smargiassi pela amizade e pelo auxílio na manutenção dos animais.

À Prof^ª. Dra. Juliana Meola, pela amizade, pelos conselhos valiosos e pela oportunidade de crescimento acadêmico.

A todos os amigos da pós-graduação, vocês fizeram essa jornada ser mais leve e divertida.

À técnica Cristiana Padovan pelo acolhimento, pelos ensinamentos e pela alegria.

À secretária Suelen Soares, sua amizade foi uma grata surpresa, obrigada por estar sempre disponível.

À técnica Maria Aparecida Vasconcelos pelo carinho, boa vontade e auxílio nos experimentos.

As técnicas Lilian Mendes e a Paula Paião pelo apoio e pelo auxílio nos experimentos.

À estatística Suleimy Mazin, pela paciência em ensinar e pelo suporte estatístico.

As técnicas Alina Ozorio e Kelly Bernuzzi do Laboratório de Criopreservação e Modificação Genômica do Biotério Central da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto pelos ensinamentos, perseverança, paciência e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos necessários.

À professora Michele Mazzaron de Castro, a Marcela de Mello e aos colegas do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo por contribuírem com o enriquecimento desse trabalho.

Aos docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e as funcionárias do laboratório de Reprodução Humana que de alguma forma contribuíram com este projeto e com meu crescimento pessoal e acadêmico. Agradeço pelo carinho de todos.

À minha mãe, meu exemplo de professora e a meu pai meu exemplo de persistência. Obrigada por acreditarem nos meus sonhos. Essa conquista também é de vocês.

Ao meu irmão Pedro, pelo suporte nos momentos difíceis nos quais não pude estar presente.

Ao meu melhor amigo e esposo Fernando, que fez parte de toda essa trajetória. Obrigada pelo amor, apoio, auxílio e compreensão.

À Malte, minha companheira peluda que alegrou meus dias e foi aconchego nos momentos difíceis.

À minha família, por acreditarem em mim, por serem meu estímulo e meu refúgio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através do auxílio a projetos de pesquisa (Processo Nº 426486/2018-8).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia (PPGGO), Departamento de Ginecologia e Obstetrícia (DGO), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Hormônios e Saúde da Mulher, por fornecerem o suporte financeiro e estrutural.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

De modo especial, aos animais que doaram as suas vidas para que este estudo pudesse ser realizado.

A todos, muito obrigada.

“Confia no teu corre
e fica de boa.
Afia teu trampo
nas lâminas das incertezas,
todo mundo certo
não quer dizer
que você está errado.
Não ande com caranguejos
e sonhe com as mãos,
deixa o coração no presente
e os olhos no futuro.
Muitas vezes o sucesso fica no passado
e ser importante é para sempre.
Cuide da raiz e lapide as asas,
Porque abaixo do radar também se voa.”

(VAZ, 2021)

“Existem mistérios sobre os quais os homens
podem apenas formular hipóteses e que ao
longo das eras, serão solucionados apenas em
parte. Acredite estamos agora diante de um
desses mistérios.”

(STOKER, 1897)

RESUMO

DA LUZ, C. M. **Efeitos da estimulação ovariana e da fertilização *in vitro* na pressão arterial e em parâmetros metabólicos da prole adulta de murinos.** 2022. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introdução: A estimulação ovariana, a fertilização *in vitro* (FIV) e a vitrificação oocitária representam avanços significativos na medicina reprodutiva, permitindo que casais inférteis concebam. Em todo o mundo mais de oito milhões de bebês nasceram graças a tratamentos de reprodução assistida e este número tende a aumentar. Contudo, estudos indicam que a manipulação de gametas e embriões pode afetar o metabolismo da prole a longo prazo. Pesquisas sugerem que crianças concebidas após FIV possuem perfis metabólicos distintos, o que pode predispor-las a doenças na vida adulta. No entanto, a maioria dos estudos que avaliam o impacto das técnicas de reprodução assistida na prole envolve dados perinatais, neonatais e de curto prazo. Portanto, estudos de longo prazo que investiguem a saúde da prole concebida com o auxílio dessas técnicas permanecem necessários. **Objetivos:** Esse estudo teve por objetivo avaliar o impacto da estimulação ovariana isolada e associada FIV na prole adulta de camundongos. Avaliamos também a viabilidade da obtenção de prole murina por meio da combinação das técnicas de vitrificação oocitária, rompimento parcial da zona pelúcida (PZD) e FIV. **Material e métodos:** Este é um estudo experimental prospectivo que utilizou o modelo murino. Os desfechos na prole foram comparados entre três grupos: (1) grupo Natural (controle), prole concebida naturalmente, (2) grupo Estimulado, animais nascidos após estímulo ovariano e fertilização *in vivo* e (3) grupo FIV Fresco, prole oriunda de estimulação ovariana e FIV de oócitos frescos. Para obtenção da prole de oócitos vitrificados (grupo Vitrificado) utilizamos a seguinte combinação de técnicas de reprodução assistida: estimulação ovariana, vitrificação e aquecimento oocitários, PZD e FIV. A prole foi monitorada do desmame (4ª semana) até a eutanásia (21ª semana). Os parâmetros analisados foram o ganho de peso (semanal), os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides (16ª, 18ª e 21ª semanas), a pressão arterial sistólica por pletismografia (10ª, 15ª e 20ª semanas) e o peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio (pós eutanásia). **Resultados:** As taxas de fertilização e formação de blastocistos foram similares entre os grupos FIV Fresco e Vitrificado (76% vs. 81% e 60% vs. 50% respectivamente). No entanto, as taxas de gestação e nascidos vivos após a vitrificação foram menores do que as obtidas em oócitos frescos (27% vs. 75% e 7% vs. 31%

respectivamente). Por obtermos apenas 2 animais no grupo Vitricado este não foi incluído na análise estatística das variáveis avaliadas na prole. Os animais dos grupos Estimulado (7 fêmeas e 10 machos) e FIV Fresco (10 fêmeas e 8 machos) apresentaram alteração nos níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides, além do maior ganho de peso, quando comparados aos animais do grupo Natural (11 fêmeas e 10 machos). Os machos do grupo FIV Fresco apresentaram maiores valores de pressão arterial sistólica, um importante fator de risco para hipertensão arterial. Enquanto o grupo Estimulado possuiu maior peso de gordura abdominal e maior peso corporal do que os grupos Natural e FIV Fresco, um agravante que sugere alterações no metabolismo da gordura. **Conclusões:** Esse é o primeiro estudo com monitoramento longitudinal de variáveis metabólicas laboratoriais e clínicas na prole adulta de camundongos, machos e fêmeas, concebidos após estimulação ovariana isolada ou associada a FIV. Em conjunto, nossos achados sugerem que a prole oriunda de estímulo ovariano associado ou não a FIV possa apresentar fatores de risco para doenças cardiovasculares, o que precisa ser melhor investigado em pesquisas futuras. Esse estudo sugere que o estímulo ovariano e a FIV podem promover alterações embrionárias passíveis de favorecer alterações metabólicas na idade adulta. Nossos achados também sugerem que oócitos murinos se tornam muito frágeis após a vitrificação e o aquecimento, sendo mais sensíveis ao rompimento parcial da zona pelúcida, comprometendo o desenvolvimento e potencial de nidação embrionária.

Palavras-chave: Reprodução assistida. Prole. Hipertensão. Hiperglicemia. Ganho de peso.

ABSTRACT

DA LUZ, C. M. **Effects of ovarian stimulation and in vitro fertilization on blood pressure and metabolic parameters of adult murine offspring.** 2022. Thesis (Doctorate Degree in Sciences) – Graduated Program in Gynecology and Obstetrics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introduction: Ovarian stimulation, in vitro fertilization (IVF), and oocyte vitrification represent significant advances in reproductive medicine, allowing infertile couples to conceive. Around the world, more than eight million babies have been born thanks to assisted reproduction treatments. However, studies indicate that the manipulation of gametes and embryos can affect the metabolism of the offspring in the long term. Research suggests that children generated from IVF have distinct metabolic profiles, which may predispose them to diseases in adult life. However, most studies evaluating the impact of assisted reproduction treatments on offspring involve perinatal, neonatal, and short-term data. Therefore, long-term studies investigating the health of offspring from these techniques remain necessary.

Objectives: This study aimed to evaluate the impact of ovarian stimulation alone and associated with in vitro fertilization (IVF) on adult mice offspring. We also evaluated the viability of obtaining murine offspring by combining the techniques of oocyte vitrification, partial disruption of the zona pellucida (PZD), and IVF. **Material and methods:** This prospective experimental study used a murine model. Outcomes in offspring were compared between three groups: (1) Natural (control) group, naturally conceived offspring, (2) Stimulated group, animals born after ovarian stimulation and in vivo fertilization; and (3) Fresh IVF group, offspring from ovarian stimulation and IVF from fresh oocytes. To obtain the offspring of vitrified oocytes (Vitrified group), we used the combination of the following assisted reproduction techniques: ovarian stimulation, oocyte vitrification, warming, PZD, and IVF. The offspring were monitored from weaning (4th week) to euthanasia (21st week). The analyzed parameters were weight gain (weekly), serum levels of glucose, total cholesterol, and triglycerides (16th, 18th, and 21st weeks), systolic blood pressure by plethysmography (10th, 15th, and 20th weeks), and abdominal fat weight and gastrocnemius muscle weight (post euthanasia). To obtain the offspring of vitrified oocytes (Vitrified group), we used the combination of the following assisted reproduction techniques: ovarian stimulation, oocyte vitrification, warming, PZD, and IVF. **Results:** Fertilization and blastocyst formation rates were similar between Fresh IVF and Vitrified groups (76% vs. 81% and 60% vs. 50%,

respectively). However, after vitrification, pregnancy and live birth rates were lower than those obtained in fresh oocytes (27% vs. 75% and 7% vs. 31%, respectively). We obtained only two animals in the Vitrified group, which was not included in the statistical analysis of the variables evaluated in the offspring. The animals in the Stimulated (seven females and ten males) and Fresh IVF (10 females and eight males) groups showed changes in serum levels of glucose, total cholesterol, and triglycerides, in addition to more significant weight gain, when compared to animals in the Natural group (11 females and ten males). Males in the Fresh IVF group had higher systolic blood pressure values, a significant risk factor for hypertension. At the same time, the Stimulated group had higher abdominal fat and body weight than the Natural and Fresh IVF groups. This aggravating factor suggests changes in fat metabolism. **Conclusions:** This is the first study with longitudinal monitoring of laboratory and clinical variables in adult offspring of mice, male and female, conceived after ovarian stimulation alone or associated with IVF. Together, our findings suggest that offspring from ovarian stimulation associated or not with IVF may have risk factors for cardiovascular disease, which needs to be further investigated in future research. This study suggests that ovarian stimulation and IVF can promote embryonic changes likely to favor metabolic changes in adulthood. Our findings also suggest that murine oocytes become very fragile after vitrification and heating, being more sensitive to partial rupture of the zona pellucida, compromising the development and potential for embryonic implantation.

Keywords: Assisted reproduction. Offspring. Hypertension. Hyperglycemia. Weight gain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental dos grupos do estudo.....	25
Figura 2 - Fêmeas de camundongo sem e com tampão vaginal.....	26
Figura 3 - Esquema gráfico da metodologia de rompimento parcial da zona pelúcida do oócito.....	30
Figura 4 - Transferência embrionária.....	32
Figura 5 - Distância anogenital em macho e fêmea de camundongo.....	33
Figura 6 - Pletismografia de cauda em camundongos.....	35
Figura 7 - Progressão do ganho de peso dos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco do desmame até a eutanásia.....	44
Figura 8 - Progressão do ganho de peso dos animais do grupo Vitricado do desmame até a eutanásia.....	45
Figura 9 – Comparações do peso absoluto da gordura abdominal em fêmeas e machos entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.....	47
Figura 10 - Comparação da pressão arterial sistólica entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco na 10 ^a , 15 ^a e 20 ^a semanas de vida.....	49
Figura 11 - Comparação dos níveis de glicose entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	51
Figura 12 - Comparação dos níveis de glicose entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	52
Figura 13 - Comparação dos níveis de colesterol total entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	53
Figura 14 - Comparação dos níveis de colesterol total entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	54
Figura 15 - Comparação dos níveis de triglicérides entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados descritivos das replicatas do grupo FIV Fresco.....	41
Tabela 2 - Taxas das replicatas dos grupos FIV Fresco e Vitricado.....	41
Tabela 3 - Dados descritivos das replicatas do grupo Vitricado.....	42
Tabela 4 – Média de peso dos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco do desmame até a eutanásia.....	43
Tabela 5 - Peso dos machos do grupo Vitricado do desmame até a eutanásia.....	45
Tabela 6 - Peso absoluto da gordura abdominal e do músculo gastrocnémio nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.....	46
Tabela 7 - Peso absoluto da gordura abdominal e do músculo gastrocnémio dos animais do grupo Vitricado.....	47
Tabela 8 - Pressão arterial sistólica dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco, na 10 ^a , 15 ^a e 20 ^a semanas de vida.....	49
Tabela 9 - Pressão arterial sistólica dos animais do grupo Vitricado.....	50
Tabela 10 - Níveis de glicose nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	51
Tabela 11 - Níveis de colesterol total nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	53
Tabela 12 - Níveis de triglicérides nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21 ^a semana.....	55
Tabela 13 - Níveis de glicose, colesterol total e triglicérides nos animais do grupo Vitricado.....	56

LISTA DE SIGLAS

ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
CO ₂	Dióxido de carbono
COCs	Complexo cumulus oócitos
DP	Desvio padrão
E	Estimulado
EOC	Estimulação ovariana controlada
EUA	Estados Unidos da América
F	FIV Fresco
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HTF	<i>Human tubal fluid</i> ou fluido tubário humano
ICMART	Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias de Reprodução Assistida
ICSI	Inseminação intracitoplasmática de espermatozoides
N	Natural
N ₂	Nitrogênio
NA	Não se aplica
P	Página
PAS	Pressão arterial sistólica
PZD	<i>Partial zone dissection</i> ou rompimento parcial da zona pelúcida
SART	Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida dos Estados Unidos
TE	Transferência embrionária
USP	Universidade de São Paulo
V	Vitrificado
Vitri	Vitrificação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
dl	Decilitros
G	Gauss
g	Gramas
Hg	Mercúrio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N ₂	Nitrogênio
Nº	Número
° C	Grau Celsius
vs	Versus
x	Veze
μl	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivos primários.....	23
2.2	Objetivos secundários.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Considerações éticas.....	24
3.2	Delineamento experimental.....	24
3.3	Animais.....	24
3.4	Reprodução natural.....	25
3.5	Estimulação ovariana.....	26
3.6	Coleta dos embriões.....	27
3.7	Coleta dos oócitos.....	27
3.8	Denudação.....	28
3.9	Vitrificação e aquecimento dos oócitos.....	28
3.10	Determinação das taxas de sobrevivência oocitária após o aquecimento.....	29
3.11	Rompimento parcial da zona pelúcida.....	29
3.12	Fertilização <i>in vitro</i>	30
3.13	Transferência embrionária.....	31
3.14	Cultivo de blastocistos.....	32
3.15	Taxa de nascidos vivos.....	32
3.16	Distância anogenital e sexagem.....	33
3.17	Ganho de peso.....	33
3.18	Aferição da pressão arterial sistólica.....	34
3.19	Monitoramento dos níveis de glicose, colesterol total e triglicérides.....	35
3.20	Eutanásia da prole.....	35
3.21	Coleta de sangue e tecidos.....	35
3.22	Análise de glicose, colesterol total e triglicérides.....	36
3.23	Cálculo amostral.....	36
3.24	Análise estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Fluxograma do grupo Natural.....	38

4.2	Fluxograma do grupo Estimulado	38
4.3	Fluxograma do grupo FIV Fresco	38
4.4	Fluxograma do grupo Vitricado	39
4.5	Cultivo de blastocistos.....	40
4.6	Ganho de peso da prole	43
4.7	Peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio da prole.....	46
4.8	Pressão arterial sistólica da prole.....	48
4.9	Glicose, colesterol total e triglicérides da prole	50
4.9.1	Glicose	50
4.9.2	Colesterol total.....	52
4.9.3	Triglicérides.....	54
4.9.4	Glicose, colesterol total e triglicérides da prole do grupo Vitricado.....	56
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A	73
	ANEXO B.....	75

1 INTRODUÇÃO

O nascimento da primeira prole de fertilização *in vitro* (FIV), especificamente de coelhos, ocorreu na década de 30 nos Estados Unidos (PINCUS *et al.*, 1934). Apenas em 1968 a primeira prole de FIV em camundongos foi obtida (WHITTINGHAM, 1968). Nesse mesmo ano, com uma publicidade negativa sobre as tentativas de FIV em humanos, Robert Edwards, um biólogo reprodutivo de Cambridge, posteriormente ganhador do prêmio Nobel de medicina, intensificou os estudos em humanos, motivado a evitar as alterações cromossômicas na progênie (JOHNSON, 2019). Em julho de 1978 na Inglaterra nasceu Louise Brown, o primeiro “bebê de proveta”. Hoje com 44 anos e mãe de dois filhos concebidos naturalmente, Louise Brown foi uma bebê saudável (JOHNSON, 2019). Ela foi a primeira de mais de 8 milhões de crianças concebidas com o auxílio de técnicas de reprodução assistida (ADAMSON *et al.*, 2018). De acordo com o Comitê Internacional de Monitoramento de Tecnologias de Reprodução Assistida (ICMART) mais de 2,5 milhões de ciclos de reprodução são realizados por ano, resultando em mais de 500.000 partos anuais (FAUSER, 2019). De 1997 até 2017 foram registrados na Europa 2.059.975 bebês nascidos com a utilização de técnicas de reprodução assistida. Atualmente, estima-se que 2 a 6% dos nascimentos na Europa sejam derivados de algum tipo de tratamento de reprodução assistida (DE GEYTER *et al.*, 2018; WYNS *et al.*, 2021). Segundo a Sociedade para Tecnologias de Reprodução Assistida dos Estados Unidos (SART), 74.590 bebês nasceram em 2018 oriundos de fertilização *in vitro*. No ano seguinte mais 77.256 bebês nasceram com o auxílio de alguma técnica de reprodução assistida, evidenciando a crescente utilização dessas tecnologias (ASRM, 2018).

As principais técnicas de reprodução assistida utilizadas são a fecundação *in vitro* e a criopreservação de gametas e embriões. A fecundação do óvulo em um ambiente laboratorial ou “*in vitro*” pode ser realizada pela técnica de FIV clássica ou pela injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (DE GEYTER *et al.*, 2018; RIENZI *et al.*, 2017).

Nos tratamentos de reprodução assistida uma etapa anterior a FIV é fundamental, a estimulação ovariana controlada. O estímulo hormonal consiste na administração de hormônios para estimular o crescimento e amadurecimento dos folículos ovarianos. O programa de estimulação hormonal deve ser individualizado de acordo com as necessidades de cada paciente (ASRM, 2018).

A criopreservação, por sua vez, é um procedimento no qual células ou tecidos podem ser mantidos durante longos períodos de tempo a temperaturas extremamente baixas, como forma de reduzir drasticamente os processos metabólicos e preservar as estruturas (MANDAWALA *et al.*, 2016). Nas últimas décadas, a vitrificação tem sido a metodologia de criopreservação mais utilizada devido a diminuição de danos às células e as maiores taxas de sobrevivência após o aquecimento, comparada a técnicas anteriores (BRAMBILLASCA *et al.*, 2013; OKTAY *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2010). Apenas em 2013, 14 anos após o primeiro nascimento utilizando a vitrificação oocitária, a técnica teve sua utilização clínica recomendada (ASRM, 2013).

