



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RUAN DA CRUZ PAULINO

**APLICAÇÃO DE PROTÓTIPO DE VIBRAÇÕES SONORAS DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS BOVINOS (*Bos taurus*): UM ESTUDO
PRELIMINAR**

MOSSORÓ

2023

RUAN DA CRUZ PAULINO

**APLICAÇÃO DE PROTÓTIPO DE VIBRAÇÕES SONORAS DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS BOVINOS (*Bos taurus*): UM ESTUDO
PRELIMINAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

MOSSORÓ

2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

PP328 Paulino, Ruan .
a Aplicação de protótipo de vibrações sonoras
 durante a maturação in vitro (MIV) de oócitos
 bovinos (bos taurus): um estudo preliminar / Ruan
 Paulino. - 2023.
 52 f. : il.

 Orientador: Marcelo Bezerra.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2023.

 1. Vibração. 2. Oócito. 3. Produção In Vitro de
embriões. 4. Bovinos. I. Bezerra, Marcelo ,
orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

RUAN DA CRUZ PAULINO

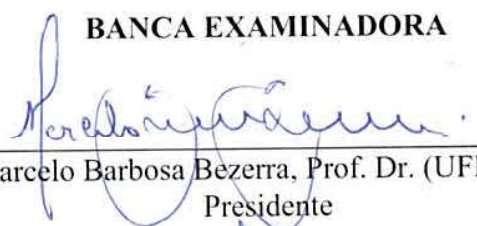
**APLICAÇÃO DE PROTÓTIPO DE VIBRAÇÕES SONORAS DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS BOVINOS (*Bos taurus*): UM
ESTUDO PRELIMINAR**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

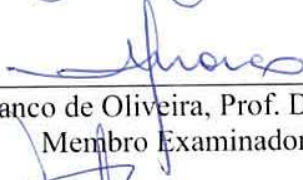
Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Defendida em: 29 / 05 / 2023.

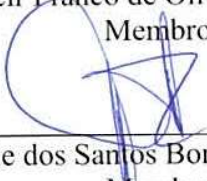
BANCA EXAMINADORA



Marcelo Barbosa Bezerra, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente



Moacir Franco de Oliveira, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Cibele dos Santos Borges, Prof^a. Dr^a. (UFERSA)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RUAN DA CRUZ PAULINO – Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (2019). Realizou Residência Médica no Programa de Sanidade de Ruminantes (2019-2021) na Clínica de Bovinos de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Atualmente é mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de mestrado desenvolveu pesquisa com Inovações Tecnológicas e Produção *In Vitro* de Embriões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais: Antônio Rildo Domingos Paulino e Antônia Célia da Cruz Paulino, pelo esforço para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e meus irmãos: Ramon da Cruz Paulino, Régis da Cruz Paulino e Renan da Cruz Paulino, pelo exemplo e incentivo. Agradeço em especial ao meu irmão Renan, pelo apoio gráfico e estatístico.

À minha amiga e namorada, Cibelle Martins Uchôa de Almeida, por todo amor e ânimo nos momentos difíceis. Amo você.

Ao meu orientador, Marcelo Barbosa Bezerra, pelos ensinamentos, paciência e acolhimento. Sua orientação vai além das paredes do laboratório.

Aos companheiros, que fazem parte do Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais: Beatriz Dantas Fernandes, Emanuel Lucas Bezerra Rocha, Danilo Lourenço de Albuquerque, Deusimar Fernandes da Silva, Marcos Vicnicius Lima da Silva, Daniel Kleber Bronzo e Rafael Kleber Bronzo. Agradeço em especial aos irmãos Daniel e Rafael, pela elaboração do protótipo que foi o principal instrumento da pesquisa e a amiga Beatriz, que foi além do que podia e nunca mediu esforços para ajudar.

À banca examinadora, Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira e prof^a. Dr^a. Cibeles dos Santos Borges pelas contribuições e pelo exemplo de profissionalismo, sou um grande admirador.

A prof^a. Dr^a. Alexsandra Fernandes Pereira e Leonardo Vitorino Costa de Aquino, pela ajuda nas avaliações.

Aos funcionários do abatedouro, pela atenção e fornecimento do material de pesquisa, foram imprescindíveis.

Agradeço a CAPES e a Universidade Federal Rural do Semi-Árido, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por me proporcionar a vivência da pesquisa. Parabéns a todos que fazem a pesquisa acontecer, é um desafio enorme.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na minha formação o meu muito obrigado, só estou colocando meu nome em um trabalho desenvolvido por todos nós.

E vou viver as coisas novas
Que também são boas
O amor, humor das praças
Cheias de pessoas
Agora eu quero tudo
Tudo outra vez

Belchior

RESUMO

O efeito estimulante da vibração em sistemas vivos desempenha um papel relevante na transdução mecânica, essencial para o desenvolvimento celular. No intuito de aumentar a taxa de sucesso da Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE), o uso de vibrações de baixa frequência durante a Maturação *In Vitro* (MIV) vem se mostrando promissor. Nesse contexto, objetivou-se avaliar validar um dispositivo que emite frequências sonoras e o efeito destas vibrações durante a maturação de oócitos bovinos. Para isso, oócitos provenientes de ovários coletados em abatedouro foram maturados e submetidos a vibrações por 5 segundos, intervalo de 60 minutos, durante 24h, nas frequências de 30 e 50 hz, enquanto o grupo controle foi mantido sem o efeito das vibrações. Ao final da maturação, os oócitos foram expostos ao marcador Hoechst 33342 visando avaliar a maturação nuclear e ao Mitotracker Red, visando avaliar a maturação citoplasmática e potencial de membrana mitocondrial (PMM). Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ erro padrão. Após verificação da normalidade por Shapiro-Wilk e homocedasticidade de variância por Levene, diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para cada variável estudada foram verificadas ($p < 0,05$). Nas variáveis analisadas, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos com vibrações de 30Hz e 50Hz. Por se tratar de uma tecnologia ainda pouco estudada, o presente estudo sinaliza perspectivas de novos ensaios com vibrações e protótipos durante a MIV e demais etapas da PIVE em bovinos.

Palavras-chave: Vibração. Oócito. Produção *In Vitro* de embriões. Bovinos.

ABSTRACT

The stimulating effect of vibration in living systems plays an important role in mechanical transduction, essential for cell development. In order to increase the success rate of *In Vitro* Embryo Production (IVEP), the use of low frequency vibrations during In Vitro Maturation (IVM) has shown to be promising in terms of the results obtained. In this context, the objective was to evaluate and validate a device that emits sound frequencies and the effect of these vibrations during the maturation of bovine oocytes. For this, oocytes from ovaries collected in a slaughterhouse were matured and submitted to vibrations during 5 seconds, 60 minutes interval, for 24 hours, at frequencies of 30 and 50 hz, while the control group was maintained without the effect of vibrations. At the end of maturation, the oocytes were exposed to the Hoechst 33342 marker to assess nuclear maturation and Mitotracker Red to assess cytoplasmic maturation and mitochondrial membrane potential (MMP). Data were expressed as mean $\pm$ standard error values. After the verification of normality by Shapiro-Wilk and homoscedasticity of variance by Levene, statistical differences between the experimental groups for each variable studied were verified ($p < 0.05$). In the analyzed variables, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the control group and the groups with vibrations of 30Hz and 50Hz. As this is a technology that has yet to be studied, the present study indicates perspectives for new tests with vibrations and prototypes during IVM and other stages of IVP in cattle.

Keywords: Vibration. Oocyte. *In vitro* Production of Embryos. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Dispositivo de vibração personalizado	26
Figura 2	–	Imagem representativa de oócito maturado corado com a sonda Hoechst 33342.....	29
Figura 3	–	Imagem representativa de oócito maturado e imaturo corado com sonda MitoTrackerRed®.....	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem (%) de oócitos em diferentes estádios de maturação nuclear submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliados por meio da sonda fluorescente Hoescht 33342.....	31
Gráfico2	– Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem (%) de oócitos maduros e imaturos submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliando a maturação citoplasmática por meio da sonda fluorescente MitoTracker Red®.....	33
Gráfico3	– Média ($\pm$ erro padrão) da intensidade de fluorescência de oócitos submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliando potencial bioenergético de oócitos bovinos.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Dr	Doutor
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
Hz	Hertz
FPM	Fator Promotor da Maturação
CCOs	Complexos <i>Cumulus</i> -Oócito
LH	Luteinizing hormone
FSH	Follicle stimulating hormone
TCM	Tissue Culture Medium
SFB	Soro Fetal Bovino
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TRIMA	Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais
VG	Vesícula Germinativa
QVG	Quebra de Vesícula Germinativa
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
PBS	Phosphate-buffered saline
ATP	Adenosina Trifosfato
IETS	International Embryo Technology Society
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E ENTRAVES DA PIVE NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS	16
2.2. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS: CONDIÇÕES NATURAIS	17
2.3. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS: CONDIÇÕES ESTÁTICAS	19
2.4. VIBRAÇÕES MECÂNICAS	20
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1. OBJETIVO GERAL	24
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
5.2. FABRICAÇÃO DO PROTÓTIPO	25
5.3. COLETA E SELEÇÃO DE OÓCITOS	26
5.4. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> E VIBRAÇÕES MECANICAS	26
5.5. AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO NUCLEAR	26
5.6. AVALIAÇÃO DA MATURAÇÃO CITOPASMÁTICA E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (PMM)	27
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
APÊNDICE A – ARTIGO.....	42

1 INTRODUÇÃO

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é uma técnica reprodutiva que permite que o espermatozoide e o oócito interajam fora do trato reprodutivo da fêmea. Consiste na seleção e coleta de oócitos de uma fêmea doadora, a Maturação *In Vitro* (MIV) do material coletado, seguida da Fertilização *In Vitro* (FIV) e Cultivo *In Vitro* (CIV) do embrião produzido, até que ele seja inovulado em uma fêmea receptora ou devidamente criopreservado (FERREIRA, 2010).

A principal finalidade da PIVE consiste na obtenção de maior quantidade de embriões viáveis a partir de vacas de alto valor zootécnico, sem que a matriz seja submetida aos desgastes gestacionais, bem como o aproveitamento de fêmeas inférteis por meios convencionais. Além disso, é possível aproveitar com mais eficiência, fêmeas para doação de oócitos em períodos atípicos, como vacas no primeiro trimestre gestacional, período pós-parto e novilhas a partir dos seis meses de idade. Outra vantagem é o aumento da vida reprodutiva das doadoras, além de permitir a utilização de diferentes touros para a mesma doadora, proporcionando assim o melhoramento genético acelerado do rebanho (MELLO et al., 2016).

A PIVE atingiu escala comercial no Brasil, no entanto existem entraves que limitam o uso dessa biotécnica, como a baixa taxa de formação de blastocisto e quantidade reduzida de oócitos, o que implica no aumento do custo de cada embrião produzido. Logo, o desenvolvimento de novas estratégias para superar essas limitações vem chamando a atenção dos pesquisadores (MELLO et al., 2016).

Durante a maturação e desenvolvimento *in vitro*, as condições de cultivo, tais como a temperatura e a composição do meio de cultivo são ajustadas para simular o que ocorre *in vivo*. Na técnica tradicional, os oócitos e embriões são depositados em uma placa de Petri para cultivo estático, contrapondo-se às condições naturais de desenvolvimento inicial dos embriões na tuba uterina e útero, onde são transportados, recebendo estímulos mecânicos por contrações musculares e ciliares (ISACHENKO et al., 2011).

Estudos utilizando oócitos, provaram que a taxa de desenvolvimento de blastocisto foi aumentada por vibrações mecânicas fornecidas durante a maturação e/ou cultivo *in vitro* em humanos (ISACHENKO et al., 2010), suínos (MIZOBE et al., 2010), camundongos (HUR et al., 2013), felídeos (SHAHVERDI et al., 2022) e em bovinos (TAKAHASHI et al., 2018). O efeito estimulante da vibração em sistemas vivos desempenha um papel relevante na transdução

mecânica, essencial para a sobrevivência tanto de células quanto de organismos superiores (ISACHENKO et al., 2017).

As vibrações podem ter diferentes origens, como pulsos sucessivos ou ondas sonoras. O som é uma oscilação mecânica que age no meio ao seu redor perturbando as partículas adjacentes (SOEIRO, 2011). Atualmente, a tecnologia empregada nos protótipos utilizam ondas mecânicas oriundas de motores elétricos ou motores vibracall (ISACHENKO et al., 2010; MIZOBE; YOSHIDA; MIYACHI, 2010; ASANO; MATSUURA, 2014; TAKAHASHI et al., 2018; YANG et al., 2019; LIU et al., 2022), não havendo ainda modelos que utilizem ondas mecânicas oriundas de frequências audíveis (20Hz a 20kHz).

Durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, os únicos parâmetros de vibração até então utilizados foram de 20, 40 ou 80 Hz, durante 5 segundos a cada 60 minutos em estudo realizado por Takahashi et al. (2018). Neste, a taxa de desenvolvimento de blastocisto aumentou significativamente no grupo de 40 Hz, em comparação com o grupo controle. Entretanto, a eficiência da produção de embriões pode ser melhorada ainda mais se for possível determinar a melhor magnitude de vibração.

Devido ao reduzido número de estudos e informações relacionados a vibrações na produção de embriões bovinos, é necessária a realização de mais estudos que visem descrever de melhor forma as vantagens e possíveis interferências que as vibrações podem causar. Apesar do objetivo final das vibrações seja alcançar um maior número de produtos viáveis, é necessário compreender como essa nova biotécnica afeta cada etapa da produção *in vitro* de embriões, a começar pela maturação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica e entraves da PIVE na reprodução bovina

A produtividade na pecuária bovina aumentou significativamente, principalmente devido à seleção intensiva de características produtivas por meio de biotecnologias reprodutivas. Biotécnicas como a produção *in vitro* de embriões estão sendo cada vez mais aperfeiçoadas para maximizar o potencial reprodutivo dos bovinos e melhorar os indicadores de produtividade (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008)

De acordo com o último relatório do Comitê de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS, 2021), a produção mundial de embriões aumentou na maioria das regiões do mundo. Porém, tem se observado tendências divergentes entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, onde observou-se uma queda na quantidade de embriões *in vivo*, a qual foi compensada por um aumento no número de embriões produzidos *in vitro*. Em todo o mundo, os embriões advindos da PIVE representaram 76,2% de todos os embriões bovinos transferíveis no ano de 2020.

No cenário nacional, o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de embriões, com 304.269 unidades produzidas, desses, 93,8% provenientes da PIVE. Juntamente com os Estados Unidos, os dois países representaram 77,2% de todos os embriões produzidos *in vitro* no mundo (SBTE, 2021). O grande destaque brasileiro na produção de embrião *in vitro* se deve, principalmente, ao quantitativo de bovinos, correspondendo a aproximadamente 224,6 milhões, e às características do rebanho nacional, o qual é constituído em sua maioria por animais de raças zebuínas que produzem mais oócitos por coleta (MELLO et. al., 2016; IBGE, 2021).

Apesar da PIVE ter alcançado grandes proporções no Brasil, ainda existem algumas limitações, como a baixa taxa de blastocisto, resultando no aumento do custo de cada embrião produzido. O principal fator que influencia a variação da PIVE é a competência oocitária, ou seja, a capacidade dessa célula de retomar a meiose e prosseguir com sucesso nas etapas seguintes (AGUILA et al., 2020).

Considerando que a qualidade intrínseca do oócito é um dos principais fatores que afetam o desenvolvimento embrionário e que as condições de cultura do embrião têm um papel crucial na determinação da qualidade do blastocisto, a seleção de oócitos competentes,

associada com a maturação *in vitro* dos mesmos, é vital para as tecnologias de produção *in vitro* em bovinos (KRISHER, 2004).

A maturação dos oócitos representa uma das etapas mais importantes da PIVE. Entretanto as taxas de desenvolvimento alcançadas com a maturação *in vitro* são inferiores àquelas encontradas com a maturação *in vivo* (GILCHRIST, 2010). A partir disso, estudos estão sendo realizados com o objetivo de alcançar maiores taxas, avaliando se determinados parâmetros como temperatura, suplementações, fatores de crescimento e manipulação dos oócitos poderiam influenciar no resultado final da produção *in vitro* de embriões (WANG et al., 2014; ARAT et al., 2016; AN et al., 2019).

2.2. Maturação *in vivo* de oócitos bovinos: condições naturais

Em condições naturais a maturação oocitária desencadeia-se a partir da saída de seu estado germinativo, que ocorre após o pico pré-ovulatório hormonal luteinizante, induzindo modificações físico-bioquímicas nas células do *cumulus*, ativando assim, a competência meiótica do oócito, adquirida ainda em sua fase de crescimento. Ressalta-se que a oogênese ocorre concomitantemente à foliculogênese, quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II. Durante a foliculogênese há, inicialmente, a formação de folículos primordiais, que se desenvolvem para primários, secundários, terciários, pré-ovulatórios e culmina com a ovulação (FAIR, 2003; ADONA 2013).

Após o pico gonadotrófico do LH, o oócito sai da fase de diplóteno da prófase I, atravessa a metáfase I, seguido pela anáfase I e telófase I, finalizando a primeira fase de divisão meiótica, iniciando a metáfase II. Nesse ínterim, há a condensação cromossômica e a desintegração do envelope nuclear, processo regulado pelo fator promotor de maturação (MPF), fato que inicia o processo da maturação nuclear e formação do primeiro corpúsculo polar, até concluir a fase de metáfase II, onde permanece quiescente até que seja fecundado (JONES, 2004).

Além das modificações nucleares, é necessário que o citoplasma altere sua estrutura, a nível bioquímico e molecular, para que seja capaz de alcançar o desenvolvimento embrionário e bloqueio da poliespermia (LEQUARRE et al., 2005). Nesses eventos, estão inclusas modificações na síntese de proteínas, realocação de organelas intracelulares e intensificação na

liberação do Ca^{2+} , sendo gerenciada através de uma complexa cascata proteica fosforilativa, importante na regulação meiótica (DEKEL, 2005).

A finalização da segunda etapa de divisão meiótica ocorre após a fecundação, na qual o oócito progride até completar a telófase II e se torna capaz de expelir o segundo corpúsculo polar. A partir de então, o zigoto continua seu desenvolvimento, porém agora, através de mitose (LEDAN et al., 2001).

Todo o processo, desde a maturação até o desenvolvimento embrionário, ocorre de maneira dinâmica nos ovários, oviduto e útero, onde apresentam movimentação contínua oriunda tanto das microcontrações da musculatura, quanto de batimentos ciliados do epitélio do oviduto auxiliando na remoção contínua dos metabólitos, trocas gasosas e exposição a inúmeros fatores de crescimento (ISACHENKO et al., 2011).

As estruturas físicas do corpo também possuem diversas frequências próprias, dependendo do órgão. Em humanos, frequências basais de batimento de cílios da tuba uterina foram relatadas variando amplamente entre os indivíduos na faixa de 5 a 20 Hz, dependendo do estágio do ciclo menstrual. Os cílios batem em direção ao útero, movimentando nessa direção o oócito e uma película de muco produzido pelas células secretoras (PALTIELI et al., 1995; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Análogo a isso, há evidências de que no ambiente externo ressonâncias naturais do campo eletromagnético terrestre podem produzir efeitos biológicos, psicológicos e comportamentais no corpo dos seres vivos. Esse fenômeno fisiológico é conhecido como ressonância de Schumann, um conjunto de frequências eletromagnéticas naturais que existem no espaço entre a superfície da Terra e a ionosfera e ocorre em frequências entre 3 e 69Hz (MITSUTAKE et al., 2005; ISACHENKO et al., 2017).