As indicações para a criopreservação oocitária incluem mulheres submetidas a tratamentos gonadotóxicos na tentativa de preservar a fertilidade, o risco de desenvolver síndrome de hiperestimulação ovariana, doação oocitária, desejo de limitar o número de oócitos inseminados no momento da FIV a fresco, a inviabilidade não planejada de espermatozoides no momento da FIV e adiar a maternidade em mulheres saudáveis, também conhecida como criopreservação social (ASRM, 2018; ASRM, 2013). Além disso, alguns países possuem leis específicas que proíbem a criopreservação de embriões ou restringem o número de embriões gerados em ciclos de FIV, favorecendo assim a criopreservação de oócitos com uma alternativa (RIENZI *et al.*, 2017). Para casais homoafetivos masculinos que desejam engravidar a doação oocitária ou o banco de oócitos (geralmente oócitos criopreservados), assim como a doadora temporária do útero, são imprescindíveis (HUNTINGTON PRÓ-CRIAR EUGEN GROUP, 2022).

Apesar da vitrificação ter permitido a alguns grupos de pacientes obter resultados clínicos equivalentes aos obtidos com oócitos frescos (RIENZI *et al.*, 2017), a possibilidade do dano oocitário causado pela criopreservação, por meio do estresse químico, mecânico e térmico ainda é uma preocupação (COBO *et al.*, 2017; GLUJOVSKY *et al.*, 2014). O método de vitrificação requer o uso de altas concentrações de crioprotetores, baixos volumes de meio, e congelamento e aquecimento ultra rápidos. Durante o processo, a célula desidrata de forma osmótica em contato com os crioprotetores, e o conteúdo de água intracelular é trocado por crioprotetores permeáveis, resultando no estado vítreo, sem a presença de cristais de gelo intracelulares. No processo de aquecimento, as células reidratam enquanto os crioprotetores intracelulares são diluídos (COBO *et al.*, 2017).

Em 2017 na Europa foram relatados 831 nascimentos de bebês oriundos de oócitos criopreservados, e esses números tendem a aumentar (DE GEYTER *et al.*, 2018; WYNS

et al., 2021). No entanto, conforme o número de bebês nascidos de oócitos vitrificados aumenta, também aumenta a discussão sobre a segurança do método.

O momento no qual o oócito é submetido às técnicas de reprodução assistida coincide com a fase de síntese e preservação dos transcritos necessários para atender a demanda proteica durante a conclusão meiótica, fertilização e transição oócito-embrião, além de ser o período de reprogramação do epigenoma oocitário (CHRISTOU-KENT *et al.*, 2020). Interferências nessas etapas pode influenciar eventos futuros, como a saúde na vida adulta. O estágio uterino, as etapas de concepção e a vida pós-natal são períodos que conferem plasticidade ao desenvolvimento sendo muito sensíveis as alterações (RINAUDO *et al.*, 2012).

Em humanos dados neonatais, e a curto prazo mostram que a maioria dos descendentes concebidos após reprodução assistida são geralmente saudáveis. Uma revisão sistemática realizada pelo nosso grupo, analisou 13 estudos publicados entre 2007 e 2021 com o objetivo de verificar o impacto da vitrificação oocitária na prole. Estes estudos relataram um total de 4.159 bebês nascidos de oócitos vitrificados. A maioria dos estudos descreviam apenas dados gestacionais, peso ao nascer, anomalias congênitas e a saúde do bebê de forma superficial. Avaliando estes achados a vitrificação parece ser uma metodologia segura para criopreservação oocitária e para saúde infantil, pelo menos a curto prazo. No entanto, a maioria dos estudos não levou em consideração as implicações da vitrificação a longo prazo (DA LUZ *et al.*, 2022).

Por outro lado, a literatura recente sugere que os indivíduos nascidos de técnicas de reprodução assistida podem manifestar as alterações metabólicas apenas na idade adulta (NARAPAREDDY *et al.*, 2021). Existe um risco de confiança equivocada na segurança das técnicas de reprodução assistida, bem como incógnitas científicas sobre os mecanismos biológicos de dano oocitário e embrionário, além da saúde da prole a longo prazo ou transgeracional (BARBERET *et al.*, 2020; OKTAY *et al.*, 2006). Pesquisas indicam que a manipulação de gametas e embriões possa afetar o metabolismo da prole a longo prazo (FEUER *et al.*, 2014).

Estudos mostram que crianças geradas a partir de FIV tem perfis metabólicos distintos, que podem predispor a doenças na vida adulta. Estudos demonstraram que crianças e adolescentes nascidos após estimulação ovariana e FIV apresentam alterações na pressão arterial (CEELEN *et al.*, 2008), na concentração de glicose e na distribuição de gordura corporal (CEELEN *et al.*, 2007), quando comparados aos controles. Além disso, foram relatadas mudanças na circulação sistêmica, na estrutura arterial e função

vascular pulmonar, indicativos de disfunção vascular generalizada (SCHERRER *et al.*, 2012).

Apesar de desempenhar um papel central nos tratamentos de reprodução, estudos sugerem que a estimulação ovariana controlada também pode ter efeitos deletérios sobre o oócito, o embrião e a prole (KLIP *et al.*, 2001). A exposição do oócito a concentrações supra fisiológicas de gonadotrofinas pode perturbar a maturação do oócito e a conclusão da meiose, levando a aneuploidias cromossômicas (HODGES *et al.*, 2002). Além disso, existe uma preocupação sobre o aumento no risco de desenvolvimento de câncer em crianças e adultos jovens concebidos após o estímulo ovariano, contudo essa associação não está bem definida (SANTOS *et al.*, 2010).

Em crianças concebidas com o auxílio de reprodução assistida observou-se um aumento de doenças raras relacionadas ao *imprinting* genômico, como a síndrome de Beckwith-Widemann (VERMEIDEN *et al.*, 2013). O interessante é que todas as crianças oriundas de técnicas de reprodução assistida com síndrome de Beckwith-Widemann possuem as alterações de metilação no alelo materno do cromossomo 11 (FAUQUE *et al.*, 2008). Em camundongos, verificou-se que o cultivo embrionário levou ao aumento da pressão arterial e da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo e ao sistema cardiovascular, quando estes alcançaram a vida adulta (WATKINS *et al.*, 2007). Em embriões oriundos de FIV, foi observado que as condições de fertilização e desenvolvimento pré-implantação parecem interferir no metabolismo da glicose na vida adulta (FEUER *et al.*, 2013). A vitrificação oocitária, por sua vez, parece influenciar na função e na distribuição das mitocôndrias (LEI *et al.*, 2014).

A utilização de modelos animais em estudos científicos é muito importante. Pesquisas utilizando animais permitem testar hipóteses, superando as principais limitações e variações entre amostras presente em pesquisas com humanos (ROSENTHAL *et al.*, 2007; WATKINS *et al.*, 2007). O modelo murino é bastante oportuno e largamente utilizado para estudos experimentais. O curto período de reprodução dos camundongos os tornam ideais para estudos que investiguem, por exemplo, os efeitos de diferentes dietas durante a gravidez na pressão arterial (WATKINS *et al.*, 2007). Manter grandes grupos de roedores é consideravelmente mais econômico do que outros modelos animais. Sua rápida reprodução e tempo de vida curto os torna preferíveis para estudos de doenças transgeracionais (MAHSOUDI *et al.*, 2007) e adequados para o monitoramento longitudinal de parâmetros como o ganho de peso ao longo da vida (DONJACOUR *et al.*, 2014; WATKINS *et al.*, 2007). Além disso, devido

a semelhança dos genomas humano e murino, cerca de 96% de semelhança, esses animais são bons modelos para estudos translacionais e pré-clínicos de regulação e controle do desenvolvimento embrionário em nível molecular (BAUMANN *et al.*, 2007). Por fim, a dificuldade da obtenção de dados clínicos e o longo período necessário para o acompanhamento de coortes estimula o uso de camundongos em estudos translacionais de reprodução assistida (MANDAWALA *et al.*, 2016).

Milhões de bebês foram concebidos com o auxílio das técnicas de reprodução assistida e milhões ainda irão nascer em todo o mundo. A FIV e a vitrificação de oócitos representam grandes avanços na medicina reprodutiva, permitindo a casais inférteis terem filhos. Contudo, a maioria dos estudos que avaliam o impacto dessas técnicas na prole envolve dados perinatais, neonatais e de curto prazo (COBO *et al.*, 2017; DE GEYTER *et al.*, 2018; GLUJOVSKY *et al.*, 2014; WYNS *et al.*, 2021). Portanto, estudos a longo-prazo que investiguem a saúde da prole proveniente de estímulo ovariano, FIV e vitrificação oocitária permanecem necessários. Com este estudo poderemos compreender melhor o impacto das técnicas de reprodução assistida na saúde da prole adulta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

I - Analisar possíveis distúrbios metabólicos na prole adulta de murinos oriunda de estimulação ovariana isolada ou associada a FIV clássica por meio do acompanhamento de peso, das concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicérides, do peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio e da pressão arterial sistólica até a 21^a semana.

II - Verificar a viabilidade da obtenção de prole murina por meio da combinação das técnicas de vitrificação oocitária, rompimento parcial da zona pelúcida e fertilização *in vitro* clássica.

2.2 Objetivos secundários

I - Avaliar a taxa de sobrevivência de oócitos murinos vitrificados e aquecidos.

II - Comparar as taxas de fertilização e formação de blastocistos entre oócitos frescos e vitrificados.

III - Caso a obtenção da prole oriunda de oócitos murinos vitrificados seja viável, comparar a taxa de nascidos vivos entre oócitos frescos e vitrificados e avaliar a prole adulta por meio do acompanhamento de peso, das concentrações séricas de glicose, colesterol total e triglicérides, do peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio e da pressão arterial sistólica até a 21^a semana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) sob o protocolo número 595 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP, USP sob o número 107/2017 (**Anexo A**).

3.2 Delineamento experimental

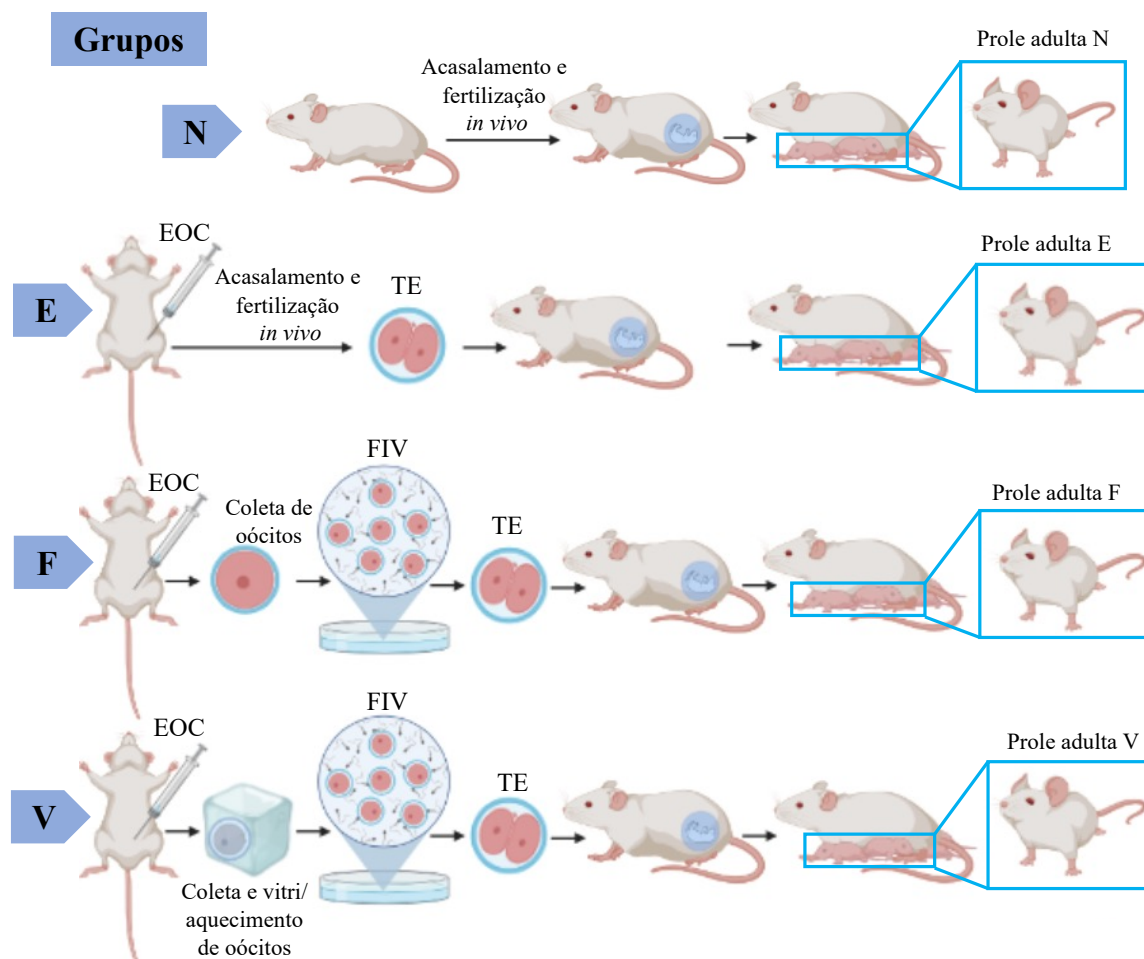
Este é um estudo experimental prospectivo que utilizou o modelo murino. Para investigar os efeitos da estimulação ovariana controlada, da FIV e da vitrificação/aquecimento oocitário sob o peso, glicose, colesterol, triglicérides e pressão arterial sistólica na prole adulta de murinos esse estudo conta com 4 grupos. 1º. Grupo Natural: com o objetivo de eliminar o efeito da estimulação ovariana controlada, da FIV e da vitrificação nos desfechos propostos, a prole deste grupo foi obtida por fertilização *in vivo* e progenitoras em ciclos naturais. Este foi considerado nosso grupo controle. 2º. Grupo Estimulado: a prole desse grupo foi obtida com estimulação ovariana controlada e fertilização *in vivo* com posterior transferência embrionária nas fêmeas receptoras. 3º. Grupo FIV Fresco: prole oriunda de estimulação ovariana controlada, fertilização *in vitro* utilizando oócitos frescos e transferência embrionária. 4º. Grupo Vitrificado: prole oriunda de fertilização *in vitro* utilizando oócitos vitrificados e aquecidos coletados após estimulação ovariana controlada com posterior transferência embrionária (**Figura 1**).

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *SWISS*, provenientes do Biotério Geral da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. As fêmeas, reprodutoras (fêmeas que deram à luz a prole do grupo Natural), doadoras (fêmeas que doaram os óvulos dos grupos FIV Fresco e Vitrificado e os embriões no grupo Estimulado) e receptoras (fêmeas que receberam a transferência embrionária nos grupos Estimulado, FIV Fresco e Vitrificado) possuíam de 8 a 12 semanas de vida e os machos reprodutores tiveram sua fertilidade comprovada por proles anteriores ao estudo. As proles de todos os

grupos do estudo foram acompanhadas desde o nascimento até a 21ª semana de vida. Os animais foram mantidos em biotério convencional em estante ventilada, sendo que cada mini isolador possuía o máximo de 5 animais, separados por sexo e idade. O ciclo de claro-escuro foi de 12/12 horas com temperatura controlada, água e ração *ad libitum*.

Figura 1 - Delineamento experimental dos grupos do estudo.



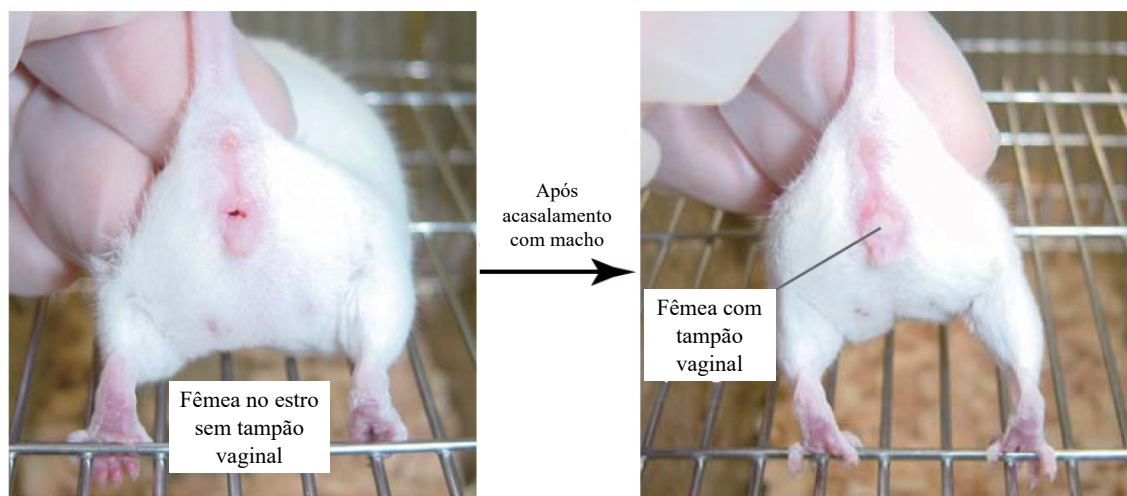
Nota: N= Natural. E= Estimulado. F= FIV Fresco. V= Vitrificado. EOC= Estimulação Ovariana Controlada. FIV= Fertilização *in vitro*. TE= Transferência embrionária. Vitri= Vitrificação.
 Fonte: Criado com BioRender.

3.4 Reprodução natural

Com o intuito de eliminar o potencial efeito da estimulação ovariana e do cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento e metabolismo da prole oriunda de FIV, incluímos no estudo o grupo Natural com reprodução natural, isto é, fêmeas com ciclo natural e fertilização *in vivo* (acasalamento).

Para a obtenção da prole oriunda de reprodução natural (grupo Natural), acompanhamos o ciclo estral das fêmeas reprodutoras. Quando a fêmea atingiu o estro foi transferida para o mini isolador do macho reprodutor onde passou o período de uma noite. Na manhã seguinte foi verificada a presença de *plug* ou tampão vaginal (**Figura 2**), para confirmação do acasalamento. A fêmea foi separada do macho e pesada semanalmente para acompanhamento da gravidez (aproximadamente 21 dias).

Figura 2 - Fêmeas de camundongo sem e com tampão vaginal.



Fonte: Adaptado de Nakagata (2015, p. 62).

3.5 Estimulação ovariana

As fêmeas doadoras dos grupos Estimulado, FIV Fresco e Vitricificado foram submetidas à estimulação ovariana por injeção intraperitoneal de 5 UI de gonadotrofina coriônica equina (ECG - Hormônio Novormon; Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) seguida de 5 UI de gonadotrofina coriônica humana (HCG - Hormônio Chorulon; Syntex SA, Buenos Aires, Argentina) administrada 48 horas após a administração do ECG.

Logo após a administração do HCG as fêmeas doadoras do grupo Estimulado foram transferidas para os mini isoladores dos machos reprodutores onde passaram a noite. Na manhã seguinte foi verificada a presença de tampão vaginal, para confirmação do acasalamento. Aproximadamente 40 horas após a administração do HCG foram realizadas as eutanásias das fêmeas doadoras do grupo Estimulado para coleta dos embriões em estágio de 2 células.

Entre 14 e 16 horas após a administração do HCG as fêmeas doadoras dos grupos

FIV Fresco e Vitrificado foram submetidas a eutanásia, por deslocamento cervical para coleta de oócitos.

3.6 Coleta dos embriões

Imediatamente após a confirmação do óbito das fêmeas doadoras de embriões do grupo E, os ovidutos foram coletados. Esses foram imersos em 100 µl de meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) em placa de Petri de 60 mm, previamente aquecido a 37° C e 5% CO₂. Sob estereomicroscópio aquecido, com o auxílio de seringa de 1 mL acoplada a agulha de bisel 26G com a ponta reta, foi realizada a lavagem do oviduto. Para a lavagem ou *flushing* a agulha foi inserida no infundíbulo (abertura no oviduto que entra em contato com o ovário) e o meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi expelido até que todo o conteúdo do oviduto fosse esvaziado (NAKAGATA, 2015). Os embriões em estágio de 2 células foram então coletados desse lavado e transferidos para placas de poço central (Ingamed, Maringá, Brasil) contendo 1 mL de meio de cultivo embrionário KSOM (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japão) previamente estabilizado e coberto com 1 ml de óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Os embriões 2 células foram mantidos em incubadora a 37° C e 5% CO₂ até o momento da transferência embrionária (conforme descrito no item 3.13).