A partir desse conhecimento, estudos começaram a ser desenvolvidos em busca de compreender como as vibrações poderiam interferir na maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Isso se deve à tentativa de mimetizar ao máximo as condições que ocorrem naturalmente no sistema reprodutor.

2.3. Maturação *In Vitro* de embriões bovinos: condições estáticas

A maturação *in vitro* é uma das etapas da PIVE que permite que os oócitos mantidos em placas de petri adquiram a competência para serem fecundados e alcancem a fase de metáfase II (GILCHRIST et al., 2008). A maturação oocitária depende de uma sequência orquestrada de eventos envolvendo o oócito e os constituintes foliculares, como as células do *cumulus*, para produzir oócitos competentes para sustentar o desenvolvimento (DEL COLLADO et al., 2017). Todo esse processo se inicia a partir da coleta e seleção de oócitos.

Por meio da seleção é possível resgatar uma grande quantidade de oócitos ainda imaturos no ovário, no entanto, quando comparado aos oócitos maturados *in vivo*, os Complexos *Cumulus*-oócito (COC's) maturados *in vitro* têm a capacidade de desenvolvimento diminuída (GILCHRIST et al., 2008). Em contraste com os humanos, onde os oócitos são coletados principalmente durante o estágio MII, os oócitos bovinos devem ser maturados em laboratório devido à dificuldade de obtenção de quantidades significativas de oócitos maturados *in vivo*, visto que os oócitos recuperados estão em diferentes estádios de desenvolvimento e atresia (RAUBER et al., 2003; AGUILA et al., 2020).

Durante a etapa de maturação, o oócito precisa passar por mudanças citoplasmáticas e nucleares sequenciais, para que se torne apto à fecundação. Para atingir resultados satisfatórios, é de suma importância que os processos de maturação, tanto nuclear quanto citoplasmática, ocorram de maneira simultânea. Tais mudanças têm início através da ruptura mecânica de contato do oócito, que se encontra no estágio diplóteno da prófase I, com as células foliculares, o que confere ao mesmo o processo de maturação do núcleo até atingir a metáfase (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008; GILCHRIST; THOMPSON, 2007), uma vez que essas células são responsáveis pela produção de fatores inibitórios que mantêm os oócitos quiescentes (SIRARD et al., 1998).

Para que esses processos ocorram, o oócito necessita ser acondicionado em uma estufa por um período de maturação que pode levar de 18 a 24 horas, submetido a uma atmosfera controlada com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008), sendo depositado em meio adequado para sua sobrevivência, disposto em gotas em placa de petri. Dos meios de cultura e maturação, destaca-se o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®), onde na maioria dos protocolos, é suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17β, piruvato de

sódio, lactato, vitaminas e antibióticos que auxiliam no desenvolvimento do mesmo (GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000).

Diferente do que ocorre *in vivo*, os oócitos maturados *in vitro* constantemente têm seu metabolismo alterado e um potencial de evolução reduzido. Este fato pode ser atribuído tanto a limitações no meio de maturação, como por fatores intrínsecos do oócito. Quando um sistema de cultura estático é utilizado, o único fator que previne os efeitos deletérios dos metabólitos é trocar o meio de cultura por meio fresco. (KRISHER et al., 2004; ISACHENKO et al., 2011).

Nesse sentido, as condições estáticas proporcionadas pela maturação do oócito em placas de Petri faz com que o metabolismo celular, ao consumir os aminoácidos contidos no meio, resulte em acúmulo de amônia no meio intracelular (HAMMON et al., 2000) e radicais livres oriundos do oxigênio (JOHNSON et al., 1994), o que gera uma supressão do desenvolvimento embrionário em função de sua toxicidade, podendo causar retardo na técnica ou perda de material biológico (TAKAHASHI et al 2018).

Apesar de protocolos e técnicas cada vez mais avançadas, os resultados alcançados ainda são relativamente baixos quando comparadas a produção *in vivo*, assim, apenas 30% do total de oócitos conseguem atingir o estágio de blastocisto e, desses, apenas 50% dos embriões culminam em uma prenhez, (MELLO et al., 2016). As taxas de maturação variando entre 50% a 80% mostram a importância de buscar estratégias para melhoria desta etapa, que pode ser limitante para o sucesso da PIVE (GUEMRA et al., 2013; CARNEIRO et al., 2019).

Uma possível explicação para a baixa eficiência nos resultados na PIVE, consiste na falta de aproximação em alguns aspectos com o que acontece naturalmente, como por exemplo, a movimentação dinâmica e constante em que esses oócitos são submetidos durante o processo de maturação *in loco*. Quando comparado ao processo *in vitro*, que acontece de maneira estática em uma placa de Petri, os resultados obtidos são consideravelmente inferiores. Visando elevar a produtividade desse processo, acredita-se que associar uma dinâmica de movimento através de vibrações, durante a maturação, otimiza o processo, melhorando consequentemente os resultados (DODE et al., 2001 MIZOBE et al., 2010)

2.4. Vibrações mecânicas

O efeito estimulante da vibração nos sistemas vivos é bem conhecido e desempenha um papel relevante na transdução mecânica, que é essencial para a sobrevivência das células.

Quando aplicadas em células somáticas cultivadas *in vitro* ativam sua proliferação e propriedades secretoras (ISACHENKO et al., 2011). Estudos laboratoriais realizados demonstraram que tais vibrações podem aumentar tanto a proliferação de condrócitos articulares bovinos cultivados, como de osteoblastos. (TANAKA et al., 2003; KAUPP; WALDMAN, 2008).

Estudos realizados em humanos investigaram os efeitos da agitação mecânica durante a maturação e cultivo *in vitro* em oócitos e embriões antes do transplante e chegaram à conclusão de que intervalos curtos e regulares de vibrações mecânicas aumentam consideravelmente as taxas de desenvolvimento (ISACHANEKO et al., 2010; ROMANOV et al., 2018). Resultados similares foram descritos por Takahashi et al. (2018), no qual estes observaram que a vibração mecânica moderada foi benéfica tanto para maturação oocitária, quanto para o desenvolvimento embrionário *in vitro* de bovinos, uma vez que o número de blastocistos foi consideravelmente maior na frequência de 40Hz do que nas demais, enquanto uma vibração mais intensa, acima de 80 Hz mostrou-se prejudicial para o desenvolvimento.

A vibração mecânica também demonstrou ser benéfica durante a maturação *in vitro* de oócitos de suínos, os quais foram submetidos à uma frequência de 20 Hz. Apesar de não ter afetado a proporção de oócitos que atingiram o estágio de metáfase II, as taxas de formação de blastocisto foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os obtidos para oócitos maturados sem a vibração mecânica (MIZOBE et al., 2010).

Ao avaliar a eficiência das vibrações mecânicas na transferência nuclear de células somáticas interespecies (TNCS) de leopardos, Shahverdi et al. (2022) descreveram resultados promissores durante a MIV. Neste estudo houve melhora significativa na expansão das células do *cumulus*, bem como na progressão de MII de oócitos de gatos domésticos. Entretanto, os oócitos foram menos tolerantes ao procedimento de TNCS, os quais foram medidos pelas taxas de formação de oócitos reconstruídos, que foram inferiores ao grupo controle.

O uso de vibração sonora (música) também foi proposto para melhorar a qualidade de embriões humanos produzidos *in vitro*. Embriões de um grupo foram cultivados em condições de música constante e o segundo grupo sob condições padrão. Foi descoberto que o cultivo de oócitos e embriões sob condições de vibração sonora aumentou significativamente o sucesso da fertilização. Neste caso, o tipo de música não teve influência (LÓPEZ-TEIJÓN et al., 2015).

Em pesquisa realizada recentemente observou-se que ao se aplicar vibrações de 45Hz por 5 segundos a cada 60 minutos em blastocistos descongelados, a incidência de apoptose foi reduzida em duas vezes após a vitrificação e descongelamento. Além disso, a vibração levou a alterações epigenéticas e transcricionais, com 502 genes diferentes expressos em relação ao grupo controle, revelando alterações importantes em vias como fosforilação oxidativa e de sinalização que regulam a pluripotência de células-tronco, os quais se assemelham aos embriões produzidos *in vivo* (SANTOS et al., 2023).

Quando o oócito é maturado em condições estáticas em placas de Petri, o metabolismo celular, ao consumir os aminoácidos contidos no meio, resulta em acúmulo de amônia no meio intracelular e radicais livres oriundos do oxigênio, o que gera uma supressão do desenvolvimento embrionário em função de sua toxicidade, podendo causar retardo na técnica ou perda de material biológico (JOHNSON et al., 1994; HAMMON et al., 2000).

O desenvolvimento embrionário através de movimentos vibratórios acontece de forma mais rápida, e tal fato pode estar associado a dois fatores principais. Inicialmente, devido a uma ativação de resposta intracelular, induzida pelas vibrações, o qual afeta a expressão gênica em células endoteliais vasculares e através do auxílio na eliminação residual produzida pelo metabolismo celular do embrião (TAKAHASHI et al 2018). Portanto, uma consideração cuidadosa e abordagens alternativas podem ser necessárias para mitigar os efeitos negativos e melhorar a taxa de sucesso da maturação do oócito.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

I- O protótipo transmite vibrações adequadas para a placa de Petri que favorecem o processo de maturação *in vitro*.

II- O uso de vibrações sonoras promove o aumento na taxa de maturação de oócitos sob condições *in vitro*.

5 OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Avaliar o desempenho de protótipo que emite diferentes frequências de vibrações sobre as taxas de maturação em oócitos bovinos durante a MIV.