3.7 Coleta dos oócitos

Após a confirmação do óbito das fêmeas doadoras dos grupos FIV Fresco e Vitrificado, os ovários e tubas uterinas foram dissecados e imediatamente imersos em 200 µl de meio caseiro HTF (*Human Tubal Fluid*) em placa de Petri de 35 mm, previamente aquecido a 37° C e 5% CO₂. Sob estereomicroscópio aquecido, com o auxílio de seringa de 1 mL acoplada a agulha de bisel 26G afilada, a ampola, contendo os complexos oócitos cumulus (COCs), foi rompida. Imediatamente após a coleta os COCs de todas as fêmeas foram transferidos para uma única placa de poço central (Ingamed, Maringá, Brasil) contendo 1 mL de meio HTF e coberta com óleo mineral. Esta placa foi armazenada na incubadora, a 5% CO₂ e 37° C, até o momento da denudação. Com o objetivo de eliminar possíveis interferências relativas as fêmeas doadoras e a qualidade oocitária, os oócitos utilizados nos grupos FIV Fresco e Vitrificado em cada replicata foram obtidos do mesmo grupo de fêmeas e distribuídos randomicamente.

3.8 Denudação

Sob estereomicroscópio aquecido, todos os oócitos dos grupos FIV Fresco e Vitricificado tiveram suas células do cumulus removidas por denudação química utilizando a enzima hialuronidase (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Os oócitos foram colocados em uma gota de 200 μ l, sendo 100 μ l de hialuronidase (Irvine Scientific, Califórnia, EUA) e 100 μ l de meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha), durante 30 segundos. Seguida de denudação mecânica, em meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando ponteiras *strippers* de diferentes calibres, 170 μ m e 130 μ m (Cook Medical, EUA). Os oócitos do grupo FIV Fresco foram destinados ao rompimento parcial da zona pelúcida e os oócitos do grupo Vitricificado foram vitrificados.

3.9 Vitricificação e aquecimento dos oócitos

Após a denudação os oócitos do grupo Vitricificado foram vitrificados de acordo com o protocolo do *Vitricification Kit* (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Brevemente, os oócitos foram mantidos por 1 minuto em meio HTF, em seguida, foram unidos na primeira gota de 20 μ l da solução de equilíbrio e mantidos por 2 minutos, então foram unidos em uma segunda gota de 20 μ l de solução de equilíbrio e mantidos por 2 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidos para a terceira gota de 20 μ l de solução de equilíbrio e mantidos por 3 minutos, totalizando 7 minutos de exposição a solução de equilíbrio. Após o equilíbrio, os oócitos foram transferidos para uma gota de 50 μ l de solução de vitricificação e mantidos por 1 minuto em temperatura ambiente. Por fim, 6 oócitos foram depositados em cada palheta Cryo-Ingá (Ingamed, Maringá, Brasil) e imersas em nitrogênio líquido (N_2). As palhetas contendo os oócitos foram mantidas em N_2 até o aquecimento dos oócitos (tempo mínimo de 1 e máximo de 4 semanas).

Para o procedimento de aquecimento foi utilizado o *Thaw Kit* (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Resumidamente, as palhetas foram imersas em solução de aquecimento, a 37° C, durante 1 minuto. Em seguida, os oócitos foram transferidos para uma gota de 50 μ l de solução de diluição por 4 minutos e posteriormente para duas gotas de 25 μ l de solução de lavagem em temperatura ambiente por 6 minutos. Imediatamente após o aquecimento, os oócitos foram mantidos na incubadora, no máximo, 6 por gota de 50 μ l de KSOM (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japão) em placas de 35 x 15 mm (Ingamed, Maringá, Brasil) cobertas com óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA), em 5%

CO₂ e 37° C para estabilização dos fusos meióticos.

3.10 Determinação das taxas de sobrevivência oocitária após o aquecimento

As taxas de sobrevivência foram determinadas com base na característica da zona pelúcida, retração e coloração do citoplasma do oócito após o aquecimento. Oócitos com citoplasma escuro e retraído e com rompimento da zona pelúcida foram considerados degenerados.

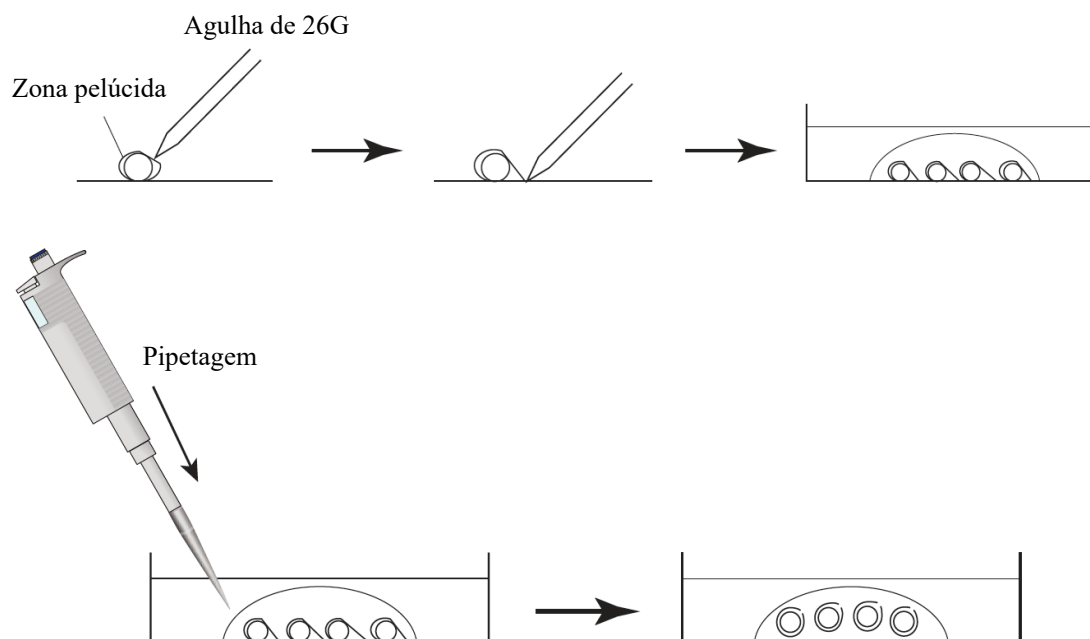
3.11 Rompimento parcial da zona pelúcida

Os oócitos dos grupos FIV Fresco e Vitricado foram submetidos a técnica de dissecação parcial da zona pelúcida também conhecida como PZD (*Partial Zone Dissection*). Essa técnica é necessária para facilitar a penetração do espermatozoide no oócito, uma vez que ocorre o enrijecimento da zona pelúcida após o processo de vitrificação/aquecimento. Os oócitos do grupo FIV Fresco também foram submetidos ao PZD com o intuito de eliminar o potencial impacto dessa técnica nos desfechos analisados, restando como única diferença entre os grupos FIV Fresco e Vitricado os processos de vitrificação e aquecimento oocitário.

A técnica de PZD foi realizada sob estereomicroscópio aquecido à 37° C, de acordo com a metodologia descrita por Nakagata em 2015 com adaptações (NAKAGATA, 2015). Brevemente, os oócitos foram distribuídos em gotas de 50 µl de meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha), cobertas com óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA) em placas petri de 35 x 15 mm, todos os itens aquecidos a 37° C. Utilizamos uma agulha de 26G dobrada a um ângulo de aproximadamente 30° e acoplada a uma seringa de 1 mL. A agulha foi posicionada de lado com o bisel apontado para cima. A ponta da agulha foi encostada na zona pelúcida do oócito e afundada até riscar a placa de petri. Todos os oócitos devem ficar presos no fundo da placa e não desgrudar mesmo após a agitação proposital da placa. Caso os oócitos soltem do fundo da placa após a agitação, a técnica de PZD deve ser repetida até a certeza do rompimento da zona. Os oócitos foram então desgrudados do fundo da placa utilizando *strippers* (**Figura 3**).

Após o PZD os oócitos dos grupos FIV Fresco e Vitricado foram transferidos para a placa de FIV para posterior inseminação.

Figura 3 - Esquema gráfico da metodologia de rompimento parcial da zona pelúcida do oócito.



Fonte: Adaptado de Nakagata (2015, p. 36).

3.12 Fertilização *in vitro*

Para capacitação dos espermatozoides, o conteúdo da cauda dos epidídimos de cada macho reprodutor foi pré-incubado a 37° C e 5% CO₂ durante 1 a 2 horas em 2 gotas de meio HTF (100 µl) coberto com óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Os oócitos frescos do grupo FIV Fresco e os oócitos vitrificados/aquecidos do grupo Vitrificado foram destinados a FIV. Para a FIV utilizou-se uma gota, 200 µl, do meio CARD MEDIUM (meio HTF + glutationa) em uma placa de 35 x 15 mm (Ingamed, Maringá, Brasil) coberta com óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). A placa permaneceu na incubadora estabilizando por, no mínimo, 10 minutos antes do uso. O meio HTF para preparo do CARD MEDIUM e o óleo mineral permaneceram na incubadora desde o dia anterior, possibilitando o menor tempo de estabilização após o preparo do meio para a FIV. Para a fertilização foram alocados aproximadamente 20 oócitos por placa, onde posteriormente foram acrescidos 20 µl da suspensão contendo os espermatozoides capacitados.

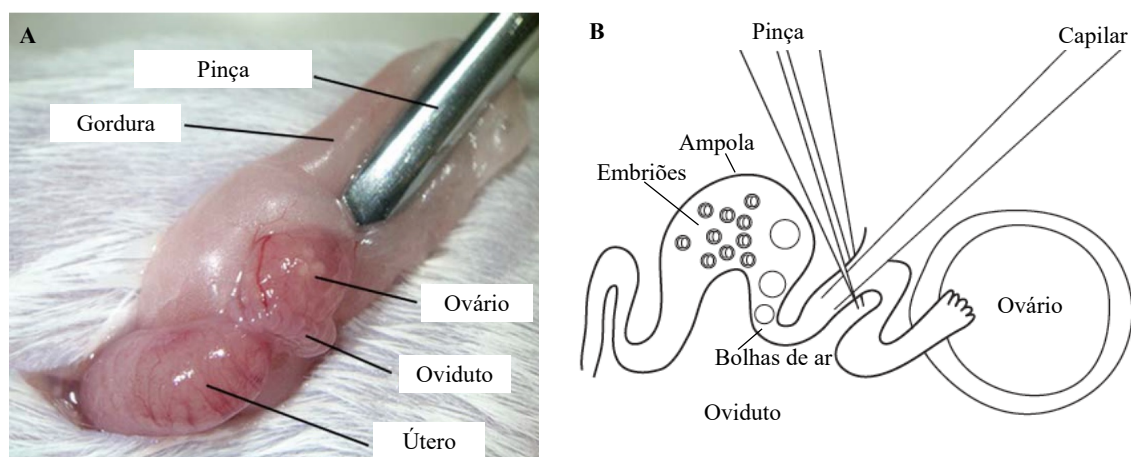
Depois de 3 horas da adição da suspensão de espermatozoides, os oócitos foram

lavados em meio HTF para retirada dos espermatozoides sobressalentes. Para esta etapa foram utilizadas placas de 60 x 15 mm (Ingamed, Maringá, Brasil), com 12 gotas de 50 µl de HTF cobertas com óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Após a lavagem, os oócitos foram transferidos para placas de poço central (Ingamed, Maringá, Brasil) contendo 1 mL de meio de cultivo embrionário KSOM (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japão) previamente estabilizado e coberto com 1 ml de óleo mineral (Irvine Scientific, Califórnia, EUA). Aproximadamente 18 horas após a lavagem, a taxa de fertilização foi calculada dividindo-se o número de embriões clivados em estágio de duas células ou mais pelo número total de oócitos inseminados multiplicado por 100. Os embriões em estágio de duas células foram destinados a transferência embrionária.

3.13 Transferência embrionária

As fêmeas receptoras permaneceram em um mini isolador com um macho vasectomizado. Assim, quando a fêmea atingisse o estro, o acasalamento poderia acontecer sem que ela engravidasse. Essa estratégia é adotada pois, desta forma, a identificação da fase do ciclo estral é mais eficaz, além de as chances de o endométrio estar receptivo serem maiores, uma vez que a fêmea ovulou e acasalou.

Para a transferência embrionária foram escolhidas apenas fêmeas receptoras com tampão vaginal e presença de ampola no dia da transferência. Os embriões foram colocados em gota de 500 µl de meio M2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) em uma placa de 60 mm. Todo o material cirúrgico e o mini isolador utilizados foram esterilizados. A fêmea receptora foi anestesiada com ketamina (90-150 mg/Kg) e xilazina (7,5-16 mg/Kg) com posterior realização da desinfecção da região dorsolateral com álcool 70%, e tricotomia. No fluxo laminar, a fêmea foi posicionada em decúbito ventral. Foi realizada uma pequena incisão na pele e no peritônio a fim de localizar a gordura ovariana, a qual foi pinçada e tracionada para fora da cavidade abdominal. O capilar foi carregado com os embriões, três bolhas de ar e, em seguida, efetuada a transferência na ampola do oviduto (**Figura 4**) (NAKAGATA, 2015). Foram transferidos 20 a 22 embriões/fêmea nos grupos Estimulado e FIV Fresco e 20 a 30 embriões/fêmea no grupo Vitricado.

Figura 4 - Transferência embrionária.

Nota: A imagem A mostra o corte e a exposição dos órgãos para a posterior transferência embrionária. O esquema B mostra o corte realizado no oviduto para inserção do capilar e a deposição dos embriões e das bolhas de ar na ampola. Fonte: Adaptado de Nakagata (2015, p. 64).

3.14 Cultivo de blastocistos

Alguns embriões em estágio de duas células não puderam ser transferidos por falta de fêmeas receptoras com tampão vaginal ou ampola. Quando possível, mantivemos uma amostra desses embriões em cultivo até atingirem o estágio de blastocisto, para verificar a taxa de formação de blastocistos. O cultivo foi realizado em meio KSOM (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japão) a 37° C e 5% CO₂ por 96 horas após a inseminação oocitária. A taxa de formação de blastocistos foi calculada levando-se em consideração o número total de blastocistos formados divididos pelo número de embriões em duas células mantidos em cultivo, multiplicados por 100.

3.15 Taxa de nascidos vivos

Após 19 a 21 dias de gestação foi avaliada a taxa de nascidos vivos dos grupos Estimulado, FIV Fresco e Vitricado. A taxa foi calculada levando-se em consideração o número de filhotes nascidos vivos dividido pelo número de embriões transferidos e multiplicado por 100. Em todos os grupos os filhotes foram mantidos com a mãe até o desmame (4ª semana de vida).

3.16 Distância anogenital e sexagem

A partir deste item iremos descrever as metodologias e análises realizadas na prole de todos os grupos experimentais.

No dia do desmame realizamos a medição da distância anogenital na prole. Os animais foram contidos e com o uso de um paquímetro digital medimos em cm a distância entre o órgão reprodutor (pênis nos machos e abertura vaginal nas fêmeas) e o ânus. A distância anogenital em machos costuma ser maior, chegando ao dobro do tamanho da apresentada em fêmeas (**Figura 5**). Com base nessa medição e na visualização da bolsa escrotal fizemos a sexagem dos filhotes e separamos machos de fêmeas (SANTOS, 2002).

Figura 5 - Distância anogenital em macho e fêmea de camundongo.



Nota: A= Exemplo de filhote fêmea de camundongo da linhagem C57Bl/6J com paquímetro digital aferindo a distância anogenital. B= Aferição da distância anogenital em fêmea. C= Aferição da distância anogenital em macho, também pode ser visualizada a bolsa escrotal. Fonte: Acervo pessoal.

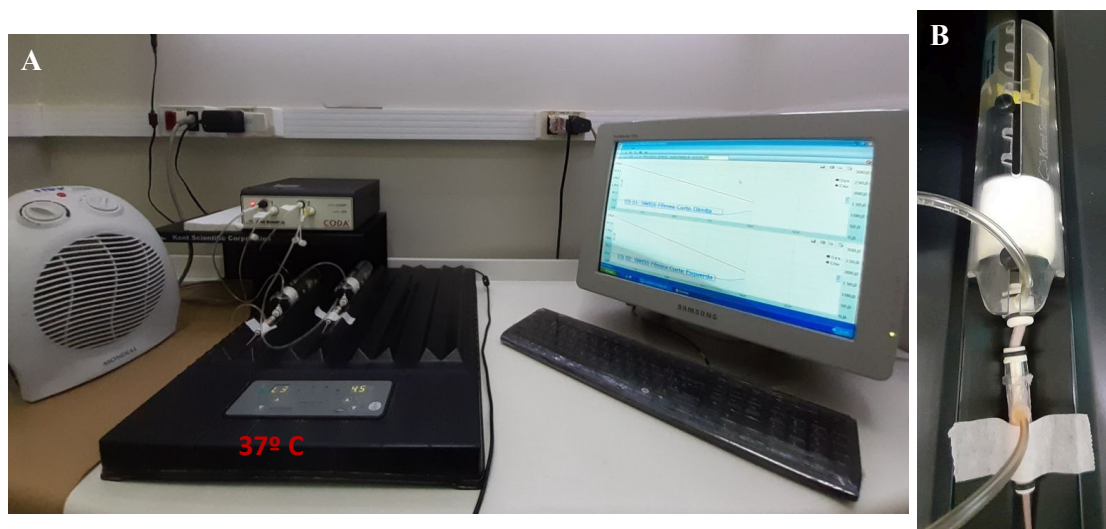
3.17 Ganho de peso

Os animais da prole foram pesados semanalmente, desde o desmame (4ª semana) até a eutanásia (21ª semana). As pesagens foram realizadas em balança digital. Machos e fêmeas foram pesados em momentos diferentes para não os submeter a estresse.

3.18 Aferição da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada por pletismografia de cauda na 10^a, 15^a e 20^a semanas de vida dos animais. Previamente as aferições do estudo os animais foram adaptados ao pletismógrafo e a mesa aquecedora que promove a vasodilatação das veias e artéria da cauda. A adaptação consistiu em alocar os animais no tubo de contenção e posicionar o manguito em torno da cauda para as devidas medições (**Figura 6**). Esse procedimento foi realizado em dois dias diferentes para que os animais pudessem se habituar à rotina e ao equipamento evitando assim a interferência de variáveis como o estresse. Anteriormente as aferições foi realizada a aclimação dos camundongos no laboratório por 1 hora a uma temperatura ambiente de 27° C a 30° C, iluminado e silencioso. A aclimação no aparelho foi de 5 minutos, antes de gerar os registros. Foram efetuados até 2 ciclos com 13 leituras por animal. Foi realizada uma média dos valores adequadamente aferidos. Caso, não fossem registradas leituras com qualidade adequada nos 2 primeiros ciclos, foi realizado um período de recuperação do animal por 30 minutos antes do prosseguimento da nova leitura. A frequência cardíaca foi monitorada como um indicador de estresse, com interrupção da leitura caso alcançasse 600 batimentos por minuto. Machos e fêmeas foram submetidos a aferição em momentos diferentes, para evitar possíveis agitações e estresse.

Figura 6 - Pletismografia de cauda em camundongos.



Nota: A= Sistema completo do pletismógrafo de cauda. B= Tubo contendor contendo o camundongo em mesa aquecedora e manguitos posicionados na cauda do animal. Fonte: Acervo pessoal.