5.2. Objetivos específicos

- a) Desenvolver modelo de protótipo que promova vibrações durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.
- b) Determinar a frequência de vibração que ocorrem as melhores taxas de maturação de oócitos utilizando um modelo de protótipo a ser validado.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Delineamento experimental

O experimento foi realizado entre os meses de agosto a dezembro de 2022 e foram utilizados ovários de vacas mestiças provenientes de abatedouro. Foram obtidos um total de aproximadamente 360 complexos cumulus-oócitos (COCs) no mesmo estágio de maturação e divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, cada um representando frequências de vibrações diferentes: grupo 1 (30Hz), Grupo 2 (50Hz) e para garantir a validade do estudo, foi incluído um grupo controle (sem vibrações). foram colocados aproximadamente 20 COCs por gota em uma placa de cultivo em cada grupo e para os mesmos foram realizadas seis repetições.

6.2. Fabricação do protótipo

O protótipo foi fabricado no Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais (TRIMA) e consiste em dois dispositivos Android que emitem ondas de frequência sonora, variando de 20Hz a 20kHz, com uso do software Frequency Generator, o qual fornece informações a um amplificador, dessa forma, o impulso advindo da fonte de alimentação é convertido em energia oscilatória, transmitida como som para os alto-falantes, acoplados a mesas de polimetilmetacrilato na qual placas de petri são acomodadas (figura 1).

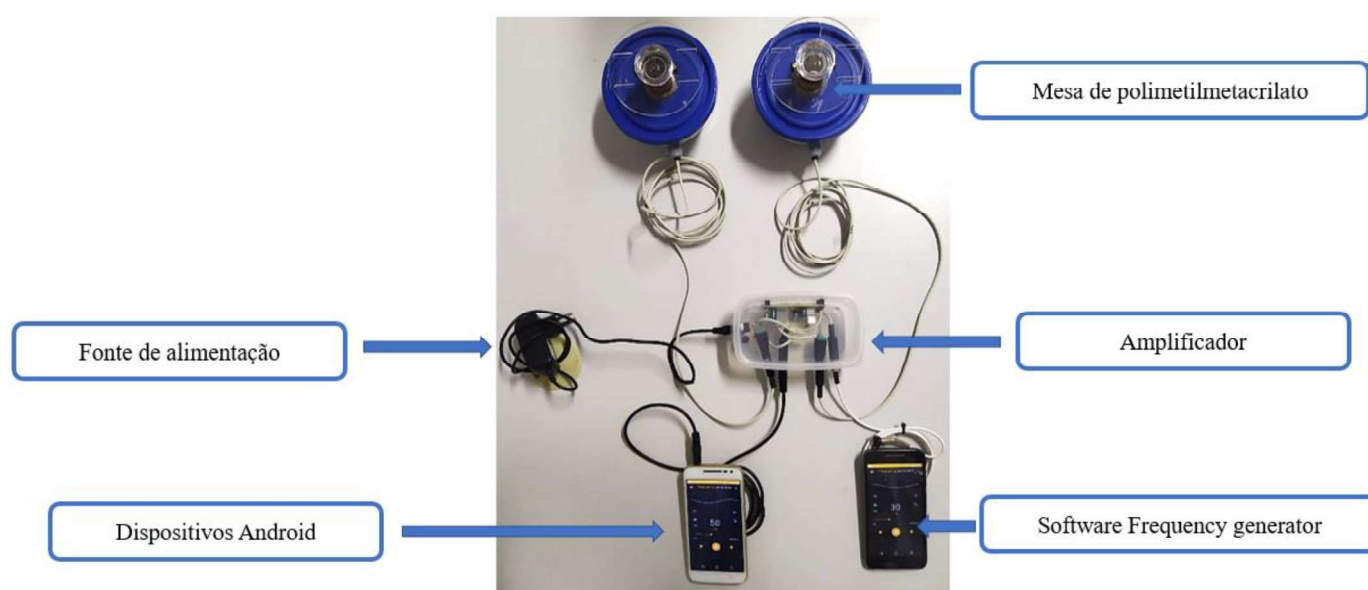


Figura 1- Dispositivo de vibração personalizado

Fonte: Acervo do autor

6.3. Coleta e seleção de oócitos

Os oócitos foram colhidos por aspiração de ovários provenientes de matadouro com no máximo 2 horas após o abate e transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a 37°C. Os oócitos foram aspirados de folículos com diâmetro entre 3 a 8 mm utilizando agulha 25mmx0,8mm, acoplada a seringa de 10ml e transferidos para tubo cônico graduado para centrifuga. Em seguida, foram colocados em banho-maria a 37°C durante 10 minutos para decantação dos COCs.

A seleção dos oócitos foi realizada com o sedimento decantado em placas de Petri, com auxílio de estereomicroscópio e selecionados apenas COCs com citoplasma homogêneo, com no mínimo três camadas de células. Os oócitos selecionados foram lavados em gotas de 100µL do meio de lavagem (TCM-199 HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino, 22mg de piruvato de sódio e 50 µg de sulfato de gentamicina).

6.4. Maturação *In Vitro* e vibrações mecânicas

Os oócitos foram maturados em gotas de 100 µL no meio de cultivo TCM199® suplementado com 0,2mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB), 5 µg/ml de FSH, 50 µg/ml de LH e cobertas com óleo mineral, em incubadora controlada com 5% de CO₂ e 38,5°C. As placas de Petri dos grupos 30Hz e 50Hz ficaram acopladas ao protótipo que produzia vibrações com duração de 5 segundos a cada 60 minutos, durante 24 horas, enquanto os oócitos do grupo controle não foram submetidos a vibrações.

6.5. Avaliação da maturação nuclear

Ao final da maturação os oócitos foram lavados três vezes em PBS e posteriormente removidas as células do *cumulus* em gotas de hialuronidase, através de aspirações repetidas. Os oócitos desnudos foram expostos ao corante Hoechst 33342, na concentração de 1µg/mL em PBS, e incubados por quinze minutos, no escuro. Após este tempo, foram lavados três vezes em PBS, transferidos para lâmina, cobertos por uma gota de glicerol e avaliado a taxa de maturação no microscópio de fluorescência (excitação 404 nm e emissão 526 nm). Os oócitos foram classificados como imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa – VG, quebra da vesícula germinativa - QGV, metáfase I) e os oócitos em metáfase II foram considerados maturados.

6.6. Avaliação da maturação citoplasmática e do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

Para avaliação da distribuição citoplasmática das mitocôndrias os oócitos foram lavados três vezes em PBS, desnudados em hialuronidase e incubados por 30 minutos protegidos da luz em PBS acrescido de 500 nM da sonda fluorescente MitoTracker Red® (CMXRos, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) a 38,5°C. Posteriormente, foram lavados três vezes em gotas de PBS e analisados em microscópio de fluorescência (excitação 543 nm e emissão 575 nm). A classificação da maturação oocitária foi baseada na distribuição das mitocôndrias no citoplasma celular. Oócitos totalmente maturados apresentaram maior proporção de mitocôndrias dispersas pelo citoplasma, enquanto oócitos imaturos apresentaram mitocôndrias localizadas principalmente na periferia.

Para quantificar o potencial de membrana mitocondrial, foram capturadas imagens dos oócitos, armazenadas e analisadas com auxílio do software NIH ImageJ, sendo os resultados expressos em pixels. A intensidade do sinal no fundo da imagem “background” foi diminuído dos valores. O grupo controle - sem vibração foi escolhido como calibrador e o valor de cada imagem foi dividido pela sua média para gerar as unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). A intensidade de fluorescência, é diretamente proporcional ao PMM.

6.7. Análise estatística

Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ erro padrão, bem como mínimo e máximo através do programa estatístico SAS v8 (System for Windows - SAS Institute Cary, North California; USA). Após verificação da normalidade por Shapiro-Wilk e homocedasticidade de variância por Levene, diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para cada variável estudada foram verificadas, quando paramétricos, através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Já quando rompido a distribuição gaussiana, foram analisados por Kruskal-Wallis. Dados percentuais foram transformados arcoseno. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para aumentar os índices de produção *in vitro* de embriões é de fundamental importância a realização de pesquisas primordiais voltadas para a padronização dos métodos de controle oocitário que possam gerar o conhecimento necessário para o avanço da área da biologia reprodutiva e melhoria dos resultados das Tecnologias de Reprodução Assistida (GONÇALVES, 2007). Por se tratar de uma tecnologia ainda pouco estudada, o presente estudo sinaliza perspectivas de novos ensaios com protótipos e vibrações durante a MIV e demais etapas da PIVE em bovinos.

Em relação à maturação nuclear (gráfico 1), observou-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre o grupo controle (62,5%) e os grupos com vibrações de 30Hz (64,7%) e 50Hz (69,6%). A maturação nuclear é caracterizada pela saída do oócito do estágio de diplóteno da prófase I até atingir a metáfase II (figura 2), para isso acontecer, o gameta requer condições ambientais ideais e estímulos hormonais. Essa etapa é de extrema importância, pois desempenha um papel crucial para o desenvolvimento do embrião (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

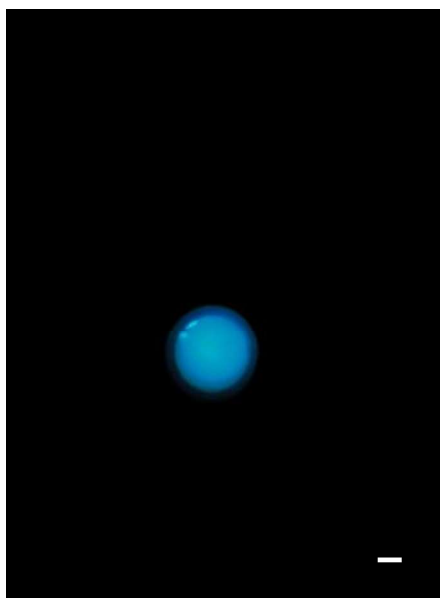


Figura 2- Imagem representativa de oócito maturado corado com a sonda Hoechst 33342. Barras de escala = 20 μm . $P>0,05$.