3.19 Monitoramento dos níveis de glicose, colesterol total e triglicérides

Os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides foram avaliados por metodologia “*point of care*” em 2 momentos diferentes, na 16^a e 18^a semanas de vida da prole. Todas as dosagens foram feitas com 8 horas de jejum. As dosagens foram realizadas com os seguintes aparelhos: Accu-Chek® Active (Roche, Basileia, Suíça), para dosagem de glicose e Accutrend® Plus (Roche, Basileia, Suíça), para as dosagens de colesterol total e triglicérides. Ambos os aparelhos utilizam o sistema de tiras de dosagem e monitor para visualização dos resultados (FRECKMANN *et al.*, 2012). A cauda do animal foi contida e o sangue foi obtido através de um pequeno corte na extremidade da cauda. As gotas de sangue foram depositadas diretamente na tira de dosagem já inserida no monitor. Os resultados foram obtidos em questão de minutos.

3.20 Eutanásia da prole

Na 21^a semana, após 12 horas de jejum de alimentos, os animais foram pesados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Imediatamente após a confirmação do óbito foram coletados sangue e tecidos.

3.21 Coleta de sangue e tecidos

O sangue de cada animal foi coletado por punção cardíaca em seringa de 1 mL. Aproximadamente 200 µl de sangue foram acondicionados em tubos sem adição de anticoagulante e mantidos a temperatura ambiente até a utilização.

Após a coleta do sangue foi realizada a coleta e pesagem, em balança de precisão, do músculo gastrocnêmio esquerdo e da gordura abdominal, apresentada em gramas. O peso relativo da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio são marcadores indiretos de composição corporal. Os valores foram apresentados em percentagem relativa ao peso total do animal e foram comparados entre os grupos.

3.22 Análise de glicose, colesterol total e triglicérides

Cerca de 30 minutos após a coleta, o sangue foi centrifugado, o soro foi separado, aliquotado (10 µl para cada análise) e armazenado a -20° C até a utilização. As dosagens da glicose, colesterol total e triglicérides após a eutanásia foram realizadas por espectrofotometria utilizando os kits Glicose, Colesterol Liquiform e Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.23 Cálculo amostral

O cálculo amostral da prole foi realizado de acordo com os desfechos glicose, colesterol total, triglicérides e PAS, admitindo-se o maior tamanho da amostra. Para as variáveis glicose, colesterol total e triglicérides adotou-se uma diferença mínima esperada de 20% entre os grupos e um desvio padrão de 26,15 mg/dl (MEEHAN *et al.*, 1987). Para estes desfechos foram estabelecidos um tamanho amostral de 13 animais por grupo. No parâmetro PAS assumimos um desvio padrão de 8 mmHg (BARSHA *et al.*, 2016) e uma diferença mínima de 10% com um poder de teste de 90%. Desta forma o número amostral estimado foi de 15 animais por grupo. Portanto, o tamanho amostral adotado nesse estudo foi de 15 animais (prole) por grupo. Os cálculos foram realizados no programa SAS® versão 9.3, por meio da ferramenta PROC PROWER.

3.24 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória de cada variável através de medidas de posição central e de dispersão. Para a comparação do número de oócitos por fêmea e taxas de sobrevivência após o PZD, fertilização e formação de blastocistos entre os grupos FIV Fresco e Vitricificado foi realizado o teste t de Student para amostras independentes. As demais variáveis foram comparadas entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco. Para verificar se existem diferenças entre grupos e sexos para as variáveis: peso da gordura e do músculo (absoluto e relativo) e níveis de glicose, colesterol total e triglicérides (método colorimétrico) foi realizada uma análise de variância two-way (Anova), seguida do pós-teste de Tukey para verificar onde as

diferenças foram encontradas.

Para as variáveis: peso, pressão arterial sistólica e monitoramento dos níveis de glicose, colesterol total e triglicérides foi utilizado um modelo de regressão linear de efeitos mistos. Este modelo foi adotado pois existem duas fontes de variabilidade, intra e entre os indivíduos. As comparações entre os grupos dentro de cada tempo foram realizadas considerando os contrastes ortogonais, baseado na estatística t. Os dados foram apresentados em média e desvio padrão. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ($p\text{-valor} < 0,05$). Os cálculos foram realizados no programa SAS® versão 9.4.

4 RESULTADOS

4.1 Fluxograma do grupo Natural

Para a formação do grupo Natural foram utilizadas três fêmeas e três machos reprodutores férteis. Este número foi estabelecido para verificar a reprodutibilidade dos resultados e manter a variabilidade genética, sem exceder em demasia no número de filhotes necessário. As três fêmeas engravidaram e após 20 ou 21 dias deram à luz a 12, 14 e 14 filhotes, respectivamente. Após o desmame o sexo dos filhotes foi identificado e foram escolhidos seis (três fêmeas e três machos), oito (quatro fêmeas e quatro machos) e oito (quatro fêmeas e quatro machos) filhotes de cada ninhada, respectivamente. A exceção do sexo, a escolha dos filhotes foi aleatória. Optamos por manter um número de animais maior do que o proposto levando em consideração possíveis perdas no decorrer do estudo. Na 15ª semana de vida da prole Natural, um macho veio a óbito devido a brigas recorrentes entre este macho e seu irmão, que eram mantidos juntos no mesmo isolador. Desta forma, o grupo Natural possui 21 animais, sendo 11 fêmeas e 10 machos.

4.2 Fluxograma do grupo Estimulado

Para composição do grupo Estimulado foram necessárias três transferências embrionárias. Em cada transferência utilizamos uma fêmea doadora de embriões (média de 38 embriões em estágio de duas células captados por fêmea) e uma fêmea receptora (20 embriões transferidos em cada fêmea). A transferência embrionária só foi realizada quando a fêmea receptora apresentasse tampão vaginal e formação de ampola. 20 dias após a transferência embrionária as fêmeas deram à luz a ninhadas de seis (cinco machos e uma fêmea), quatro (três fêmeas e um macho) e sete (três fêmeas e quatro machos) filhotes cada. A taxa de nascidos vivos foi de 28% (17/60). Portanto, o grupo Estimulado possui 17 animais, sendo 10 machos e sete fêmeas.

4.3 Fluxograma do grupo FIV Fresco

Para a formação do grupo FIV Fresco foram necessárias sete replicatas experimentais. Foram utilizadas 31 fêmeas doadoras de oócitos, quatro a cinco fêmeas por replicata. Foram coletados em média de 40 oócitos por fêmea. Os oócitos foram

divididos e destinados à vitrificação oocitária ou FIV à fresco. Por experimento uma média de 57 oócitos foram submetidos à FIV (mínimo: 39 - máximo: 80). Cerca de 44 (mín.: 21 - máx.: 62) oócitos em cada experimento foram fertilizados (fertilização estimada: embriões clivados no segundo dia após a fertilização). A transferência dos embriões de duas células só foi realizada se a fêmea receptora apresentasse tampão vaginal e formação de ampola, caso contrário os embriões eram mantidos em cultivo até atingirem o estágio de blastocisto. Das sete replicatas experimentais, em quatro não houve fêmeas receptoras com tampão vaginal e ampola visível, com consequente cancelamento da transferência embrionária (**Tabela 1**).

Nas três replicatas em que foi possível realizarmos a transferência embrionária, utilizamos quatro fêmeas receptoras com tampão vaginal e ampola respectivamente (**Tabela 1**). Foram transferidos 20 a 22 embriões por fêmea. Das quatro fêmeas receptoras com transferência embrionária, três engravidaram. A primeira fêmea deu à luz seis filhotes (três fêmeas e três machos), a segunda fêmea gerou oito filhotes (quatro fêmeas e quatro machos) e a última fêmea deu à luz a seis filhotes (três fêmeas e três machos) (**Tabela 2**). Na 10ª semana de vida da prole FIV Fresco, dois machos irmãos morreram (vide item “Pressão arterial sistólica”). Desta forma, o grupo FIV Fresco possui 18 animais, sendo 10 fêmeas e oito machos.

4.4 Fluxograma do grupo Vitrificado

Foram realizadas 15 replicatas experimentais de aquecimento de oócitos. Em cada replicata, cerca de 67 (mín.: 58 - máx.: 84) oócitos foram aquecidos, e aproximadamente 64 (mín.: 55 - máx.: 80) sobreviveram. Por experimento, uma média de 54 oócitos foram submetidos a FIV (min: 46 - máx.: 67). Cerca de 41 (min: 32 - máx.: 58) oócitos em cada experimento foram fertilizados. A transferência dos embriões de duas células só foi realizada caso a fêmea receptora apresentasse tampão vaginal e ampola visível. Das 15 replicatas experimentais, oito não possuíram fêmeas receptoras com tampão vaginal e ampola visíveis, o que impossibilitou a transferência embrionária (**Tabela 3**).

Nas sete replicatas em que foi possível realizarmos a transferência embrionária utilizamos 11 fêmeas receptoras com tampão vaginal e ampola. Foram transferidos 20 a 30 embriões por fêmea. Das 11 fêmeas receptoras com transferência embrionária apenas três engravidaram e deram à luz a dois filhotes machos, um filhote de sexo não identificado e dois filhotes machos respectivamente. A primeira ninhada de dois filhotes,

infelizmente, precisou ser submetida a eutanásia devido as restrições de circulação nos biotérios e laboratórios impostas pela pandemia de COVID-19 em 2020. A fêmea, que deu à luz a apenas um filhote, desenvolveu o comportamento de canibalismo e comeu sua cria. Apesar de parecer chocante, esse fenômeno é habitual entre camundongos e outros roedores e pode ocorrer por diferentes motivos, desde anomalias na cria como pequeno tamanho ao nascer, até fragilidades da mãe que utiliza o filhote como fonte de energia. Perdemos este filhote antes mesmo de identificar seu sexo. Desta forma, o grupo Vitricado possui apenas 2 animais (machos), oriundos da terceira e última ninhada. Por possuir um tamanho amostral pequeno o grupo Vitricado não foi incluído na análise estatística das variáveis avaliadas na prole. No entanto, consideramos importante relatar estes achados e incluímos os dados da prole oriunda de oócitos vitricados/aquecidos de forma descritiva.

Na comparação entre os grupos FIV Fresco e Vitricado não foram observadas diferenças nas taxas de sobrevivência após o PZD e fertilização (p -valor $< 0,05$). As taxas de gestação e de nascidos vivos foram maiores no grupo FIV Fresco (**Tabela 2**).

4.5 Cultivo de blastocistos

Na replicata oito do grupo Vitricado não foi possível manter embriões em cultivo até o estágio de blastocisto devido a indisponibilidade da incubadora.

Não observamos diferenças significativas nas taxas de formação de blastocistos entre os grupos FIV Fresco e Vitricado (**Tabela 2**).

Tabela 1 - Dados descritivos das replicatas do grupo FIV Fresco.

ID da replicata	Nº total de oócitos	Média de oócitos por fêmea	Sobrevida após o PZD	Nº de oócitos na FIV	Fertilizados (Nº / %)	Nº de fêmeas receptoras	Taxa de gravidez (%)	Nº de nascidos vivos	Mantidos em cultivo	Formação blastocistos (Nº / %)
→ 1	178	45	43 (98%)	39	30 (77%)	1	100	6	5	0 (0%)
→ 2	228	57	61 (94%)	61	53 (87%)	1	100	6	31	16 (52%)
3	170	43	70 (93%)	60	49 (82%)	0	NA	NA	27	21 (78%)
4	163	41	76 (93%)	62	53 (85%)	0	NA	NA	31	16 (52%)
5	145	29	44 (71%)	44	21 (48%)	0	NA	NA	1	1 (100%)
6	136	27	56 (88%)	56	39 (70%)	0	NA	NA	4	3 (75%)
→ 7	188	38	98 (89%)	80	62 (78%)	2	50	8	22	16 (73%)

Nota: Nº= Número. %= percentagem. NA= Não se aplica. *A taxa de formação de blastocistos foi calculada levando-se em consideração o número total de blastocistos dividido pelo número total de embriões em estágio de duas células (fertilizados) mantidos em cultivo, multiplicado por 100. → = Replicatas com transferência embrionária.

Tabela 2 - Taxas das replicatas dos grupos FIV Fresco e Vitricificado.

Grupo	Sobrevida após aquecimento (%)	Sobrevida após PZD (%)	Taxa de fertilização (%)	Taxa de gestação (%)	Taxa de nascimento (%)	Formação blastocisto (%)
FIV Fresco	NA	89	76	75	31	60
Vitricificado	96	87	81	27	7	50

Nota: Dados apresentados em percentagem (%). NA= Não se aplica.

Tabela 3 - Dados descritivos das replicatas do grupo Vitricado.

ID da replicata	Média oócitos/fêmea	Nº de oócitos aquecidos	Sobrevida após o aquecimento	Sobrevida após o PZD	Nº de oócitos FIV	Fertilizados (Nº / %)	Nº de fêmeas receptoras	Taxa de gestação (%)	Nº de nascidos vivos	Mantidos em cultivo	Formação blastocistos (Nº / %)
→ 1	45	70	65 (93%)	53 (82%)	53	43 (81%)	2	50	2	3	1 (33%)
2	57	72	72 (100%)	51 (71%)	51	39 (76%)	0	NA	NA	17	6 (35%)
3	43	72	71 (99%)	58 (82%)	58	48 (83%)	0	NA	NA	26	23 (88%)
4	41	72	66 (92%)	60 (91%)	60	58 (97%)	0	NA	NA	14	7 (50%)
→ 5	29	72	68 (94%)	54 (79%)	51	42 (82%)	2	50	1	3	1 (33%)
6	27	72	72 (100%)	67 (93%)	67	55 (82%)	0	NA	NA	12	11 (92%)
7	38	72	72 (100%)	65 (90%)	64	54 (84%)	0	NA	NA	14	8 (57%)
8	42	60	60 (100%)	56 (93%)	54	38 (70%)	0	NA	NA	0	NA
→ 9	40	61	59 (97%)	57 (97%)	57	51 (89%)	1	100	2	8	5 (63%)
10	28	60	60 (100%)	57 (95%)	49	32 (65%)	0	NA	NA	32	11 (34%)
→ 11	19	59	58 (98%)	57 (98%)	55	52 (95%)	2	0	NA	0	NA
→ 12	33	59	56 (95%)	49 (88%)	46	42 (91%)	1	0	NA	9	0
13	21	58	55 (95%)	49 (89%)	46	38 (83%)	0	NA	NA	18	7 (39%)
→ 14	36	65	57 (88%)	50 (88%)	48	36 (75%)	1	0	NA	6	2 (33%)
→ 15	25	84	80 (95%)	62 (78%)	57	39 (68%)	2	0	NA	0	NA

Nota: Nº= Número. %= percentagem. NA= Não se aplica. *A taxa de formação de blastocistos foi calculada levando-se em consideração o número total de blastocistos dividido pelo número total de embriões em estágio de duas células (fertilizados) mantidos em cultivo, multiplicado por 100. → = Replicatas com transferência embrionária.

4.6 Ganho de peso da prole

O peso dos animais dos grupos Natural, Estimulado, FIV Fresco e Vitricado foi registrado semanalmente a partir do desmame, na 4ª semana de vida, até a 21ª semana, no momento da eutanásia (**Tabela 4 e Tabela 5**).

Tabela 4 – Média de peso dos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco do desmame até a eutanásia.

Sexo	Tempo (semanas)	Grupo Natural		Grupo Estimulado		Grupo FIV Fresco		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Fêmeas	4ª	12,48	2,29	22,88	2,20	17,72	1,55	
	5ª	20,46	3,02	25,84	1,11	23,55	2,14	
	6ª	24,33	1,90	27,46	1,38	25,45	1,73	
	7ª	25,49	2,18	27,89	2,61	27,87	1,32	
	8ª	26,35	1,72	29,44	2,38	29,40	1,55	
	9ª	27,47	2,17	31,01	1,85	29,97	2,16	
	10ª	29,00	2,39	31,59	2,35	31,88	1,87	
	11ª	28,51	2,99	31,63	1,52	31,83	2,52	
	12ª	31,09	2,44	33,24	2,46	31,31	3,43	
	13ª	31,98	2,66	34,09	1,85	33,21	2,05	
	14ª	32,26	3,12	35,43	3,21	33,94	2,22	
	15ª	33,25	3,12	35,71	2,69	34,62	2,13	
	16ª	32,08	2,75	36,02	4,17	34,90	2,36	
	17ª	34,40	3,70	36,11	2,85	35,32	2,63	
	18ª	35,41	4,26	37,16	3,49	35,43	2,98	
	19ª	35,79	3,54	40,29	2,93	36,73	2,93	
	20ª	36,66	3,83	39,71	2,69	38,97	2,95	
	21ª	36,99	4,03	38,86	3,35	38,40	2,96	
	Machos	4ª	12,47	3,20	26,76	3,71	18,40	1,77
		5ª	23,53	3,46	32,17	2,00	27,43	1,95
		6ª	29,92	2,57	34,74	2,98	32,10	1,94
7ª		32,72	2,17	37,03	3,71	35,61	2,42	
8ª		34,14	2,32	39,06	3,12	37,81	2,28	
9ª		35,64	1,83	40,35	3,92	39,09	2,42	
10ª		37,18	2,36	41,18	4,06	40,21	2,08	
11ª		39,89	2,55	41,22	3,70	40,99	2,98	
12ª		41,01	1,97	43,23	3,76	43,39	2,91	
13ª		41,98	1,93	44,11	3,95	44,21	2,58	
14ª		42,79	2,36	46,20	3,94	44,99	2,77	
15ª		42,16	2,01	46,90	4,12	45,06	2,94	
16ª		41,64	2,22	48,60	5,24	44,96	3,01	
17ª		44,37	2,74	47,72	3,90	46,50	2,87	
18ª		45,16	2,76	48,32	3,93	46,35	2,96	
19ª		45,18	2,69	50,80	3,55	48,28	3,11	
20ª		45,78	3,09	50,40	4,20	48,39	2,68	
21ª		46,46	3,19	48,54	4,16	47,36	2,85	

Nota: Peso em gramas (g). FIV= Fertilização *in vitro*. DP= Desvio padrão. Grupo Natural= 11 fêmeas e 10 machos. Grupo Estimulado= 7 fêmeas e 10 machos. Grupo FIV Fresco= 10 fêmeas e 8 machos.

As comparações foram estratificadas por sexo e realizadas entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco. As fêmeas do grupo Estimulado apresentaram

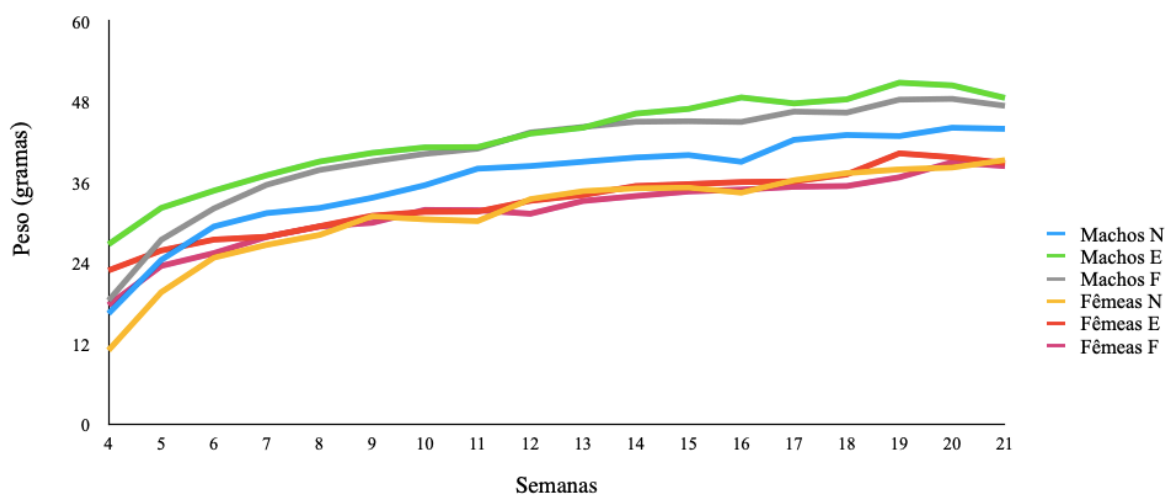
aumento significativo de peso nas semanas 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 16, 19 e 20 quando comparadas as fêmeas do grupo Natural. Entre os machos, o aumento de peso do grupo Estimulado foi observado nas semanas de 4 a 10 e de 14 a 20 (p -valor $< 0,05$) quando comparados ao grupo Natural.

Ao compararmos os grupos Natural e FIV Fresco as fêmeas do grupo FIV Fresco apresentaram aumento significativo do peso nas semanas 4, 5, de 8 a 11 e na 16ª semana. Nos machos do grupo FIV Fresco o aumento do peso foi verificado nas semanas 4, 5, de 7 a 10, 15, 16 e 19 (p -valor $< 0,05$).

Na comparação entre os grupos Estimulado e FIV Fresco, as fêmeas do grupo Estimulado apresentaram aumento significativo de peso apenas nas semanas 4 e 19. Entre os machos o aumento do peso no grupo Estimulado foi observado nas semanas 4, 5 e 16 (p -valor $< 0,05$).

A **Figura 7** ilustra a progressão do ganho de peso dos animais, machos e fêmeas, dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco no decorrer de 18 semanas de vida.

Figura 7 - Progressão do ganho de peso dos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco do desmame até a eutanásia.



Nota: N= Grupo Natural. E= Grupo Estimulado. F= Grupo FIV Fresco

Devido ao pequeno tamanho amostral do grupo Vitricado, os dados de peso não foram incluídos na comparação estatística com os demais grupos. Os dados descritivos individuais mostram uma possível tendência de aumento de peso nos dois machos do

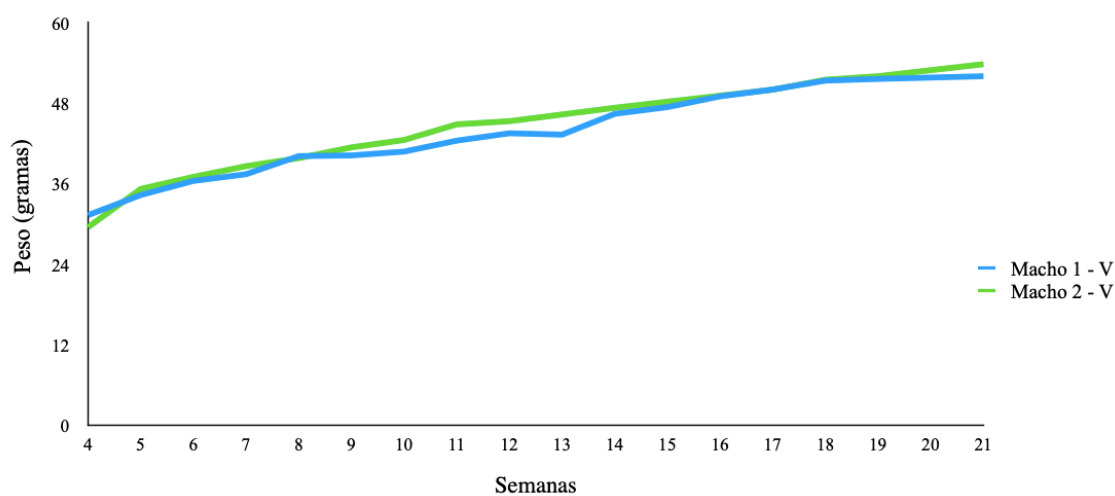
grupo Vitricado comparados com os demais grupos do estudo (**Tabela 5**). A progressão do ganho de peso dos dois machos está ilustrada na **Figura 8**.

Tabela 5 - Peso dos machos do grupo Vitricado do desmame até a eutanásia.

Tempo (semanas)	Vitricado Macho 1	Vitricado Macho 2
4 ^a	31,30	29,50
5 ^a	34,30	35,20
6 ^a	36,40	37,00
7 ^a	37,40	38,60
8 ^a	40,10	39,80
9 ^a	40,20	41,40
10 ^a	40,77	42,50
11 ^a	42,40	44,83
12 ^a	43,50	45,30
13 ^a	43,30	46,30
14 ^a	46,40	47,30
15 ^a	47,40	48,20
16 ^a	49,00	49,10
17 ^a	50,02	50,00
18 ^a	51,35	51,48
19 ^a	51,60	52,00
20 ^a	51,80	52,90
21 ^a	52,00	53,80

Nota: Peso em gramas (g).

Figura 8 - Progressão do ganho de peso dos animais do grupo Vitricado do desmame até a eutanásia.



Nota: V= Grupo Vitricado.

4.7 Peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio da prole

Após a eutanásia coletamos a gordura abdominal e o músculo gastrocnêmio esquerdo da prole de todos os grupos do estudo. O peso absoluto (**Tabela 6**) e relativo dos tecidos foi comparado entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco. As comparações foram estratificadas por sexo e independente de sexo.

Tabela 6 - Peso absoluto da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.

Grupo	Sexo	Nº	Tecido	Média	DP	Mínimo	Máximo
Natural	Fêmeas	11	Gordura	1,29	0,64	0,38	2,22
			Músculo	0,20	0,09	0,06	0,33
	Machos	10	Gordura	1,33	0,46	0,53	2,07
			Músculo	0,26	0,22	0,07	0,84
Estimulado	Fêmeas	7	Gordura	2,07	0,36	1,74	2,73
			Músculo	0,16	0,01	0,15	0,17
	Machos	10	Gordura	2,06	0,45	1,32	2,96
			Músculo	0,19	0,03	0,15	0,23
FIV Fresco	Fêmeas	10	Gordura	1,31	0,42	0,59	1,79
			Músculo	0,23	0,13	0,02	0,40
	Machos	8	Gordura	1,69	0,46	0,94	2,48
			Músculo	0,27	0,19	0,14	0,70

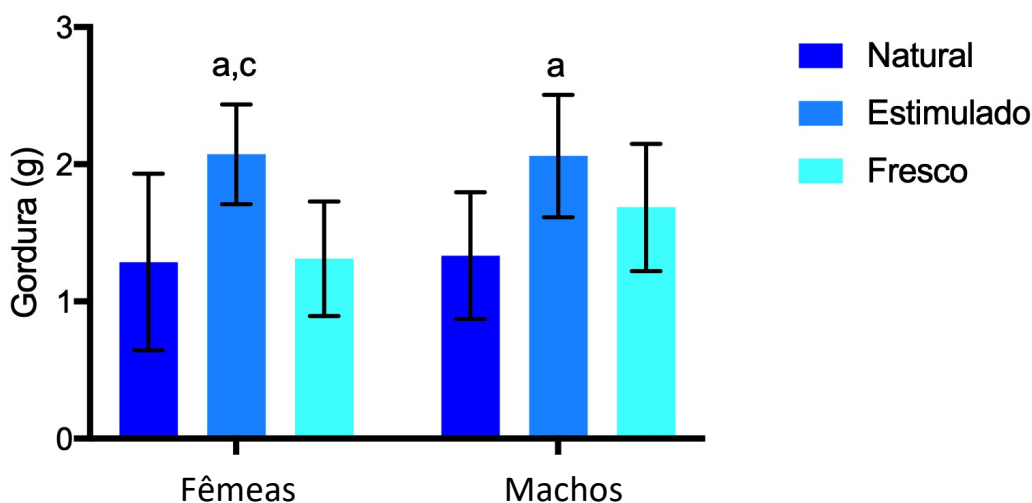
Nota: N^o= Tamanho amostral. Dados expressos em média, desvio padrão (DP), mínimo e máximo. Peso apresentado em gramas (g).

Não observamos diferenças significativas no peso absoluto e no peso relativo do músculo gastrocnêmio entre fêmeas, machos e na comparação independente de sexo, entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.

Entre as fêmeas, o grupo Estimulado apresentou o maior peso da gordura abdominal, absoluta e relativa, quando comparado as fêmeas dos grupos Natural e FIV Fresco (p-valor < 0,05). Os machos do grupo Estimulado apresentaram maior peso da gordura abdominal, absoluta e relativa, do que os machos do grupo Natural (p-valor <0,05) (**Figura 9**).

Ao compararmos os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco, independente de sexo, o grupo Estimulado apresentou elevação no peso da gordura abdominal quando comparado aos grupos Natural e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Figura 9 – Comparações do peso absoluto da gordura abdominal em fêmeas e machos entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.



Nota: a = Diferença significativa entre os grupos Natural e Estimulado. c = Diferença significativa entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p -valor < 0,05).

Os dados de peso da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio dos animais do grupo Vitricado não foram incluídos na comparação estatística com os demais grupos devido ao tamanho amostral reduzido. Portanto, optamos por descrever individualmente o peso dos tecidos de ambos os machos do grupo Vitricado (**Tabela 7**). O peso do músculo gastrocnêmio dos machos do grupo Vitricado é semelhante à média do peso do grupo Estimulado. A gordura abdominal tem um peso próximo a média dos grupos Estimulado e FIV Fresco.

Tabela 7 - Peso absoluto da gordura abdominal e do músculo gastrocnêmio dos animais do grupo Vitricado.

Tecido	Vitricado Macho 1	Vitricado Macho 2
Gordura abdominal	1,700	2,230
Músculo gastrocnêmio	0,180	0,200

Nota: Peso em gramas (g).

4.8 Pressão arterial sistólica da prole

A PAS dos animais da prole foi aferida na 10^a, 15^a e 20^a semanas de vida (**Tabela 8 e Tabela 9**). Os níveis normais de PAS em camundongos podem chegar à 170 mmHg (WILDE *et al.*, 2017). Nenhuma das médias dos níveis da PAS atingiu 170 mmHg, apenas um macho na 15^a e outro macho na 20^a semana, ambos do grupo FIV Fresco, apresentaram níveis de PAS acima de 170 mmHg. Este é um bom indicativo de que os animais estavam aclimatados ao aparelho de pletismografia de cauda e não apresentaram alteração da PAS por estresse da contenção. Apesar disso, dois machos do grupo FIV Fresco morreram durante a primeira aferição da PAS. Estes machos eram irmãos e mantidos no mesmo mini isolador. Antes da aclimatação no contensor os machos estavam brigando. Acreditamos que ao serem colocados nos contensores os animais que já estavam estressados foram submetidos a um ambiente com temperatura elevada e espaço confinado o que piorou seus níveis de estresse e pode ter levado a uma parada cardíaca. Essa intercorrência foi muito rápida impossibilitando qualquer intervenção.

As comparações dos níveis de PAS foram realizadas entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco, intra e entre grupos, independente de sexo e estratificada por sexo. As diferenças significativas só foram observadas entre os machos.

Nas comparações intra grupo, observamos diferenças entre os machos do grupo Estimulado quando comparamos os níveis de PAS da 10^a com a 20^a semanas (p-valor = 0,0070). No grupo Natural as diferenças foram encontradas nas comparações entre a 10^a e a 15^a semanas (p-valor = 0,0253) e entre a 10^a e a 20^a semanas (p-valor = 0,0017). Nas três comparações a média da PAS aumentou com o passar das semanas.

A comparação entre grupos evidenciou um aumento da PAS nos machos do grupo FIV Fresco na 10^a semana quando comparados aos machos dos grupos Natural (p-valor = 0,0030) e Estimulado (p-valor = 0,0075). Na 15^a semana os machos do grupo FIV Fresco apresentaram maiores níveis de PAS do que os machos do grupo Estimulado (p-valor = 0,0082) (**Figura 10**).

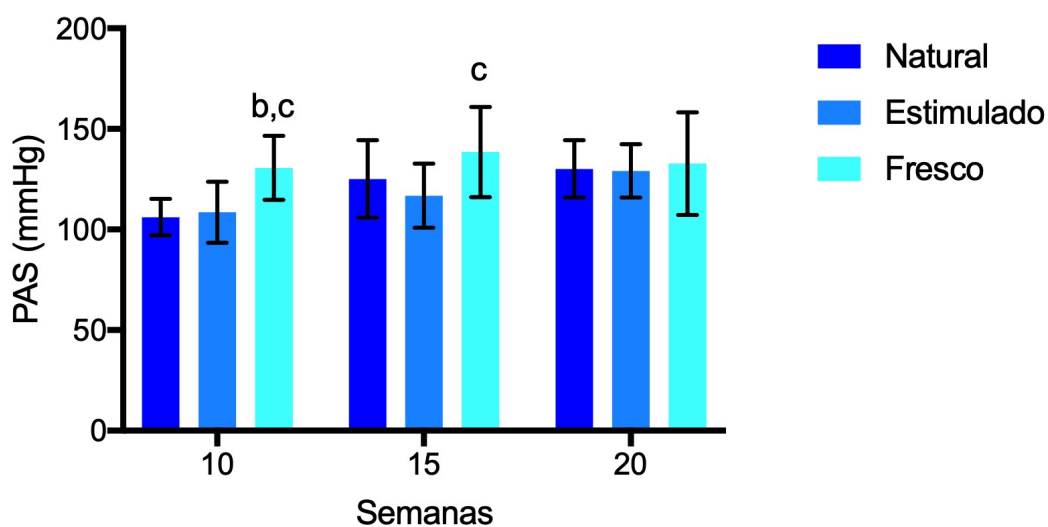
Os níveis da PAS dos animais do grupo Vitricado foram descritos de forma individual e encontram-se próximo a média dos demais grupos (**Tabela 9**).

Tabela 8 - Pressão arterial sistólica dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco, na 10^a, 15^a e 20^a semanas de vida.

Grupo	Sexo	Nº	Semana	Média	DP	Mínimo	Máximo
Natural	Fêmeas	11	10 ^a	109,98	17,95	89,80	156,20
			15 ^a	111,07	7,64	95,80	122,17
			20 ^a	112,47	14,88	92,14	141,86
	Machos	10	10 ^a	106,10	9,09	85,60	116,13
			15 ^a	123,02	17,61	104,57	154,20
			20 ^a	130,13	14,28	106,57	150,80
Estimulado	Fêmeas	7	10 ^a	112,81	25,12	92,43	165,00
			15 ^a	107,50	6,47	98,08	114,80
			20 ^a	120,27	15,98	94,22	145,00
	Machos	10	10 ^a	108,63	15,15	88,43	132,00
			15 ^a	116,77	15,90	87,22	139,50
			20 ^a	129,15	13,32	113,20	154,78
FIV Fresco	Fêmeas	10	10 ^a	112,20	11,83	99,00	130,00
			15 ^a	112,20	7,71	101,00	127,00
			20 ^a	114,00	10,48	103,00	134,00
	Machos	8	10 ^a	130,63	15,91	112,00	163,00
			15 ^a	138,50	22,42	118,00	188,00
			20 ^a	132,75	25,45	111,00	175,00

Nota: N^o= Tamanho amostral. Dados expressos em média, desvio padrão (DP), mínimo e máximo. Níveis de pressão arterial sistólica expressos em milímetros de mercúrio (mmHg).

Figura 10 - Comparação da pressão arterial sistólica entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco na 10^a, 15^a e 20^a semanas de vida.



Nota: PAS= Pressão arterial sistólica. N= Natural. E= Estimulado. F= FIV Fresco. mmHg= milímetros de mercúrio. b= Diferenças significativas entre os grupos Natural e FIV Fresco. c= Diferenças significativas entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Tabela 9 - Pressão arterial sistólica dos animais do grupo Vitricado.

Semana	Vitricado Macho 1	Vitricado Macho 2
10 ^a	129	113
15 ^a	117	151
20 ^a	131	129

Nota: Dados de pressão arterial sistólica expressos em milímetros de mercúrio (mmHg).

4.9 Glicose, colesterol total e triglicérides da prole

Os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides foram aferidos nos animais dos grupos Natural, Estimulado, FIV Fresco e Vitricado por duas metodologias diferentes em três tempos distintos. Na 16^a e 18^a semanas de vida dos animais, monitoramos os metabólitos utilizando tiras de dosagem, também conhecida por metodologia “*point of care*”. No sangue coletado após a eutanásia, na 21^a semana, avaliamos os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides por espectrofotometria, uma técnica colorimétrica que utiliza kits comerciais. Apesar de agruparmos a descrição dos resultados das duas técnicas, as metodologias são distintas e os resultados de ambas não devem ser comparados entre si.

As comparações entre os grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco foram estratificadas por sexo e independentes de sexo.

Devido ao pequeno tamanho amostral os animais do grupo Vitricado não foram incluídos nas comparações estatísticas com os demais grupos. Os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides dos dois machos do grupo Vitricado foram descritos individualmente ao final desse item.

4.9.1 Glicose

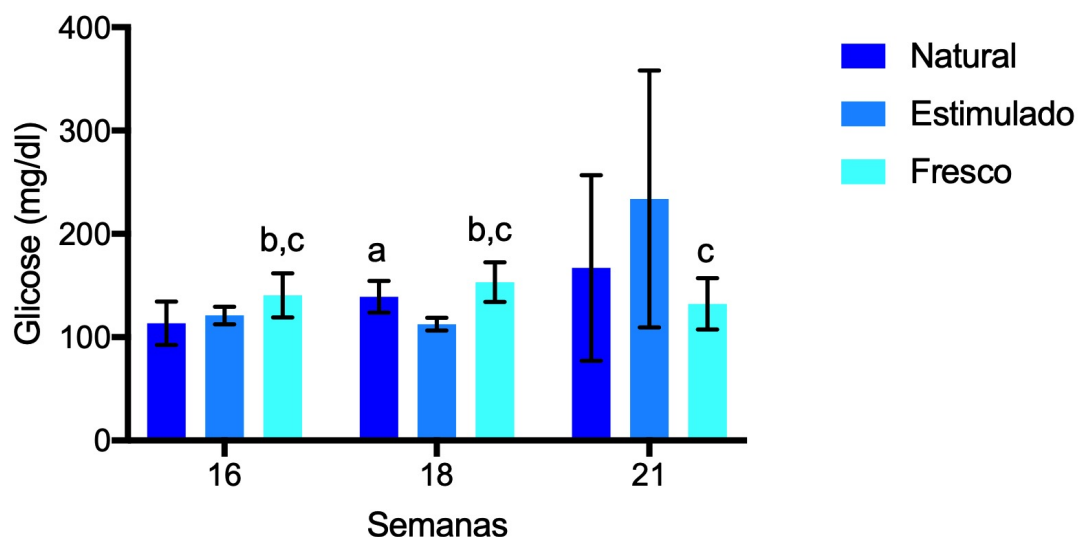
Os níveis de glicose nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco estão descritos na **Tabela 10** e a seguir suas respectivas comparações entre fêmeas (**Figura 11**), machos (**Figura 12**) e independente de sexo.

Tabela 10 - Níveis de glicose nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.