Fonte: Acervo do autor

Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Mizobe; Yoshida; Miyochi. (2010) em suínos e Yang et al. (2019) em humanos, nos quais a aplicação de vibrações mecânicas durante a MIV também não afetou a maturação nuclear. Entretanto, no mesmo estudo houve um maior desenvolvimento embrionário, o que pode sugerir que o efeito benéfico das vibrações pode ser notado nas etapas seguintes à maturação.

Por outro lado, outra pesquisa realizada em humanos foi possível observar que as taxas de maturação de oócitos cultivados em vibração contínua de 10 Hz foi maior do que a de oócitos em cultura estática convencional, bem como aumentou a taxa de desenvolvimento de blastocistos partenogénéticos (LIU et al., 2022). Naturalmente, durante a passagem pelo trato reprodutivo, os oócitos e embriões são expostos tanto a alterações químicas como a estímulos mecânicos leves. Neste caso, a vibração contínua possibilitou a aproximação do ambiente que as células seriam submetidas *in vivo*, como contrações de músculos e movimentos ciliares, que são responsáveis por mover ou fixam os oócitos e embriões (MONTENEGRO-JOHNSON, 2022).

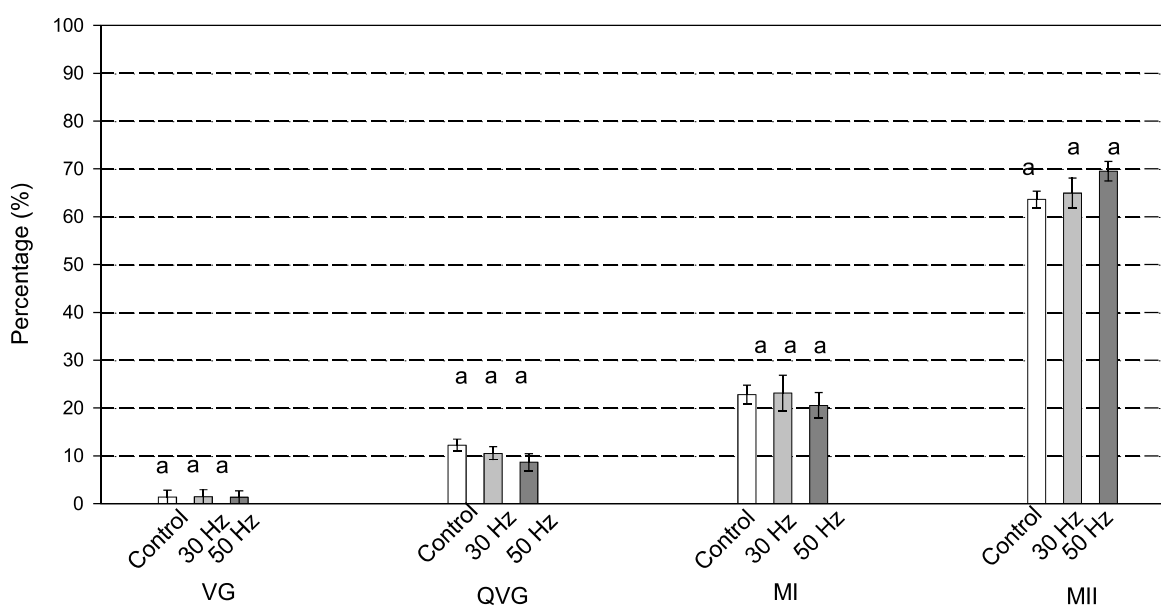
Entretanto, a metodologia aplicada no estudo realizado por Liu et al. (2022), no qual utilizaram vibração contínua e em baixa frequência difere do presente estudo, no qual as configurações de intensidade e duração da vibração utilizadas foram baseadas em pesquisas anteriores realizadas em suínos (MIZOBE et al., 2010) e em bovinos (TAKAHASHI et al., 2018), os quais aplicavam as vibrações em intensidades maiores e intervaladas. O impacto da pressão sonora não é uniforme, pois varia em função de vários fatores, como frequências de onda, durações de exposição e estrutura harmônica do som. Consequentemente, diferentes combinações desses fatores podem resultar em efeitos variados no ambiente (LÓPEZ-TEIJÓN et al., 2015)

Apesar de TAKAHASHI et al. (2018) descreverem um estudo sobre a eficácia das vibrações em oócitos bovinos durante a maturação, o qual corresponde ao único estudo publicado até o momento e com esse propósito na espécie, os efeitos descritos foram avaliados somente na fase de blastocisto. Nesse caso, houve um aumento no desenvolvimento de blastocistos na frequência de 40Hz em relação ao grupo controle, porém não foram relatados os efeitos benéficos diretamente relacionados com a maturação.

Já no presente estudo, as intensidades da estimulação vibratória utilizadas de 30 e 50 Hz aplicadas aos oócitos imaturos foram escolhidas com o objetivo de definir os melhores parâmetros para a espécie. Entretanto, observou-se que não houve aumento no potencial de

desenvolvimento dos oócitos, podendo expandir as buscas para diferentes frequências, assim como para a duração das vibrações e o intervalo entre elas.

Gráfico 1- Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem (%) de oócitos em diferentes estádios de maturação nuclear submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliados por meio da sonda fluorescente Hoescht 33342.



VG = vesícula germinativa; QVG = quebra de vesícula germinativa ; MI = metáfase I; MII = metáfase II

Em relação à distribuição mitocondrial (gráfico 2), não houve influência ($P > 0,05$) na maturação citoplasmática entre oócitos do grupo controle (56,09%), no grupo de 30Hz (60,65%) e de 50Hz (58,67%). O arranjo e a função das mitocôndrias desempenham um papel vital nos processos citoplasmáticos e atuam como um indicador facilmente observável da compartimentalização. O papel principal da mitocôndria é criar ATP, necessário para suportar os processos de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário. Oócitos totalmente maduros com uma quantidade significativa de mitocôndrias dispersas pelo citoplasma são considerados mais competentes (figura 3), pois altos níveis de mitocôndrias estão ligados à produção de ATP e, posteriormente, ao crescimento embrionário. O fato de não detectar diferenças entre os grupos avaliados indica que a vibração não teve efeitos deletérios e não interferiu no desenvolvimento final dessas células. Em oócitos bovinos, a redistribuição citoplasmática prejudicada pode reduzir a qualidade celular e desencadear a apoptose. (YU et al., 2010; VAN BLERKOM, 2011).

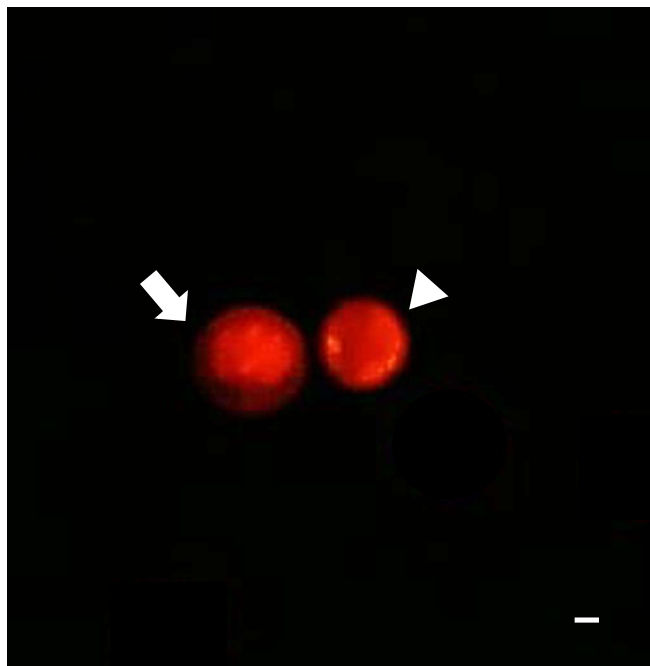
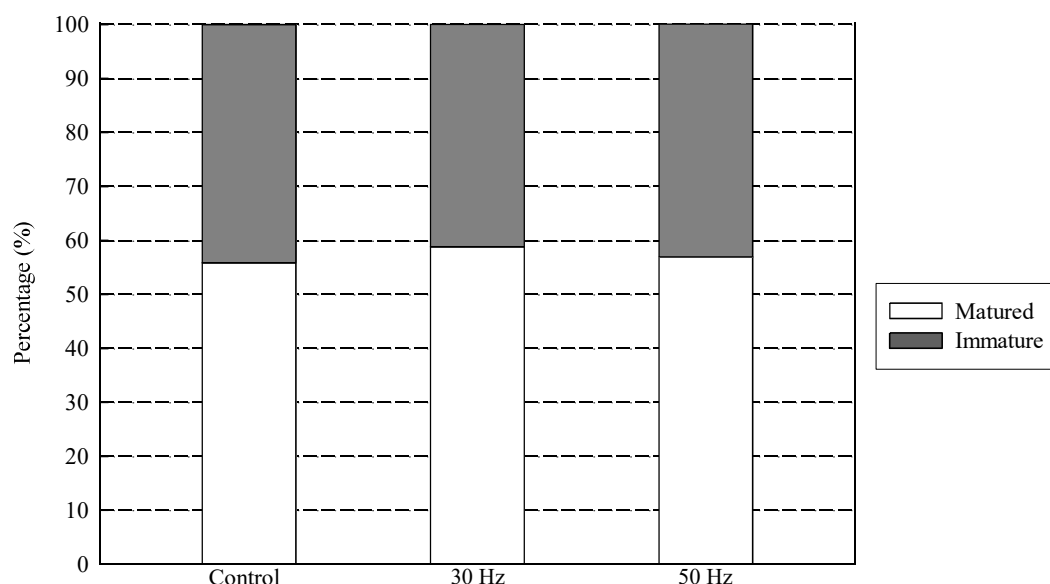


Figura 3- Imagem representativa de oócito maturado (seta) e imaturo (ponta de seta) corado com sonda MitoTracker Red®. Barras de escala = 20 μ m. $P>0,05$.