Grupo	Sexo	Nº	Semana	Média	DP	Mínimo	Máximo
Natural	Fêmeas	11	16 ^a	113,45	21,05	83,00	141,00
			18 ^a	139,18	15,18	116,00	164,00
			21 ^a	167,14	89,83	106,42	417,11
	Machos	10	16 ^a	147,90	16,23	123,00	177,00
			18 ^a	162,00	11,39	145,00	187,00
			21 ^a	164,65	52,73	103,74	275,94
Estimulado	Fêmeas	7	16 ^a	121,00	8,41	110,00	130,00
			18 ^a	112,57	6,19	104,00	120,00
			21 ^a	233,75	124,30	121,90	472,04
	Machos	10	16 ^a	139,20	14,34	117,00	163,00
			18 ^a	157,00	13,14	142,00	184,00
			21 ^a	198,49	62,47	125,71	324,65
FIV Fresco	Fêmeas	10	16 ^a	140,50	21,20	104,00	170,00
			18 ^a	153,30	19,18	132,00	186,00
			21 ^a	132,30	24,76	86,10	167,91
	Machos	8	16 ^a	164,75	19,67	146,00	207,00
			18 ^a	173,13	20,19	154,00	215,00
			21 ^a	126,82	37,83	59,78	170,05

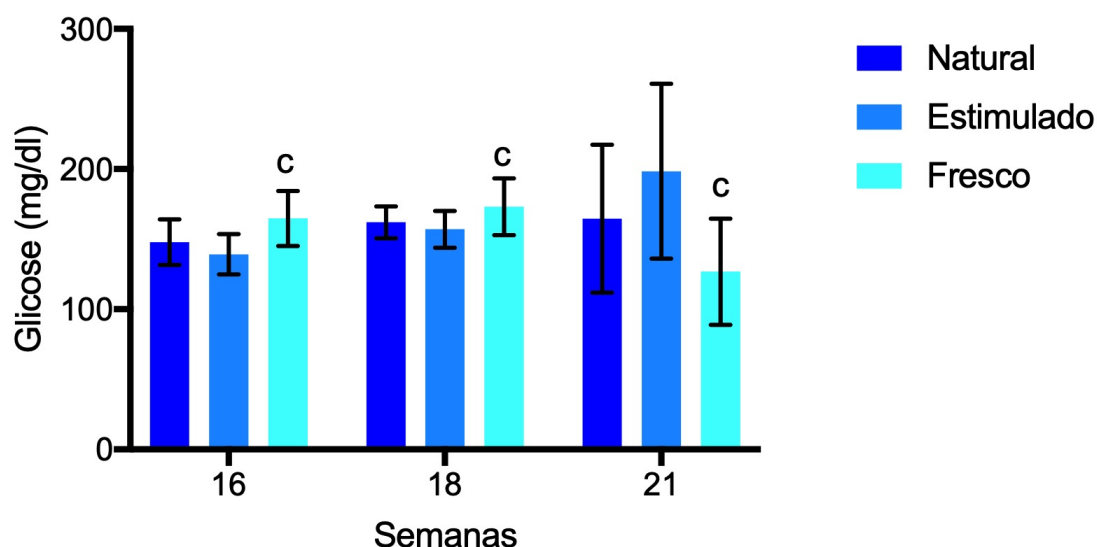
Nota: Níveis de glicose descritos em miligramas por decilitro (mg/dl). N^o= Tamanho amostral. DP= Desvio padrão.

Figura 11 - Comparação dos níveis de glicose entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.



Nota: N= Natural. E= Estimulado. F= FIV Fresco. mg/dl= miligramas por decilitro. a= Diferença significativa entre os grupos Natural e Estimulado. b= Diferença significativa entre os grupos Natural e FIV Fresco. c= Diferença significativa entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Figura 12 - Comparação dos níveis de glicose entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.



Nota: N= Natural. E= Estimulado. F= FIV Fresco. mg/dl= miligramas por decilitro. c= Diferença significativa entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Nas comparações independentes de sexo, na 16ª e 18ª semanas, os animais do grupo FIV Fresco apresentaram níveis de glicose elevados quando comparados aos grupos Natural e Estimulado. Ainda na 18ª semana, os animais do grupo Natural apresentaram maiores níveis de glicose do que o grupo Estimulado. Na 21ª semana os animais do grupo Estimulado apresentaram níveis de glicose mais elevados quando comparados aos grupos Natural e FIV Fresco independente de sexo (p-valor < 0,05).

4.9.2 Colesterol total

Descrevemos abaixo os níveis de colesterol total nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco (**Tabela 11**) e suas respectivas comparações entre fêmeas (**Figura 13**), machos (**Figura 14**) e independente de sexo.

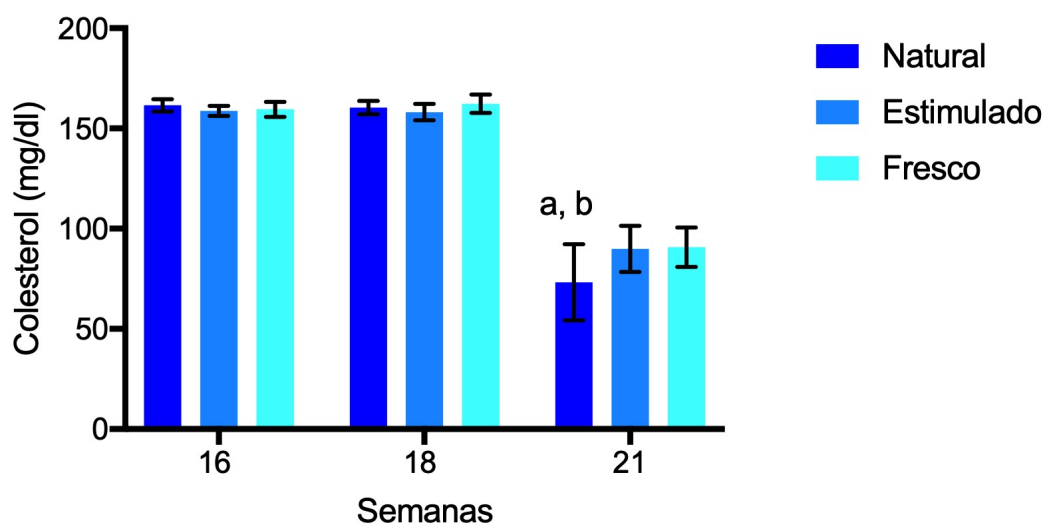
Ao compararmos os níveis de colesterol total entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco não observamos diferenças significativas nas semanas 16 e 18 (**Figura 13**).

Tabela 11 - Níveis de colesterol total nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.

Grupo	Sexo	Nº	Semana	Média	DP	Mínimo	Máximo
Natural	Fêmeas	11	16 ^a	161,55	3,08	154,00	165,00
			18 ^a	160,36	3,32	155,00	167,00
			21 ^a	73,22	18,96	38,95	110,53
	Machos	10	16 ^a	163,60	2,59	160,00	167,00
			18 ^a	163,10	3,31	157,00	167,00
			21 ^a	103,47	14,44	78,95	125,37
Estimulado	Fêmeas	7	16 ^a	158,71	2,50	154,00	162,00
			18 ^a	158,14	4,10	152,00	163,00
			21 ^a	89,93	11,52	71,28	107,26
	Machos	10	16 ^a	161,30	3,97	153,00	165,00
			18 ^a	158,10	1,66	157,00	161,00
			21 ^a	138,63	19,73	105,59	166,70
FIV Fresco	Fêmeas	10	16 ^a	159,50	3,81	152,00	164,00
			18 ^a	162,30	4,57	152,00	167,00
			21 ^a	90,71	9,86	77,61	102,49
	Machos	8	16 ^a	158,88	3,76	154,00	165,00
			18 ^a	156,00	10,28	132,00	166,00
			21 ^a	119,83	18,38	88,56	142,29

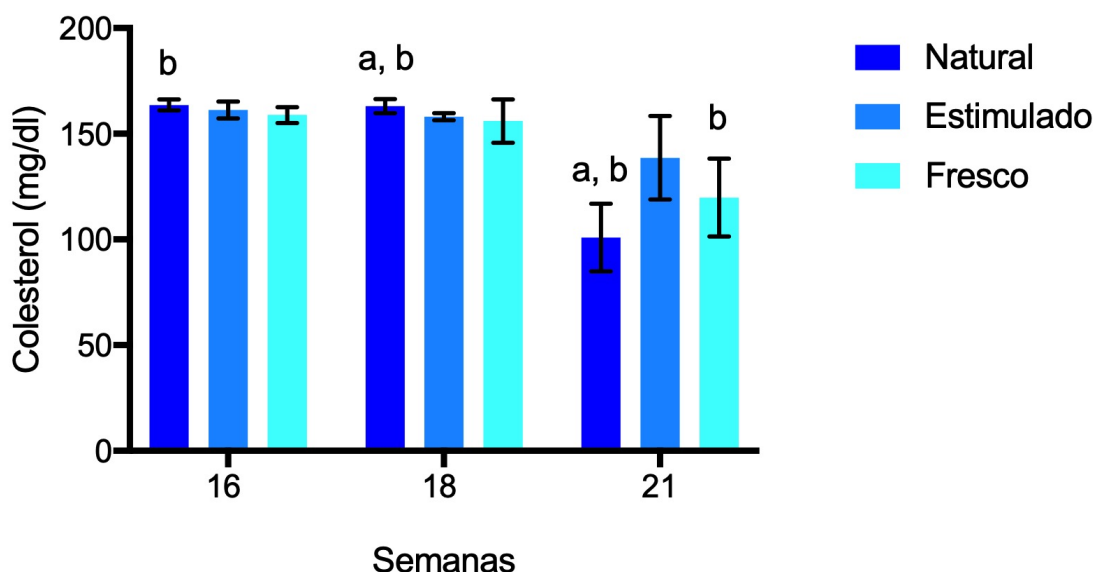
Nota: Níveis de colesterol total descritos em miligramas por decilitro (mg/dl). N^o= Tamanho amostral. DP= Desvio padrão.

Figura 13 - Comparação dos níveis de colesterol total entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.



Nota: mg/dl= miligramas por decilitro. a= Diferença significativa entre os grupos Natural e Estimulado. b= Diferença significativa entre os grupos Natural e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Figura 14 - Comparação dos níveis de colesterol total entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.



Nota: mg/dl= miligramas por decilitro. a= Diferença significativa entre os grupos Natural e Estimulado. b= Diferença significativa entre os grupos Natural e FIV Fresco. c= Diferença significativa entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Na comparação independente de sexo, os animais do grupo Natural apresentaram maiores níveis de colesterol total do que os animais do grupo Estimulado em ambas as semanas, 16 e 18 (p-valor < 0,05). Na análise após a eutanásia, na 21ª semana, foram os animais dos grupos Estimulado e FIV Fresco que apresentaram maiores níveis de colesterol total do que os animais do grupo Natural (p-valor < 0,05).

4.9.3 Triglicérides

A seguir descrevemos os níveis de triglicérides nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco (**Tabela 12**) e suas respectivas comparações entre fêmeas (**Figura 15**), machos e independente de sexo.

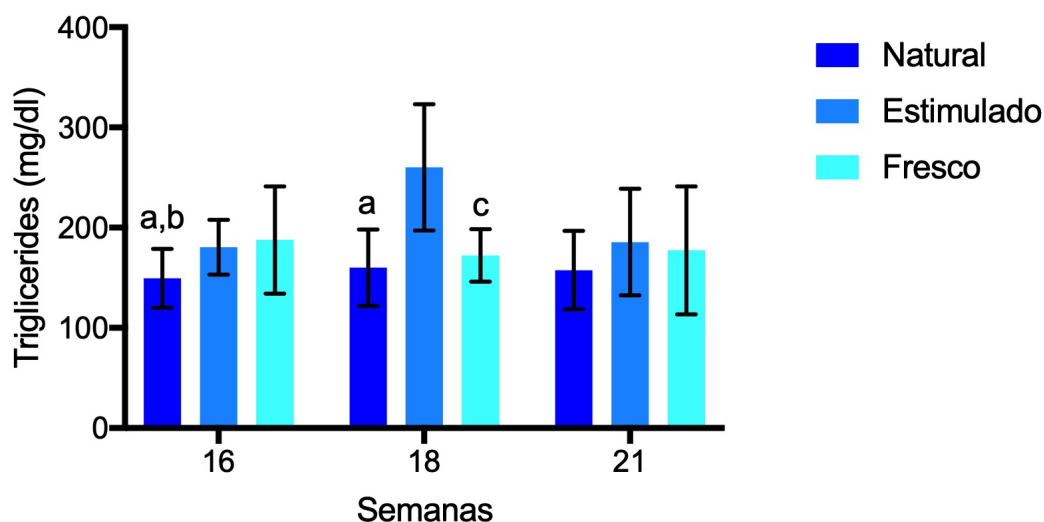
Ao compararmos os níveis de triglicérides entre os machos dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco não observamos diferenças significativas na 16ª, 18ª e 21ª semanas. Na 21ª semana, nenhuma diferenças nos níveis de triglicérides foi encontrada, nas comparações entre fêmeas, machos e independente de sexo, nos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco.

Tabela 12 - Níveis de triglicérides nos animais dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.

Grupo	Sexo	Nº	Semana	Média	DP	Mínimo	Máximo
Natural	Fêmeas	11	16 ^a	147,18	28,94	95,00	196,00
			18 ^a	160,00	38,27	77,00	228,00
			21 ^a	157,58	39,23	106,67	212,73
	Machos	10	16 ^a	135,80	23,97	100,00	183,00
			18 ^a	140,30	14,28	119,00	158,00
			21 ^a	153,65	33,17	120,00	226,67
Estimulado	Fêmeas	7	16 ^a	180,57	27,34	147,00	229,00
			18 ^a	260,14	62,87	171,00	377,00
			21 ^a	185,59	53,11	108,77	256,07
	Machos	10	16 ^a	123,50	24,30	91,00	175,00
			18 ^a	152,00	16,53	125,00	176,00
			21 ^a	175,67	52,53	95,33	263,16
FIV Fresco	Fêmeas	10	16 ^a	187,70	53,58	120,00	272,00
			18 ^a	171,00	24,99	130,00	204,00
			21 ^a	177,38	63,89	99,05	263,64
	Machos	8	16 ^a	141,25	26,95	112,00	198,00
			18 ^a	156,38	33,78	104,00	205,00
			21 ^a	160,94	33,45	112,38	209,09

Nota: Níveis de triglicérides descritos em miligramas por decilitro (mg/dl). N^o= Tamanho amostral. DP= Desvio padrão.

Figura 15 - Comparação dos níveis de triglicérides entre as fêmeas dos grupos Natural, Estimulado e FIV Fresco nas semanas 16, 18 e após a eutanásia na 21ª semana.



Nota: mg/dl= miligramas por decilitro. a= Diferença significativa entre os grupos Natural e Estimulado. b= Diferença significativa entre os grupos Natural e FIV Fresco. c= Diferença significativa entre os grupos Estimulado e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

Na comparação independente de sexo, na 16ª semana, os animais do grupo FIV Fresco apresentaram níveis elevados de triglicérides quando comparados ao grupo Natural (p-valor < 0,05). Na 18ª semana os animais do grupo Estimulado possuíram maiores níveis de triglicérides do que os animais dos grupos Natural e FIV Fresco (p-valor < 0,05).

4.9.4 Glicose, colesterol total e triglicérides da prole do grupo Vitricado

O tamanho amostral reduzido do grupo Vitricado não permitiu comparações estatísticas, portanto optamos por descrever de forma individual os níveis de glicose, colesterol total e triglicérides nas semanas 16, 18 e 21. Os níveis observados no macho 1 encontram-se próximo a média dos demais grupos. O macho 2, por sua vez, apresenta níveis elevados de glicose na 16ª semana e de triglicérides na 18ª e 21ª semanas, quando comparado aos grupos Natural e Estimulado. As possíveis tendências de aumento observadas no macho 2 assemelham-se aos dados apresentados pelo grupo FIV Fresco (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Níveis de glicose, colesterol total e triglicérides nos animais do grupo Vitricado.

Semana	Variável	Vitricado Macho 1	Vitricado Macho 2
16ª	Glicose	145,00	205,00
	Colesterol total	160,00	162,00
	Triglicérides	149,00	138,00
18ª	Glicose	167,00	185,00
	Colesterol total	160,00	156,00
	Triglicérides	148,00	225,00
21ª	Glicose	136,36	198,93
	Colesterol total	98,51	106,47
	Triglicérides	174,55	363,64

Nota: Dados apresentados em miligramas por decilitro (mg/dl).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o impacto da estimulação ovariana e da estimulação ovariana associada a FIV sobre parâmetros metabólicos na prole adulta de camundongos. Avaliamos também a viabilidade da obtenção de prole por meio da combinação das técnicas de vitrificação oocitária, PZD e FIV. Os animais concebidos após estimulação ovariana isolada ou associada a FIV apresentaram, na vida adulta, aumento dos níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides, além do maior ganho de peso, quando comparados aos animais concebidos naturalmente. Os machos do grupo FIV Fresco apresentaram maiores valores de PAS, um importante fator de risco para hipertensão arterial. Enquanto o grupo Estimulado possuiu maior peso de gordura abdominal e maior peso corporal do que os grupos Natural e FIV Fresco, um agravante que sugere alterações no metabolismo da gordura. As baixas taxas de gestação e nascidos vivos do grupo Vitrificado sugerem que oócitos murinos se tornam muito frágeis após a vitrificação e o aquecimento, sendo mais sensíveis ao PZD, comprometendo o desenvolvimento e potencial de nidação embrionária. Esses achados apontam para a baixa viabilidade de obtenção de prole murina utilizando a combinação das técnicas de reprodução assistida propostas, o que torna o modelo inadequado para investigar o impacto da vitrificação oocitária em desfechos da prole na vida adulta.

Uma recente revisão sistemática e metanálise em humanos, com idade média entre 4 e 21 anos, verificou um pequeno, porém significativo, aumento da PAS em 872 indivíduos nascidos após estímulo ovariano seguido de FIV ou ICSI quando comparados a 3.034 concebidos naturalmente. Além das alterações na PAS, os autores mostraram que a função diastólica cardíaca estava abaixo do ideal e a espessura da artéria carótida era maior em crianças concebidas após FIV ou ICSI. Esses achados, em conjunto, indicam um maior risco de doenças cardiovasculares na prole de FIV/ICSI. Apesar do estudo incluir 45 adultos jovens, com até 22 anos, nascidos após FIV ou ICSI, a grande maioria dos indivíduos analisados eram recém nascidos ou crianças com até 12 anos de idade (GUO *et al.*, 2017). Desta forma, uma questão importante é levantada, teria essa pequena diferença na PAS durante a infância e a adolescência impacto na vida adulta, aumentando o risco de hipertensão e doenças cardiovasculares?

Em nosso estudo, avaliando camundongos adultos, observamos um aumento significativo da PAS nos machos adultos concebidos após estímulo ovariano seguido de FIV quando comparados aos concebidos naturalmente (10^a semana) e após estímulo hormonal (10^a e 15^a semanas). Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos, apesar de diferenças

metodológicas (REXHAIJ *et al.*, 2013; WATKINS *et al.*, 2007). Rexhaj e colaboradores (2013), relataram níveis elevados de PAS em camundongos selvagens (FVB e NMRI) machos com 12 a 14 semanas de idade, obtidos por estimulação ovariana seguida de FIV, comparados a animais concebidos naturalmente (REXHAIJ *et al.*, 2013). Nesse estudo, os autores aferiram a PAS por telemetria, uma técnica invasiva que necessita de cirurgia para implantação de um cateter na artéria carótida. O procedimento cirúrgico e o pós-operatório delicado podem submeter o animal a estresse. Embora a telemetria permita aferições contínuas (48 horas no estudo), registros prolongados não são adequados e a mortalidade decorrente de infecções é alta (DRÜEKE *et al.*, 2019; LUTHER *et al.*, 2019). A técnica de pletismografia de cauda, por sua vez, permite aferições em diferentes etapas da vida do animal e apresenta baixa mortalidade. Mas, mesmo sendo uma técnica não invasiva ela pode causar algum estresse decorrente da contenção e do aumento da temperatura (DRÜEKE *et al.*, 2019; LUTHER *et al.*, 2019).

Watkins e colaboradores (2007), demonstraram que camundongos (CBA X C57/BL6), machos e fêmeas, nascidos após estimulação ovariana, fertilização *in vivo* e cultivo embrionário *in vitro* (embriões em estágio de 2 células até blastocisto), com posterior transferência embrionária, apresentaram elevação da PAS quando comparados com animais nascidos de acasalamento natural (15^a e 21^a semanas). O mesmo estudo também revelou que a diferença nos níveis de PAS desaparecia quando a prole era oriunda de estimulação ovariana e fertilização *in vivo* seguida de transferência embrionária, sem o cultivo *in vitro*. Associando, portanto, a alteração na PAS ao estresse sofrido pelo embrião durante o cultivo *in vitro* (WATKINS *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a prole do grupo Estimulado foi obtida após estimulação ovariana e fertilização *in vivo*, seguida de transferência de embriões em estágio de 2 células, excluindo a necessidade de cultivo embrionário *in vitro* prolongado. Assim como no estudo de Watkins *et al.* (2007), os animais do grupo Estimulado não mostraram alteração nos níveis de pressão arterial quando comparados ao grupo Natural. Conforme descrito anteriormente, a elevação da PAS em nossa pesquisa foi observada na prole do grupo FIV Fresco. Esses animais foram concebidos após estimulação ovariana e FIV associada a um cultivo embrionário de aproximadamente 18 horas. Logo, não podemos dissociar o impacto da FIV e do cultivo embrionário sobre os níveis de PAS no grupo FIV fresco.

É importante ressaltar que a PAS dos machos do grupo FIV Fresco se mostrou elevada desde a primeira aferição. A elevação precoce da pressão arterial pode favorecer o desenvolvimento prematuro de doenças cardiovasculares, hipótese que precisa ser testada em estudos futuros que monitorem a prole por maiores períodos. Na comparação intra grupos, os machos dos grupos Natural e Estimulado apresentaram elevação da média da PAS com o passar

das semanas, igualando a PAS do grupo FIV Fresco na última semana. Assim como a maioria das doenças cardiovasculares, o risco de hipertensão aumenta com o avançar da idade e o acúmulo de fatores de risco, como obesidade e dislipidemias. As causas podem ser multifatoriais incluindo o enrijecimento e microlesões nos vasos sanguíneos, comprometimento de órgãos como coração e rins, além de fatores hormonais (BANEGAS *et al.*, 2017; CHRYSANT, 2019).

Outro dado interessante do nosso estudo foi que, diferente dos machos, as fêmeas não apresentaram alterações na PAS nas comparações intra e entre grupos. No artigo de Watkins e colaboradores (2007), apesar de a elevação da PAS no grupo com cultivo embrionário ser identificada em ambos os gêneros, as fêmeas apresentaram alterações apenas na 21ª semana, levando os autores, assim como nós, a questionar o mecanismo de regulação da PAS nas fêmeas. Após encontrarem aumento nos níveis séricos da enzima conversora de angiotensina e no peso dos rins, apenas nas fêmeas dos grupos tratados, os autores sugerem que a alteração da PAS em fêmeas esteja relacionada a fatores endócrinos e renais (WATKINS *et al.*, 2007). Um dos principais hormônios sexuais femininos (o estrogênio) atua na dilatação e na vasoconstrição. O estrogênio equilibra os níveis de renina e angiotensina I. A enzima conversora da angiotensina converte a angiotensina I em angiotensina II, que por sua vez é um potente agente vasoconstritor e indutor da proliferação da musculatura lisa vascular. A elevação dos níveis de angiotensina II pode estimular uma maior resistência vascular o que levaria ao aumento da PAS. Em mulheres na menopausa e em ratas ooforectomizadas há uma menor liberação de estrogênio que pode aumentar os riscos de hipertensão. Nesses casos o tratamento com estrogênio diminui a atividade da enzima conversora de angiotensina promovendo consequente redução dos níveis de angiotensina II e regulando a pressão arterial (DANTAS *et al.*, 2002; MOSCA *et al.*, 2004). Portanto, sugerimos que o estrogênio possa ter um papel protetor nas fêmeas, ainda em período fértil, auxiliando na regulação da PAS.

Com relação aos níveis séricos de glicose, na 16ª e 18ª semanas as fêmeas oriundas de FIV apresentaram aumento quando comparadas as fêmeas concebidas naturalmente ou após estimulação ovariana. Entre os machos o aumento da glicose em jejum foi observado no grupo FIV Fresco em comparação ao grupo Estimulado, na 16ª e 18ª semanas. O grupo Estimulado não apresentou um comportamento consistente dos níveis de glicose em jejum no decorrer das semanas. O estudo de Chen e colaboradores (2014), mostra resultados semelhantes. Nesse trabalho os autores compararam os níveis de glicose entre animais obtidos com o auxílio de estimulação ovariana seguida de FIV, estimulação ovariana e fertilização *in vivo* e animais concebidos naturalmente. Logo após o desmame a prole de cada grupo foi dividida, parte

recebeu dieta normal e parte dieta rica em gordura. Ao chegarem na 11^a semana de vida os níveis séricos de glicose em jejum foram aferidos por metodologia de tiras de dosagem. O grupo FIV apresentou hiperglicemia comparado aos animais provenientes de estimulação ovariana e concebidos naturalmente, independente da dieta consumida. Nesse estudo apenas camundongos (C57Bl/6) machos foram incluídos, impossibilitando a análise do comportamento da glicose nas fêmeas, além disso os níveis de glicose foram aferidos em um único momento (CHEN *et al.*, 2014).

Ceelen *et al.* (2008), relataram que crianças e adolescentes nascidas após FIV apresentaram níveis elevados de glicemia de jejum em comparação com controles, independentemente de fatores neonatais ou características dos pais (CEELEN *et al.*, 2008). Um estudo mais recente, relatou que os níveis de glicose em jejum eram maiores entre crianças de 5 a 6 anos concebidas por estimulação ovariana isolada ou associada a FIV ou ICSI em comparação com crianças concebidas naturalmente (PONTESILLI *et al.*, 2015). A revisão sistemática e metanálise de Guo e colaboradores incluiu sete estudos que avaliaram o perfil da glicose em 477 indivíduos nascidos após FIV-ICSI e 1.852 concebidos naturalmente. Os níveis de glicose em jejum foram comparáveis entre os grupos, mas os níveis de insulina em jejum estavam elevados na prole FIV-ICSI (GUO *et al.*, 2017). De forma geral, os estudos apoiam a hipótese de que a FIV altera o metabolismo da glicose e aumenta o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (CEELEN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2017; PONTESILLI *et al.*, 2015).

Trabalhos que investigaram o perfil lipídico na prole oriunda de técnicas de reprodução assistida não demonstraram achados consistentes. Pontesilli e colaboradores (2015), não encontraram diferenças nos níveis séricos de colesterol total e suas frações entre crianças concebidas naturalmente e após estimulação ovariana isolada ou associada a FIV ou ICSI. No entanto, os níveis de triglicérides estavam aumentados em crianças concebidas após o estímulo ovariano quando comparadas ao controle (PONTESILLI *et al.*, 2015). Sakka *et al.* (2010), descobriram que crianças oriundas de FIV tinham triglicérides significativamente mais elevados, mas não apresentavam diferenças nos valores de colesterol total, LDL e HDL (SAKKA *et al.*, 2010). No estudo de Cui *et al.* (2020), os níveis de LDL, HDL e triglicérides foram similares, enquanto, o nível de colesterol total estava diminuído em crianças concebidas após técnicas de reprodução assistida comparadas as concebidas naturalmente (CUI *et al.*, 2020). Na revisão sistemática e metanálise de Guo *et al.* (2017), cinco estudos avaliaram vários aspectos do metabolismo lipídico em 332 crianças concebidas por FIV-ICSI e 1.701 concebidas naturalmente. Os indivíduos de FIV-ICSI tinham colesterol LDL mais baixo enquanto seu

colesterol total, HDL e triglicérides eram comparáveis (GUO *et al.*, 2017).

Narapareddy e colaboradores (2022), publicaram recentemente um estudo com camundongos (machos e fêmeas) investigando os efeitos da FIV sobre o fígado e o metabolismo hepático. Como em nosso estudo, os autores avaliaram os desfechos propostos em diferentes momentos e separaram suas análises por sexo, ressaltando a importância de estudos sexo específicos e do acompanhamento ao longo da vida adulta. Em seu estudo as camundongos fêmeas nascidas após FIV apresentaram maiores níveis de colesterol total do que o grupo controle, nas semanas 12, 16, 20 e 24. Nenhuma diferença foi observada com relação aos níveis de triglicérides. Machos nascidos após FIV, por sua vez, mostraram aumento nos níveis de triglicérides nas semanas 12 e 20 com relação aos animais concebidos naturalmente e não apresentaram diferenças nos níveis de colesterol (NARAPAREDDY *et al.*, 2021). No entanto, os autores não avaliaram animais nascidos de estimulação ovariana e fertilização *in vivo*.

Em nosso estudo as fêmeas do grupo FIV Fresco apresentaram maiores níveis de triglicérides na 16^a semana e maiores níveis de colesterol total na 21^a semana quando comparadas ao grupo Natural. Nas fêmeas do grupo Estimulado observamos maiores níveis séricos de triglicérides nas semanas 16 e 18 e maiores níveis de colesterol na 21^a semana comparadas ao grupo Natural. Os machos não apresentaram alterações nos níveis séricos de triglicérides. Já os níveis de colesterol total do grupo FIV Fresco estavam menores nas semanas 16 e 18 e maiores na 21^a semana quando comparados ao grupo Natural. Os machos do grupo Estimulado apresentaram menores níveis de colesterol total na 18^a semana e um aumento nos níveis na 21^a semana com relação ao grupo Natural.

Ao analisarmos o ganho de peso da prole verificamos um aumento do peso nos machos e fêmeas dos grupos Estimulado e FIV Fresco em relação aos animais concebidos naturalmente. O grupo Estimulado apresenta ainda maior peso que o grupo FIV Fresco, mesmo que em um número reduzido de semanas. Não observamos diferenças entre os grupos com relação ao peso absoluto e relativo do músculo gastrocnêmio. No entanto, o peso da gordura abdominal, absoluta e relativa, no grupo Estimulado foi maior quando comparada aos grupos Natural (fêmeas e machos) e FIV Fresco (fêmeas).

Um estudo em camundongos sugere que os componentes dos meios de cultivo embrionário utilizados nas técnicas de reprodução assistida podem afetar o peso e a adiposidade da prole adulta (SJÖBLOM *et al.*, 2005). Bezerros concebidos por FIV apresentaram maior ingestão de alimentos e taxa de crescimento em comparação com aqueles concebidos por inseminação artificial, mesmo quando apresentavam peso ao nascer semelhantes (RÉRAT *et al.*, 2005). Em crianças nascidas após FIV, observou-se um padrão parecido. Ao final do

período neonatal e início da primeira infância, elas apresentaram uma recuperação significativa do crescimento, associada à adiposidade corporal de longo prazo, manifestada pelo aumento das dobras cutâneas (CEELEN *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que animais nascidos em pequenas ninhadas, de 3 a 4 filhotes, apresentam aumento de peso corporal e adiposidade na idade adulta comparados a filhotes amamentados em ninhadas de 6 a 10 indivíduos. O aumento do peso está associado a maior ingestão de alimentos durante a lactação (PARRA-VARGAS *et al.*, 2020). A publicação mais recente, que analisou a prole de camundongos provenientes de estimulação ovariana seguida de FIV, adotou uma estratégia para tentar controlar o efeito do tamanho da ninhada no fenótipo metabólico dos adultos. Em ninhadas com menos de 10 indivíduos, recém nascidos adotivos eram acrescidos a ninhada até completar 10 filhotes, mantendo assim um tamanho total médio. Mesmo adotando essa estratégia delicada, os autores observaram maior peso corporal nas fêmeas e maior porcentagem de gordura corporal nos machos do grupo FIV quando comparados aos animais concebidos naturalmente (NARAPAREDDY *et al.*, 2021). O estudo não avaliou animais concebidos após estimulação ovariana e fertilização *in vivo*.

Apesar de estudos em humanos mostrarem que a maioria dos descendentes concebidos após FIV sejam, geralmente, saudáveis a curto e médio prazo, nosso trabalho e a literatura recente sugerem que os indivíduos que desenvolvem resultados metabólicos adversos podem não fazê-lo até a idade adulta (NARAPAREDDY *et al.*, 2021). Portanto, uma tarefa importante na otimização das técnicas de reprodução assistida é identificar biomarcadores de saúde a longo prazo e acompanhar a prole ao longo da vida.

Nosso estudo apresentou taxas de sobrevivência oocitária após vitrificação e aquecimento excelentes (96%). Taxas compatíveis com resultados obtidos por profissionais altamente capacitados (KOHAYA *et al.*, 2013; MOCHIDA *et al.*, 2014; SUZUKI *et al.*, 1996). Além disso, as taxas de fertilização e formação de blastocistos dos grupos FIV Fresco (76% e 60% respectivamente) e Vitrificado (81% e 50% respectivamente) não apresentaram diferenças significativas. No entanto, algumas dificuldades metodológicas e limitações do estudo impossibilitaram a obtenção da prole do grupo Vitrificado.

Devido ao enrijecimento da zona pelúcida ocasionado pelo processo de vitrificação e aquecimento oocitário, optamos por utilizar a técnica de PZD no estudo, visando aumentar as taxas de fertilização após a vitrificação e aquecimento. A técnica de PZD foi desenvolvida por Malter e colaboradores em 1989 como o objetivo de aumentar as taxas de fertilização nos casos de infertilidade relacionada a fatores masculino severos. Na técnica o oócito é fixado por uma micropipeta denominada *holding* e uma micro agulha é inserida na zona pelúcida. Essa,

atravessa o espaço perivitelínico e alcança o lado oposto da zona pelúcida, sem perfurar o oolema. Um movimento horizontal da micro agulha de PZD é realizado até que o oócito se desligue desta confirmando a dissecação (MALTER *et al.*, 1989). Em 1997, Nakagata e colaboradores, mostraram que a técnica de PZD em oócitos desnudados de camundongos C57BL/6J aumentou as taxas de sucesso na FIV de 12% para 73% (NAKAGATA *et al.*, 1997). Dois anos mais tarde, An e colaboradores (1999) reportaram que a percentagem de embriões de camundongo ICR em estágio de duas células derivados de FIV após PZD que se desenvolveram até estágio de blastocisto é a mesma de oócitos com zona intacta (AN *et al.*, 1999). Um exemplo mais recente, descrito por Macas *et al.* (2011), mostrou que a percentagem de oócitos humanos que se desenvolveram até estágio de blastocisto após FIV é a mesma entre oócitos com zona intacta e com a zona pelúcida parcialmente aberta utilizando laser (*assisted hatching*) (MACAS *et al.*, 2011). Odawara e Lopata (1989), também reportaram que a abertura da zona não danifica os oócitos ou reduz seu potencial de desenvolvimento embrionário normal, nem aumenta a incidência de ativação partenogenética ou poliespermia em modelo murino (ODAWARA *et al.*, 1989).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (VIANA, 2018), demonstraram resultados expressivamente melhores (taxas de fertilização e formação de blastocistos) com o uso da técnica de PZD com adaptações, conforme descrito por Nakagata, em oócitos murinos submetidos a vitrificação e aquecimento (NAKAGATA, 2011). Sem o uso desta técnica, as taxas de fertilização e formação de blastocistos eram muito baixas em oócitos previamente vitrificados, o que impossibilitaria o uso do modelo murino em estudos investigando o potencial efeito da vitrificação e aquecimento oocitário em diferentes desfechos. Como a técnica seria necessária para facilitar a fertilização no grupo Vitrificado, e em nosso laboratório experimental não dispomos de equipamento para realização de ICSI ou de PZD conforme descrito por Malter e colaboradores (1989), optamos por utilizar a metodologia conforme descrito por Nakagata (2011) e realizá-la também no grupo FIV Fresco, de modo a evitar o viés da técnica entre os grupos analisados.

Não dispomos de um equipamento de alta resolução para avaliação dos oócitos após a realização do PZD, o que torna a verificação do rompimento da zona pelúcida subjetiva. Porém, ao analisarmos as taxas de fertilização encontradas nas replicatas nos grupos FIV Fresco e Vitrificado, observamos que estão acima das encontradas na literatura (KOHAYA *et al.*, 2013; WOODS *et al.*, 2014). Da mesma forma, as taxas de nascidos vivos no grupo FIV Fresco são semelhantes às descritas na literatura para oócitos submetidos a FIV sem PZD (KOHAYA *et al.*, 2011). Esses dados mostram que o PZD não parece ser um problema, pelo menos, quando

os embriões transferidos são provenientes de oócitos frescos submetidos a FIV após o PZD. Todavia, não há estudos na literatura avaliando as taxas de nascidos vivos após transferência de embriões oriundos de oócitos murinos vitrificados/aquecidos e submetidos a FIV após o PZD conforme empregado no presente estudo, com o intuito de desenvolver um modelo murino para investigação do papel da vitrificação oocitária na prole ao longo da vida. As baixas taxas de nascidos vivos após transferência de embriões no grupo Vitrificado (7%), quando comparadas ao grupo FIV Fresco (31%) nos faz hipotetizar que os oócitos murinos submetidos a vitrificação/aquecimento possam ser muito frágeis e, conseqüentemente, mais sensíveis ao PZD do que os oócitos frescos, com conseqüente comprometimento do seu potencial de desenvolvimento e implantação. Para testar esta hipótese, comparar as taxas de nascidos vivos após transferência de embriões oriundos de oócitos murinos vitrificados/aquecidos submetidos a FIV com PZD modificado *versus* a ICSI é mandatória.

A dificuldade na obtenção de fêmeas receptoras com tampão vaginal e ampola visível teve grande impacto no estudo. Das 15 oportunidades de transferência de embriões do grupo Vitrificado, sete (46%) não foram possíveis devido a ausência de fêmeas receptoras. Essa dificuldade impactou diretamente na obtenção de nascidos vivos do grupo Vitrificado. Além disso, das oito fêmeas que receberam a transferência embrionária, apenas três engravidaram e deram à luz, no máximo, dois filhotes, curiosamente machos. Na tentativa de melhorarmos estas taxas, procuramos a opinião e o auxílio de diversos profissionais, nacionais e internacionais, com experiência na área. Todos nos relataram a dificuldade em se obter prole oriunda de oócitos murinos vitrificados. Na literatura, encontramos poucos artigos que utilizaram a vitrificação oocitária seguida de FIV para obtenção de prole neste modelo. Watanabe e colaboradores (2013), vitrificaram os oócitos ainda com as células do cumulus o que auxiliou no processo de FIV. Sua taxa de gestação foi de 100% e as taxas de nascidos vivos variaram de 12 a 37%. A grande maioria dos estudos que utilizam a vitrificação oocitária como metodologia de criopreservação, realizam a ICSI para fertilização e, como citado anteriormente, infelizmente não dispomos do micro manipulador necessário para essa técnica. Kohaya et al. (2013) utilizou a ICSI como metodologia de fertilização para oócitos vitrificados e obteve taxas surpreendentemente altas de gestação (100%) e nascidos vivos (51%). A grande maioria dos estudos não reporta as taxas de gravidez e/ou nascidos vivos após transferência de embriões oriundos de oócitos murinos vitrificados e aquecidos, sendo que nenhum deles descreve em detalhes as metodologias utilizadas para vitrificação/aquecimento, fertilização e transferência embrionária (HUO *et al.*, 2020; KOHAYA *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2013). Desta forma, não é possível compararmos os nossos achados com os de outros estudos.

Considerando que, para que o modelo murino possa ser utilizado como potencial modelo translacional para humanos, o mesmo deve minimamente mimetizar os achados em humanos, em que as taxas de gestação e nascidos vivos após transferência de embriões provenientes de oócitos frescos e vitrificados/aquecidos é similar, especialmente em mulheres jovens (RIENZI *et al.*, 2017), a combinação das técnicas de vitrificação/aquecimento, PZD e FIV em murinos não parece ser adequada. Como apontado acima, é necessário avaliar se com a utilização da ICSI, ao invés da FIV após PZD, as taxas de nascidos vivos no grupo Vitrificado se tornariam similares as do grupo FIV Fresco. Caso isto ocorra, o modelo terá potencial translacional, o que merece ser avaliado em estudos futuros.

Apesar dos avanços trazidos pelo nosso estudo e da vasta utilização do modelo murino em protocolos de reprodução assistida é importante ressaltar que este é um modelo experimental com comportamento e metabolismo próprios e dados translacionais devem ser interpretados com cautela.

6 CONCLUSÕES

Esse é o primeiro estudo com monitoramento longitudinal de PAS, variáveis metabólicas laboratoriais (níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides) e clínicas (ganho de peso, gordura abdominal e músculo gastrocnêmio) na prole adulta de camundongos, machos e fêmeas, concebidos após estimulação ovariana seguida de fertilização *in vivo* e estimulação ovariana seguida de FIV.