Fonte: Acervo do autor

Os achados aqui apresentados diferem dos relatados por Mizobe, Yoshida e Miyochi (2010), que observaram um aumento na atividade citoplasmática *in vitro* de oócitos suínos devido à vibração mecânica. Tal efeito foi atribuído à secreção aprimorada e ao potencial de desenvolvimento das células *cumulus*, que são importantes no suporte à função citoplasmática dos oócitos. Entretanto, não foi realizada nenhuma avaliação direta sobre maturação citoplasmática para comprovar tal hipótese, o que reforça a pressuposição que o efeito das vibrações é benéfica durante a maturação nuclear e citoplasmática e percebido nas fases embrionárias.

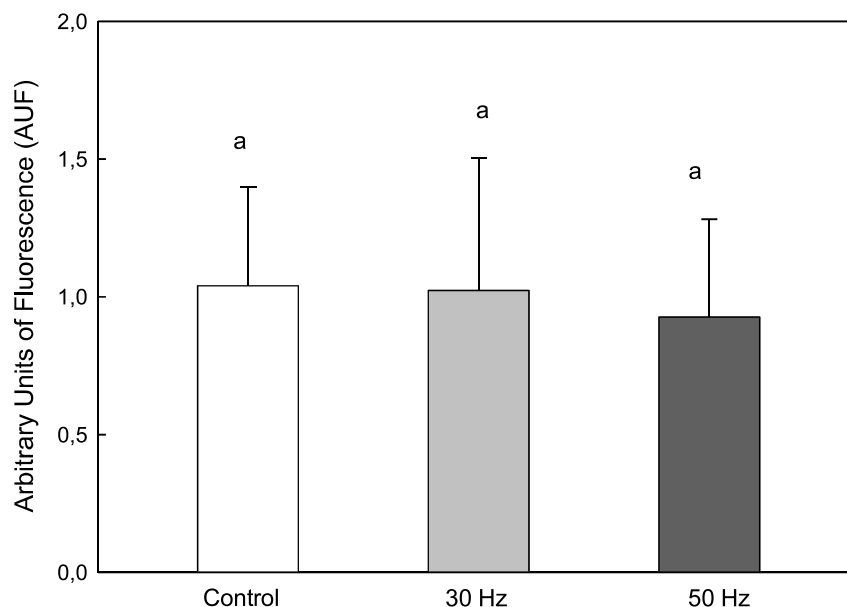
Gráfico 2- Média ($\pm$ erro padrão) da porcentagem (%) de oócitos maduros e imaturos submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliando a maturação citoplasmática por meio da sonda fluorescente MitoTracker Red®.



A implementação de distintas frequências também não resultou em diferença significativa ($P > 0,05$) no potencial de membrana mitocondrial de oócitos ao final da MIV (Gráfico 3), o qual variou de 0,92 no grupo de 50Hz a 1,0 no grupo controle. A qualidade dos oócitos está intimamente relacionada ao número e função das mitocôndrias, pois estas desempenham um papel crucial no processo de maturação. À medida que o oócito se desenvolve, as mitocôndrias exibem mobilidade significativa e se agregam em locais específicos para atender aos altos requisitos de energia. A função bioenergética dos oócitos é determinada pelo potencial de suas membranas. (CHIARATTI et al., 2018)

Não foi observada nenhuma tendência ao aumento do PMM. Essas observações corroboram com descobertas anteriores, indicando consumo reduzido de oxigênio e baixa produção de ATP em estágios iniciais de oócitos e embriões. Isso é consistente com o uso da via de resgate de adenosina pelo oócito bovino como um meio alternativo de geração de ATP para atender às suas necessidades de energia. (SCANTLAND et al., 2014; LODDE et al., 2021)

Gráfico 3- Média ($\pm$ erro padrão) da intensidade de fluorescência de oócitos submetidos a vibração sonora durante a MIV, avaliando potencial bioenergético de oócitos bovinos.



Apesar de seu uso estar sendo cada vez mais estudado e associado a efeitos benéficos, as consequências da aplicação das vibrações ainda não estão totalmente elucidadas. Estudos recentes mostraram que submeter oócitos de gato doméstico a vibração a uma frequência de 44 Hz por 5 segundos por hora melhoram a maturação nuclear e a expansão das células *cumulus*. No entanto, a taxa de sobrevivência de oócitos reconstruídos e a qualidade dos blastocistos foram significativamente menores na vibração do que no grupo controle (SHAHVERDI et al., 2022). Possivelmente, esses resultados podem ser devidos à frequência utilizada de 44Hz por 5 segundos, a qual pode necessitar de mais adaptações.

Em relação aos equipamentos geradores de vibração, pode-se destacar diferenças entre os equipamentos citados nos demais trabalhos e o equipamento fabricado para este estudo. Primeiramente, os equipamentos utilizados nas demais pesquisas emitem vibrações oriundas de motores elétricos e motores vibracall (ISACHENKO et al., 2010; MIZOBE; YOSHIDA; MIYACHI, 2010; ASANO; MATSUURA, 2014; TAKAHASHI et al., 2018; YANG et al., 2019; LIU et al., 2022), enquanto o protótipo fabricado para o presente estudo emite vibrações de origem sonora. Nesse quesito, há diferenças relacionadas com a fonte, meio, frequência, forma de onda, percepção e aplicação. Entender essas diferenças é importante para o

aprimoramento de equipamentos e parâmetros a fim de se alcançar resultados mais promissores durante a maturação *in vitro* de oócitos e produção *in vitro* de embriões.

8 CONCLUSÃO

Ao avaliar o uso do dispositivo de vibração personalizado, pode-se concluir que o mesmo transmite vibrações nas frequências programadas para a placa de Petri e não causou efeitos deletérios aos oócitos. As vibrações mecânicas geradas a partir de protótipo nas frequências de 30Hz e 50Hz não demonstraram ter variações maléficas nos oócitos bovinos durante a maturação. Mais pesquisas são necessárias para entender completamente os mecanismos subjacentes a esses efeitos e explorar outras aplicações potenciais, incluindo a melhoria das demais etapas da produção *in vitro*, com foco nas potenciais aplicações comerciais no campo da biotecnologia reprodutiva.

O estudo realizado é pioneiro na avaliação da maturação nuclear e citoplasmática em oócitos bovinos submetidos a vibrações e os resultados apresentados apontam, pela primeira vez, a ausência de efeitos positivos ou nocivos nesta etapa da produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; MIRANDA, M. S.; OHASHI, O. M. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **Journal of health sciences**, v. 15, n. 3, p. 245-250, 2013.
- AGUILA, L.; TREULEN, F.; THERRIEN, J.; FELMER, R.; VALDIVIA, M.; SMITH, L. C. Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. **Animals**, v. 10, n.12, 1–24, 2020
- AN, Q.; PENG, W.; CHENG, Y.; LU, Z.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; SU, J. Melatonin supplementation during *in vitro* maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. **Journal of Cellular Physiology**, v.234, n.10, p. 17370-17381, 2019.
- ARAT, S.; CAPUTCU, A. T.; CEVIK, M.; AKKOC, T.; CETINKAYA, G.; BAGIS, H. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of cloned bovine embryos. **Zygote**, v.24, n.4, p.554–562, 2016.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n.1, p.147-158, 1982.
- CAMBURN, B.; VISWANATHAN, V.; LINSEY, J.; ANDERSON, D.; JENSEN, D.; CRAWFORD, R.; WOOD, K. Design prototyping methods: state of the art in strategies, techniques, and guidelines. Design prototyping methods: state of the art in strategies, techniques, and guidelines. **Design Science**, v. 3, p.1-33, 2017.
- CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular human reproduction**, v. 9, n. 12, p. 749-756, 2003.
- CARNEIRO, I. D. M. B.; SANTANA, A. L. A.; BEZERRA, P. A.; COSTA, L. N. F.; SILVA, G. C. O.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, L. P. Oócitos bovinos: influência das estações do ano e maturação *In Vitro* em meio enriquecido com quercetina. **Magistra**, v. 30, n. 1, p. 134-142, 2019.
- CHIARATTI, M. R.; GARCIA, B. M.; CARVALHO, K. F.; MACABELLI, C. H.; RIBEIRO, F. K. S.; ZANGIROLAMO, A. F.; MACHADO, T. S. Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. **Animal reproduction**, v. 15, n. 3, p. 231-238, 2018
- CHIEN, S.; LI, S.; SHYY, Y.J. Effects of Mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. **Hypertension**, v.31, n.1, p.162–169, 1998.
- CROXATTO, H. B. Physiology of gamete end embryo transport through the fallopian tube. **Reproductive biomedicine online**, v.4, n.2, p. 160-169, 2002.

DE SOUSA, P. A.; SILVA, S. J. M.; ANDERSON, R. A. Neurotrophin signaling in oocyte survival and developmental competence: a paradigm for cellular totipotency. **Cloning and stem cells**, v. 6, n. 4, p. 375-385, 2004.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 234, n. 2, p. 19-25, 2005.

DEL COLLADO, M.; SILVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, M. L.; ALVES, B. M.; SIMAS, R. C.; GODOY, A. T.; PERECIN, F. *In Vitro* maturation impacts *cumulus*-oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 881-893, 2017.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R. Developmental capacity of *Bos indicus* oocytes after inhibition of meiotic resumption by 6-dimethylaminopurine. **Animal reproduction science**, v. 65, n. 4, p. 171-180, 2001.

DUMONT, J.; UMBHAUER, M.; RASSINIER, P.; HANAUER, A.; VERLHAC, M. H. p90Rsk is not involved in cytotatic factor arrest in mouse oocytes. **The journal of cell biology**, v. 169, n. 2, p. 227-231, 2005.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 4, p. 203-216, 2003.

FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina**: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos). Juiz de Fora: Editar, 2010.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human reproduction**, v. 15, n. 2, p. 395-401, 2000.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human reproduction update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007.

GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. **Reproduction, fertility and development**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2010.

GONÇALVES, P.B.D; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

GUEMRA, S.; MONZANI, P. S.; SANTOS, E. S.; ZANIN, R.; OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. D. S.; ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com

quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 65, n.6, p. 1616-1624, 2013.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri-SP: Manole, 2004. 513 p.

HAMMON, D. S.; WANG, S.; HOLYOAK, G. R. Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 59, n. 2, p. 23-30, 2000.

HUR, Y. S.; PARK, J. H.; RYU, E. K.; PARK, S. J.; LEE, J. H.; LEE, S. H.; LIM, J. H. Effect of micro-vibration culture system on embryo development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 6, p. 835-841, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2021**. Rio de Janeiro: IBGE, 2008.

ISACHENKO, E.; MAETTNER, R.; ISACHENKO, V.; ROTH, S.; KREIENBERG, R.; STERZIK, K. Mechanical agitation during the *in vitro* culture of human pre-implantation embryos drastically increases the pregnancy rate. **Clinical laboratory journal**, v.56, n.11, p.569-576, 2010.

ISACHENKO, V.; STERZIK, K.; MAETTNER, R.; ISACHENKO, E.; TODOROV, P.; RAHIMI, G.; MERZENICH, M. *In vitro* microvibration increases implantation rate after embryonic cell transplantation. **Cell transplantation**, v. 26, n. 5, p. 789-794, 2017.

ISACHENKO, V.; MAETTNER, R.; STERZIK, K.; STREHLER, E.; KREINBERG, R.; HANCKE, K.; ISACHENKO, E. In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. **Reproductive biomedicine online**, v.22, n.6, p.536-544, 2011.

JOHNSON, M. H.; NASR-ESFAHANI, M. H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*?. **Bioessays**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 1994.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v.10, n.1, p.1-5, 2004.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of animal science**, v.82, n.13, p.45-51, 2004.

LEDAN, E.; POLANSKI, Z.; TERRET, M. E.; MARO, B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. **Developmental biology**, v. 232, n. 2, p. 400-413, 2001.

LEFEBVRE, C.; TERRET, M. E.; DJIANE, A.; RASSINIER, P.; MARO, B.; VERLHAC, M. H. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **The journal of cell biology**, v. 157, n. 4, p. 603-613, 2002.

LEQUARRE, A. et al. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 841-859, 2005.

LIU, Q.; ZHAO, S.; ZHOU, J.; LIU, P.; HUO, B. Effects of microvibration stimulation on developmental potential of discarded germinal vesicle oocytes of human. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 2022.

LODDE, V. C. Caracterização Nuclear e Citoplasmática de Oócitos Bovinos Revela que a Cisteamina Resgata Parcialmente o Desenvolvimento do Embrião em Modelo de Baixa Reserva Ovariana. **Animais**, v. 11, n. 7, p. 1-22, 2021.

LOPEZ-TEIJON, M.; CASTELLO, C.; ASENSIO, M.; FERNANDEZ, P.; FARRERAS, A.; ROVIRA, S.; VELILLA, E. Improvement of fertilization rates of *in vitro* cultured human embryos by exposure to sound vibrations. **Journal of fertilization**, v. 3, n.4, p. 1-6, 2015.

MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of *cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-922, 2001.

MEINECKE, B.; JANAS, U.; PODHAJSKY, E.; MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in domestic animals**, v.36, n. 4, p.183-188, 2001.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G. D.; MELLO, M. R. B. D.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MITSUTAKE, G.; OTSUKA, K.; HAYAKAWA, M.; SEKIGUCHI, M.; CORNÉLISSEN, G.; HALBERG, F. Does Schumann resonance affect our blood pressure?. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 59, n.1, p.1-12, 2005.

MIZOBE, Y.; YOSHIDA, M.; MIYOSHI, K.. Enhancement of cytoplasmic maturation of *in vitro*-matured pig oocytes by mechanical vibration. **Journal of reproduction and development**, v. 56, n.2, p. 285-290, 2010.

MONTENEGRO-JOHNSON, T. D.; SMITH, A. A.; SMITH, D. J.; LOGHIN, D.; BLAKE, J. R. Modelling the fluid mechanics of cilia and flagella in reproduction and development. **The european physical journal E**, v. 35, n.111, p. 1-17, 2012.

PALTIELI, Y.; WEICHSELBAUM, A.; HOFFMAN, N.; EIBSCHITZ, I.; KAM, Z. Physiology: Laser scattering instrument for real time in-vivo measurement of ciliary activity in human Fallopian tubes. **Human reproduction**, v. 10, n. 7, p. 1638-1641, 1995.

PAVLOK, A.; ČECH, S.; KUBELKA, M.; LOPATÁŘOVÁ, M.; HOLÝ, L.; JINDRA, M. Storage of bovine isolated follicles: A new alternative way to improve the recovery rate of viable embryos from ovarian follicles of slaughtered cows. **Animal reproduction science**, v. 96, n.1, p.186-195, 2006.

PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo transfer Newsletter**, v. 35, n.4, p. 14- 16, 2016.

RAUBER, L. P.; ALVES, D. F.; FIGUEIRÓ, G. M.; BRUM, D. D. S.; HILGERT, T. F.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos

mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Brazilian journal of veterinary research and animal science**, v.40, n.3, p.169-177, 2003.

ROMANOV, A. Y.; SILACHEV, D. N.; MAKAROVA, N. P.; & DOLGUSHINA, N. V. Effect of Mechanical Microvibration on the Quality of Human Embryos during *In Vitro* Culturing and Outcomes of Assisted Reproduction Technologies. **Bulletin of experimental biology & medicine**, v. 165, n. 4, p.544-547, 2018.

SANTOS, A. C.; JOAQUIM, D. C.; NOCITI, R. P.; MACABELLI, C. H.; SAMPAIO, R. V.; OLIVEIRA, A. S.; CHIARATTI, M. R. Micro-vibration results *in vitro*-derived bovine blastocysts with greater cryotolerance, epigenetic abnormalities, and a massive transcriptional change. **Theriogenology**, v. 196, p. 214-226, 2023.

SBTE – SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. **2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**: SBTE, 2021.

SCANTLAND, S.; TESSARO, I.; MACABELLI, C. H.; MACAULAY, A. D.; CAGNONE, G.; FOURNIER, É.; ROBERT, C. The adenosine salvage pathway as an alternative to mitochondrial production of ATP in maturing mammalian oocytes. **Biology of reproduction**, v.91, n.3 p.1-11, 2014.

SHAHVERDI, M.; AKBARINEJAD, V.; DALMAN, A.; HAJINASROLLAH, M.; VOJGANI, M.; VASH, N. T.; EFTEKHARI-YAZDI, P. Effect of Mechanical Micro-Vibrations on The Efficiency of Leopard Inter-Species Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cell journal**, v.24, n.10, p. 612-619, 2022.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483-497, 1998.

SMETANINA, I. G.; TATARINOVA, L. V.; KRIVOKHARCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Ontogenez**, v. 31, n. 2, p. 139-143, 2000.

SOEIRO, N. S. Vibrações e o Corpo Humano: uma avaliação ocupacional. **Acustica e vibrações**. n.53, p.53-62, 2011.

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **The lancet**, v. 312, n.2, p. 366, 1978.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.

TAKAHASHI, M.; HONDA, T.; HATOYA, S.; INABA, T.; KAWATE, N.; TAMADA, H. Efficacy of mechanical micro-vibration in the development of bovine embryos during *in vitro* maturation and culture. **Journal of veterinary medical science**, v. 80, n. 3, p. 532-535, 2018.

TONG, C.; FAN, H. Y.; CHEN, D. Y.; SONG, X. F.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. **Cell research**, v. 13, n. 5, p. 375-383, 2003.

VAN BLERKON J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v.11, n.5, p.797-813, 2011.

VARAGO F.C.; MENDONÇA L.F.; LAGARES M.A. Produção *In Vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; JUNIOR, A. D. P. M. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal reproduction science**, v. 84, n. 1, p. 1-12, 2004.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, n.2, p.577-586, 2014.

WANG, W.; DAY, B. N.; WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes?. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 4, p. 335-341, 2003.

WESTRÖM, L.; MÅRDH, P. A.; VON MECKLENBURG, C.; HÅKANSSON, C. H. Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. **Fertility and sterility**, v. 28, n. 9, p. 955-961, 1977.

YANG, S. H.; YOON, S. H.; JUNG, J. H.; LIM, J. H.; KO, Y. Improvement of embryonic development and clinical outcomes of germinal vesicle stage oocytes using a microvibration culture system. **Systems biology in reproductive medicine**, v.65, n.4, p.333-341, 2019.

YU, Y.; DUMOLLARD, R.; ROSSBACH, A.; LAI, F. A.; SWANN, K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. **Journal of cellular physiology**, v. 224, n.3, p. 672-680, 2010.

APÊNDICE A – ARTIGO

Analysis of vibration during *In Vitro* Maturation (IVM) of bovine oocytes (*Bos taurus*)

**Ruan da Cruz Paulino¹ Marcelo Barbosa Bezerra¹ Beatriz Dantas Fernandes¹
Alexsandra Fernandes Pereira¹ Leonardo Vitorino Costa de Aquino¹ Rafael Kleber
Bronzo¹ Daniel Kleber Bronzo¹**

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte

Correspondence: Ruan da Cruz Paulino, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, ruan.paulino@alunos.ufersa.edu.br

Keywords: Vibrations. Oocyte. In vitro production of embryos. Cattle.

Abbreviations: *In Vitro* Maturation, IVM; *In Vitro* Embryo Production, IVEP; mitochondrial membrane potential, MMP; germinal vesicle rupture, GVQ; germinal vesicle, GV; *Cumulus* Oocyte Complexes, COC.