A prole adulta obtida com o auxílio de técnicas de reprodução assistida apresentou aumento do peso corporal e alterações nos níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicérides. Os machos do grupo FIV Fresco apresentaram maiores valores de PAS quando comparados aos grupos Natural e Estimulado. Os machos do grupo Estimulado apresentaram maior peso da gordura abdominal do que o grupo Natural. Enquanto as fêmeas do grupo Estimulado possuíam peso da gordura abdominal maior que as fêmeas dos grupos Natural e FIV Fresco. Em conjunto, nossos achados sugerem que a prole oriunda de estímulo ovariano associado ou não a FIV possa apresentar fatores de risco para doenças cardiovasculares, o que precisa ser melhor investigado em estudos futuros. Esse estudo sugere que o estímulo ovariano e a FIV podem promover modificações embrionárias passíveis de favorecer alterações metabólicas na idade adulta. Além disso, destacamos a necessidade de monitoramento longitudinal e sexo específico dos indivíduos concebidos com o auxílio de técnicas de reprodução assistida.

Os resultados de nosso trabalho podem estimular futuras pesquisas que visem compreender os mecanismos envolvidos nas alterações aqui observadas e estimular a otimização dos protocolos de estimulação ovariana e das técnicas utilizadas nos laboratórios de reprodução assistida visando minimizar potenciais impactos deletérios na prole. Esperamos que estes achados incentivem estudos de base populacional a investigar a saúde da prole proveniente de reprodução assistida a partir da terceira década de vida.

Por fim, observamos que a combinação das técnicas de vitrificação/aquecimento oocitário, PZD e FIV não apresentou taxas de gestação e nascidos vivos satisfatórias. Portanto, a obtenção de prole murina utilizando a combinação dessas técnicas não parece ser eficiente, de modo que o modelo aqui avaliado não se mostrou um adequado modelo translacional para investigação do impacto da vitrificação oocitária na prole.

REFERÊNCIAS

- AN, T. Z. *et al.* Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. **Cryobiology**, v.38, n. 1, p. 27-34, Feb 1999. 10.1006/cryo.1998.2141.
- ASRM. Planned oocyte cryopreservation for women seeking to preserve future reproductive potential: an Ethics Committee opinion. **Fertil Steril**, v.110, n. 6, p. 1022-1028, Nov 2018. 10.1016/j.fertnstert.2018.08.027.
- ASRM. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. **Fertil Steril**, v.99, n. 1, p. 37-43, Jan 2013. 10.1016/j.fertnstert.2012.09.028.
- BANEGAS, J. R. *et al.* [Epidemiology of hypertension]. **Hipertens Riesgo Vasc**, v.34 Suppl 2, p. 2-4, 2017. 10.1016/s1889-1837(18)30066-7.
- BARBERET, J. *et al.* What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? **Clin Epigenetics**, v.12, n. 1, p. 121, Aug 10 2020. 10.1186/s13148-020-00911-8.
- BARSHA, G. *et al.* Sex- and age-related differences in arterial pressure and albuminuria in mice. **Biol Sex Differ**, v.7, p. 57, 2016. 10.1186/s13293-016-0110-x.
- BAUMANN, C. G. *et al.* The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Mol Reprod Dev**, v.74, n. 10, p. 1345-1353, Oct 2007. 10.1002/mrd.20604.
- BRAMBILLASCA, F. *et al.* The current challenges to efficient immature oocyte cryopreservation. **J Assist Reprod Genet**, v.30, n. 12, p. 1531-1539, Dec 2013. 10.1007/s10815-013-0112-0.
- CEELEN, M. *et al.* Growth during infancy and early childhood in relation to blood pressure and body fat measures at age 8-18 years of IVF children and spontaneously conceived controls born to subfertile parents. **Hum Reprod**, v.24, n. 11, p. 2788-2795, Nov 2009. 10.1093/humrep/dep273.
- CEELEN, M. *et al.* Body composition in children and adolescents born after in vitro fertilization or spontaneous conception. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n. 9, p. 3417-3423, Sep 2007. 10.1210/jc.2006-2896.
- CEELEN, M. *et al.* Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, n. 5, p. 1682-1688, May 2008. 10.1210/jc.2007-2432.
- CHEN, M. *et al.* Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF. **Diabetes**, v.63, n. 10, p. 3189-3198, Oct 2014. 10.2337/db14-0103.
- CHRISTOU-KENT, M. *et al.* Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte. **Cells**, v.9, n. 3, Mar 9 2020. 10.3390/cells9030662.
- CHRYSANT, S. G. Pathophysiology and treatment of obesity-related hypertension. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v.21, n. 5, p. 555-559, May 2019. 10.1111/jch.13518.

COBO, A. *et al.* Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. **Fertil Steril**, v.108, n. 3, p. 491-497 e493, Sep 2017. 10.1016/j.fertnstert.2017.06.024.

CUI, L. *et al.* Increased risk of metabolic dysfunction in children conceived by assisted reproductive technology. **Diabetologia**, v.63, n. 10, p. 2150-2157, Oct 2020. 10.1007/s00125-020-05241-1.

DA LUZ, C. M. *et al.* The Impact of Oocyte Vitrification on Offspring: a Systematic Review. **Reprod Sci**, v.29, n. 11, p. 3222-3234, Nov 2022. 10.1007/s43032-022-00868-4.

DANTAS, A. P. *et al.* In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.39, n. 2 Pt 2, p. 405-411, Feb 2002. 10.1161/hy0202.102993.

DE GEYTER, C. *et al.* ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: The European IVF-monitoring Consortium (EIM) for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). **Hum Reprod**, v.33, n. 9, p. 1586-1601, Sep 1 2018. 10.1093/humrep/dey242.

DONJACOUR, A. *et al.* In vitro fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model. **Biol Reprod**, v.90, n. 4, p. 80, Apr 2014. 10.1095/biolreprod.113.113134.

DRÜEKE, T. B. *et al.* Blood pressure measurement in mice: tail-cuff or telemetry? **Kidney Int**, v.96, n. 1, p. 36, Jul 2019. 10.1016/j.kint.2019.01.018.

FAUQUE, P. *et al.* [Parental imprinting related to Assisted Reproductive Technologies]. **Gynecol Obstet Fertil**, v.36, n. 11, p. 1139-1146, Nov 2008. 10.1016/j.gyobfe.2008.08.007.

FEUER, S. K. *et al.* ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. **Mol Hum Reprod**, v.19, n. 4, p. 189-204, Apr 2013. 10.1093/molehr/gas066.

FEUER, S. K. *et al.* Use of a mouse in vitro fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis. **Endocrinology**, v.155, n. 5, p. 1956-1969, May 2014. 10.1210/en.2013-2081.

FRECKMANN, G. *et al.* System accuracy evaluation of 43 blood glucose monitoring systems for self-monitoring of blood glucose according to DIN EN ISO 15197. **J Diabetes Sci Technol**, v.6, n. 5, p. 1060-1075, Sep 1 2012. 10.1177/193229681200600510.

GLUJOVSKY, D. *et al.* Vitrification versus slow freezing for women undergoing oocyte cryopreservation. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, p. CD010047, Sep 5 2014. 10.1002/14651858.CD010047.pub2.

GUO, X. Y. *et al.* Cardiovascular and metabolic profiles of offspring conceived by assisted reproductive technologies: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**, v.107, n. 3, p. 622-631 e625, Mar 2017. 10.1016/j.fertnstert.2016.12.007.

HODGES C. A. et al. Experimental evidence that changes in oocyte growth influence meiotic chromosome segregation. **Hum Reprod.** 2002 May;17(5):1171-80. doi: 10.1093/humrep/17.5.1171. PMID: 11980735.

HUNTINGTON PRÓ-CRIAR EUGIN GROUP. **Gravidez para casais homoafetivos: quais as possibilidades?** Online, 2022. Disponível em: <https://http://www.procriar.com.br/blogprocriar/gravidez-para-casais-homoafetivos-quais-as-possibilidades/>. Acesso em: 08/26/2022.

HUO, Y. *et al.* Effects of oocyte vitrification on the behaviors and physiological indexes of aged first filial generation mice. **Cryobiology**, v.95, p. 20-28, Aug 2020. 10.1016/j.cryobiol.2020.06.012.

JOHNSON, M. H. A short history of in vitro fertilization (IVF). **Int J Dev Biol**, v.63, n. 3-4-5, p. 83-92, 2019. 10.1387/ijdb.180364mj.

KLIP, H. *et al.* OMEGA-project group. Risk of cancer in the offspring of women who underwent ovarian stimulation for IVF. **Hum Reprod.** 2001 Nov;16(11):2451-8. doi: 10.1093/humrep/16.11.2451. PMID: 11679537.

KOHAYA, N. *et al.* High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. **J Reprod Dev**, v.57, n. 6, p. 675-680, Dec 2011. 10.1262/jrd.11-066h.

KOHAYA, N. *et al.* Generation of live offspring from vitrified mouse oocytes of C57BL/6J strain. **PLoS One**, v.8, n. 3, p. e58063, 2013. 10.1371/journal.pone.0058063.

LEI, T. *et al.* Effect of mouse oocyte vitrification on mitochondrial membrane potential and distribution. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v.34, n. 1, p. 99-102, Feb 2014. 10.1007/s11596-014-1238-8.

LIU, X. J. *et al.* Effect of vitrification of mouse oocyte on the behavior of adult offspring. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.169, n. 2, p. 279-282, Jul 2013. 10.1016/j.ejogrb.2013.05.004.

LUTHER, J. M. *et al.* Under pressure-how to assess blood pressure in rodents: tail-cuff? **Kidney Int**, v.96, n. 1, p. 34-36, Jul 2019. 10.1016/j.kint.2018.12.034.

MACAS, E. *et al.* Vitrification of human single pronuclear oocytes following two approaches to polar body biopsy. **Reprod Biomed Online**, v.22, n. 4, p. 376-381, Apr 2011. 10.1016/j.rbmo.2011.01.004. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324745>

MAHSOUDI, B. *et al.* Assessment of the long-term and transgenerational consequences of perturbing preimplantation embryo development in mice. **Biol Reprod**, v.77, n. 5, p. 889-896, Nov 2007. 10.1095/biolreprod.106.057885.

MALTER, H. E. *et al.* Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. **Fertil Steril**, v.51, n. 1, p. 139-148, Jan 1989. 10.1016/s0015-0282(16)60443-0.

MANDAWALA, A. A. *et al.* Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v.86, n. 7, p. 1637-1644, Oct 15 2016. 10.1016/j.theriogenology.2016.07.018.

MEEHAN, W. P. *et al.* Hyperglycemia and fight-flight behavior in nondiabetic and diabetic mice. **Physiol Behav**, v.41, n. 5, p. 397-403, 1987. 10.1016/0031-9384(87)90072-2.

MOCHIDA, K. *et al.* Devising assisted reproductive technologies for wild-derived strains of mice: 37 strains from five subspecies of *Mus musculus*. **PLoS One**, v.9, n. 12, p. e114305, 2014. 10.1371/journal.pone.0114305.

MOSCA, L. *et al.* Tracking women's awareness of heart disease: an American Heart Association national study. **Circulation**, v.109, n. 5, p. 573-579, Feb 10 2004. 10.1161/01.cir.0000115222.69428.c9.

NAKAGATA, N. **Reproductive Engineering Techniques in Mice Technical Manual**. Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University.: 2011.

NAKAGATA, N. **Reproductive Engineering Techniques in Mice; Technical Manual**. 2nd ed. Tokyo: Cosmo Bio Co, LTDA, 2015.

NAKAGATA, N. *et al.* Positive effect of partial zona-pellucida dissection on the in vitro fertilizing capacity of cryopreserved C57BL/6J transgenic mouse spermatozoa of low motility. **Biol Reprod**, v.57, n. 5, p. 1050-1055, Nov 1997. 10.1095/biolreprod57.5.1050.

NARAPAREDDY, L. *et al.* Sex-specific effects of in vitro fertilization on adult metabolic outcomes and hepatic transcriptome and proteome in mouse. **FASEB J**, v.35, n. 4, p. e21523, Apr 2021. 10.1096/fj.202002744R.

ODAWARA, Y. *et al.* A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentrations: a mouse model. **Fertil Steril**, v.51, n. 4, p. 699-704, Apr 1989. 10.1016/s0015-0282(16)60624-6. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924938>

OKTAY, K. *et al.* Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. **Fertil Steril**, v.86, n. 1, p. 70-80, Jul 2006. 10.1016/j.fertnstert.2006.03.017.

PARRA-VARGAS, M. *et al.* Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. **Cell Metab**, v.32, n. 3, p. 334-340, Sep 1 2020. 10.1016/j.cmet.2020.07.014.

PINCUS, G. *et al.* Can Mammalian Eggs Undergo Normal Development in Vitro? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.20, n. 2, p. 121-122, Feb 1934. 10.1073/pnas.20.2.121.

PONTESILLI, M. *et al.* Subfertility and assisted reproduction techniques are associated with poorer cardiometabolic profiles in childhood. **Reprod Biomed Online**, v.30, n. 3, p. 258-267, Mar 2015. 10.1016/j.rbmo.2014.11.006.

RÉRAT, M. *et al.* In vitro embryo production: growth performance, feed efficiency, and hematological, metabolic, and endocrine status in calves. **J Dairy Sci**, v.88, n. 7, p. 2579-2593,

Jul 2005. 10.3168/jds.S0022-0302(05)72934-9.

REXHAI, E. *et al.* Mice generated by in vitro fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span. **J Clin Invest**, v.123, n. 12, p. 5052-5060, Dec 2013. 10.1172/jci68943.

RIENZI, L. *et al.* Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. **Hum Reprod Update**, v.23, n. 2, p. 139-155, Mar 1 2017. 10.1093/humupd/dmw038.

RINAUDO, P. *et al.* Fetal programming and metabolic syndrome. **Annu Rev Physiol**, v.74, p. 107-130, 2012. 10.1146/annurev-physiol-020911-153245.

ROSENTHAL, N. *et al.* The mouse ascending: perspectives for human-disease models. **Nat Cell Biol**, v.9, n. 9, p. 993-999, Sep 2007. 10.1038/ncb437.

SAKKA, S. D. *et al.* Absence of insulin resistance and low-grade inflammation despite early metabolic syndrome manifestations in children born after in vitro fertilization. **Fertil Steril**, v.94, n. 5, p. 1693-1699, Oct 2010. 10.1016/j.fertnstert.2009.09.049.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de camundongos. . **In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação.**, n. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 115-118, 2002.

SANTOS, M. A. *et al.* The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. **Reproduction**. 2010 Jan;139(1):23-34. doi: 10.1530/REP-09-0187. PMID: 19710204.

SCHERRER, U. *et al.* Systemic and pulmonary vascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. **Circulation**, v.125, n. 15, p. 1890-1896, Apr 17 2012. 10.1161/circulationaha.111.071183.

SJÖBLOM, C. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis. **Endocrinology**, v.146, n. 5, p. 2142-2153, May 2005. 10.1210/en.2004-1260.

SMITH, G. D. *et al.* Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. **Fertil Steril**, v.94, n. 6, p. 2088-2095, Nov 2010. 10.1016/j.fertnstert.2009.12.065.

STOKER, B. **Dracula**. Rio de Janeiro: Archibald Constable and Company, 1897.

SUZUKI, O. *et al.* Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. **Reprod Fertil Dev**, v.8, n. 6, p. 975-980, 1996. 10.1071/rd9960975.

VAZ, S. **Colecionador de pedras**. São Paulo: Global Editora, 2021.

VERMEIDEN, J. P. *et al.* Are imprinting disorders more prevalent after human in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection? **Fertil Steril**, v.99, n. 3, p. 642-651, Mar 1 2013. 10.1016/j.fertnstert.2013.01.125.

VIANA, I. **Suplementação lipídica e antioxidante na vitrificação de oócitos murinos: impacto na qualidade oocitária e embrionária.** Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.: 2018.

WATANABE, H. *et al.* Efficient production of live offspring from mouse oocytes vitrified with a novel cryoprotective agent, carboxylated ϵ -poly-L-lysine. **PLoS One**, v.8, n. 12, p. e83613, 2013. 10.1371/journal.pone.0083613.

WATKINS, A. J. *et al.* Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, n. 13, p. 5449-5454, Mar 27 2007. 10.1073/pnas.0610317104.

WHITTINGHAM, D. G. Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature**, v.220, n. 5167, p. 592-593, Nov 9 1968. 10.1038/220592a0.

WILDE, E. *et al.* Tail-Cuff Technique and Its Influence on Central Blood Pressure in the Mouse. **J Am Heart Assoc**, v.6, n. 6, Jun 2017. 10.1161/JAHA.116.005204. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28655735>

WOODS, S. E. *et al.* Laser-assisted in vitro fertilization facilitates fertilization of vitrified-warmed C57BL/6 mouse oocytes with fresh and frozen-thawed spermatozoa, producing live pups. **PLoS One**, v.9, n. 3, p. e91892, 2014. 10.1371/journal.pone.0091892. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24618785>

WYNS, C. *et al.* ART in Europe, 2017: results generated from European registries by ESHRE. **Hum Reprod Open**, v.2021, n. 3, p. hoab026, 2021. 10.1093/hropen/hoab026.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comitê de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*O impacto da vitrificação de óocitos murinos na prole: epigenética, fertilidade e comorbidades*”, registrado com o número **107/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 25 de setembro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 77 camundongos C57Bl 6 fêmeas, pesando 23g, 18 camundongos C57Bl 6 machos pesando 23g; 30 camundongos C57Bl 6 machos pesando 2g e 30 camundongos C57Bl 6 fêmeas, pesando 2g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 25/09/2017 a 23/07/2021.

We certify that the Protocol n° 107/2017, entitled “*Vitrification's impact of the murine oocytes in the offspring: epigenetics, fertility and comorbidity*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/25/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 77 female C57Bl 6 mice weighing 23g; 18 male C57Bl 6 mice weighing 23g; 30 male C57Bl/6 mice weighing 2g and 30 female C57Bl/6 mice weighing 2g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 07/23/2021.

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA-FMRP – USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA
FMRP-USP
Comitê de Ética no Uso de Animais
Replacement/Reduction/Refinement

DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número 107/2017 sobre o projeto intitulado “*O impacto da vitrificação de oócitos murinos na prole: epigenética, fertilidade e comorbidades*”, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Andrea de Albuquerque Salles Navarro**, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de outubro de 2018.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 107/2017, entitled “*Vitrification's impact of the murine oocytes in the offspring: epigenetics, fertility and comorbidities*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/29/2018.

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA – FMRP – USP

ANEXO B

Produção relacionada a tese – Publicada

Reproductive Sciences
<https://doi.org/10.1007/s43032-022-00868-4>

REPRODUCTIVE BIOLOGY: REVIEW (INVITED)



The Impact of Oocyte Vitrification on Offspring: a Systematic Review

Caroline M. Da Luz^{1,2} · Marília A. Caetano^{1,2} · Thalita S. Berteli^{1,2} · Alessandra A. Vireque³ ·
Paula A. Navarro^{1,2}

Received: 9 October 2021 / Accepted: 18 January 2022
© Society for Reproductive Investigation 2022

Abstract

Oocyte vitrification is a widespread and well-established assisted reproduction technique that has enabled some patient groups to obtain clinical results equivalent to those using fresh oocytes. However, as the number of babies born from vitrified oocytes has increased, so has the discussion regarding the method's safety for the offspring. Cryogenic oocyte damage caused by chemical, mechanical, and thermal stress has raised concern. In this systematic review, we asked the question of whether oocyte vitrification impacts offspring health. From 2007 to 2021, 13 studies were included in the analysis. All studies were observational and presented neonatal outcomes. A total of 4,159 babies were analyzed. Data from these studies were used to assess the following outcomes: multiple pregnancies, cesarean section, gestational age at delivery, the number of live births, birth weight, Apgar scores, congenital anomalies, and baby health. The most extended follow-ups evaluated children until 1, 2, and 6 years of age. According to the evidence appraised in this systematic review, vitrification seems to be a safe method for oocyte cryopreservation and child health, at least in the short term. Nevertheless, there is an urgent need for additional long-term data results from big databases and also for randomized controlled trials to improve the levels of evidence.