Biotechnology jornal: Qualis A2

Abstract

The stimulating effect of vibration in living systems plays an important role in mechanical transduction, essential for cell development. In order to increase the success rate of *In Vitro* Embryo Production (IVEP), the use of low frequency vibrations during In Vitro Maturation (IVM) has shown to be promising in terms of the results obtained. In this context, the aim was to evaluate the effect of vibrations and validate a device that emits sound frequencies during the maturation of bovine oocytes. For this, oocytes from ovaries collected in a slaughterhouse were matured and submitted to vibrations during 5 seconds, 60 minutes interval, for 24 hours, at frequencies of 30 and 50 hz, while the control group was maintained without the effect of vibrations. At the end of maturation, the oocytes were exposed to the Hoechst 33342 marker to assess nuclear maturation and Mitotracker Red to assess cytoplasmic maturation and mitochondrial membrane potential (MMP). Data were expressed as mean $\pm$ standard error values. After the verification of normality by Shapiro-Wilk and homoscedasticity of variance by Levene, statistical differences between the experimental groups for each variable studied were verified ($p < 0.05$). In the analyzed variables, there was no significant difference ($P > 0.05$) between the control group and the groups with vibrations of 30Hz and 50Hz. As this is a technology that has yet to be studied, the present study indicates perspectives for new tests with vibrations and prototypes during IVM and other stages of IVP in cattle.

Keywords: Vibrations. Oocyte. *In vitro* Production of Embryos. Cattle.

Introduction

In recent years, productivity in cattle raising has increased significantly, mainly due to the intensive selection of productive traits through reproductive biotechnologies. Biotechniques such as in vitro embryo production are being increasingly improved to maximize the reproductive potential of cattle and improve productivity indicators.^[1] Although IVEP has reached large proportions in Brazil, there are still some limitations, such as the low rate of blastocysts, resulting in an increase in the cost of each embryo produced. The main factor that influences IVEP variation is oocyte competence, that is, the ability of this cell to return meiosis and proceed successfully in the following stages.^[2]

During in vitro maturation and development, culture conditions such as temperature and culture medium composition are adjusted to simulate what occurs *in vivo*. In the traditional technique, the oocytes and embryos are deposited in a Petri dish for static cultivation, opposing

the natural conditions of initial development of embryos in the uterine tube and uterus, where they are transported, receiving mechanical stimuli by muscle and ciliary contractions.^[3]

Studies using oocytes, proved that the rate of blastocyst development was increased by mechanical vibrations provided during *in vitro* maturation and/or development in humans, pigs, mouse, felids and in cattle.^{[4][5][6][7][8]} Embryonic development through vibratory movements happens more quickly, and this fact may be associated with two main factors. Initially, due to an activation of intracellular response, induced by vibrations, which affects gene expression in vascular endothelial cells and through aiding in the residual elimination produced by the cellular metabolism of the embryo ^[8]

During the *in vitro* maturation of bovine oocytes, the only vibration parameters used so far were 20, 40 or 80 Hz, during 5 seconds every 60 minutes.^[8] In this study, the blastocyst development rate increased significantly in the 40 Hz group compared to the control group. However, the efficiency of embryo production can be further improved if it is possible to determine the best vibration magnitude.

Materials and methods

Collection and selection of oocytes

Oocytes were collected by aspiration of ovaries from slaughterhouses and transported to the laboratory in a regulatory solution (0.9% NaCl) heated to 37°C. The oocytes were aspirated from follicles with a diameter between 3 and 8 mm using a 25 mm x 0.8 mm needle, coupled to a 10 ml syringe and transferred to a graduated conical tube for a centrifuge. Then, they were placed in a water bath at 37°C for 10 minutes to decant the *cumulus*-oocyte complexes.

The selection of oocytes was performed with the sediment decanted into Petri dishes, with the aid of a stereomicroscope, and only COCs with homogeneous cytoplasm, with at least three layers of cells, were selected. Selected oocytes were washed in 100 µL drops of washing medium (TCM-199 HEPES supplemented with 10% fetal bovine serum, 22 mg of sodium pyruvate and 50 µg of gentamicin sulfate).

In vitro maturation and mechanical vibrations

Oocytes were matured in 100 µL drops in TCM199® culture medium supplemented with 0.2 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS), 5 µg/ml FSH, 50 µg/ml LH and covered with mineral oil, in a controlled incubator with 5% CO₂ and 38.5°C. Petri dishes from the 30Hz and 50Hz groups were attached to a customized vibration device that produced

vibrations lasting 5 seconds every 60 minutes for 24 hours, while the oocytes from the control group were not submitted to vibrations.

Assessment of nuclear maturation

In the end of maturation, the oocytes were washed three times in PBS and then the *cumulus* cells were removed from the oocytes in drops of hyaluronidase, through repeated aspirations. Oocytes were exposed to Hoechst 33342 dye, at a concentration of 1 µg/mL in PBS, and incubated for fifteen minutes in the dark. After that time, they were washed three times in PBS, transferred to a slide, covered with a drop of glycerol, and the maturation speed evaluated in a fluorescence microscope (excitation 404 nm and emission 526 nm). Oocytes were classified as immature (nuclear configuration in germinal vesicle – GV, germinal vesicle rupture – GVQ, metaphase I) and oocytes in metaphase II were considered mature.

Assessment of cytoplasmic maturation and mitochondrial membrane potential (MMP)

To assess mitochondrial cytoplasmic distribution, oocytes were washed three times in PBS, peeled in hyaluronidase, and incubated for 30 minutes protected from light in PBS plus 500 nM MitoTracker Red® fluorescent probe (CMXRos, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) at 38.5°C. Subsequently, they were washed three times in drops of PBS and analyzed under a fluorescence microscope (excitation 543 nm and emission 575 nm). Oocyte maturation was classified according to the distribution of mitochondria in the cell cytoplasm, as adopted by Katska-Ksiazkiewicz.^[9]

To quantify the mitochondrial membrane potential, images of the oocytes were captured, stored and analyzed in the NIH ImageJ software and the results were expressed in pixels. The signal strength in the background of the image has been decreased from the pixels values. The control group - no vibration was chosen as calibrator and the value of each image was divided by its mean to generate the arbitrary fluorescence units (AUF). The fluorescence intensity is directly proportional to the MMP.

Statistical analysis

Approximately 20 oocytes were used per drop, totaling 6 repetitions for each group. Data were expressed as mean ± standard error, minimum and maximum values using the SAS v8 statistical program (System for Windows - SAS Institute Cary, North California; USA). After verification of normality by Shapiro-Wilk and homoscedasticity of variance by Levene, statistical differences were verified between the experimental groups for each variable studied,

when parametric, through Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test. When the Gaussian distribution was broken, they were analyzed by Kruskal-Wallis. The percentage data will be arcsine transformed. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Regarding nuclear maturation (graph 1), it was observed that there was no significant difference ($P > 0.05$) between the control group (62.5%) and the groups with 30Hz (64.7%) and 50Hz vibrations (69.6%).

Concerning mitochondrial distribution (graph 2), there was no influence ($P > 0.05$) on cytoplasmic maturation among oocytes in the control group (56.09%), in the 30Hz group (60.65%) and 50Hz group (58.67%).

The implementation of different frequencies (graph 3) also did not result in a significant difference ($P > 0.05$) in the mitochondrial membrane potential of oocytes at the end of IVM, which ranged from 0.92 in the 50Hz group to 1.0 in the group control.

Discussion

The study carried out is a pioneer in the evaluation of nuclear and cytoplasmic maturation in bovine oocytes submitted to vibrations and the results presented point out, for the first time, the absence of positive or harmful effects in this stage of the *in vitro* production of embryos.

The results of the present study corroborate previous findings in pigs and humans, in which the application of mechanical vibrations during IVM also did not affect nuclear maturation.^{[5][10]} However, in the same studies there was a greater embryonic development, which may suggest that the beneficial effect of vibrations can be noticed in the stages following maturation.

On the other hand, another research carried out in humans showed that the maturation rates of oocytes cultured in continuous vibration of 10 Hz was higher than that of oocytes in conventional static culture, as well as increased the rate of development of parthenogenetic blastocysts.^[11] Naturally, during passage through the reproductive tract, oocytes and embryos are exposed to both chemical changes and mild mechanical stimuli. In this case, the continuous vibration made it possible to approach the environment that the cells would be subjected to *in vivo*, such as muscle contractions and ciliary movements, that are responsible for moving or fixing the oocytes and embryos.^[12]

However, the methodology applied in the aforementioned study, which used continuous low-frequency vibration differs from the present study, in which the settings of intensity and duration of microvibration used were based on previous research carried out in pigs and in cattle, which applied vibrations at higher and interval intensities.^{[5][8]} The impact of sound pressure is not uniform, as it varies depending on several factors, such as wave frequencies, exposure durations and the harmonic structure of the sound. Consequently, different combinations of these factors can result in varying effects on the environment.^[13]

Fully mature oocytes with a significant amount of mitochondria dispersed throughout the cytoplasm are considered more competent (figure 2), as high levels of mitochondria are linked to ATP production and subsequently to embryonic growth. The fact of not detecting differences between the evaluated groups indicates that the vibration had no deleterious effects and did not interfere in the final development of these cells. In bovine oocytes, impaired cytoplasmic redistribution can reduce cell quality and trigger apoptosis.^{[14][15]}

The findings presented in cytoplasmic maturation differ from those previously reported, where an increase in *in vitro* cytoplasmic activity of pigs oocytes due to mechanical vibration was observed.^[5] This effect was attributed to the enhanced secretion and developmental potential of *cumulus* cells, which are important in supporting the cytoplasmic function of oocytes. However, no direct assessment of cytoplasmic maturation was carried out to prove this hypothesis, which reinforces the assumption that the effect of microvibrations is beneficial during nuclear and cytoplasmic maturation and is perceived in the embryonic stages.

No trend towards an increase in MMP was observed. These observations corroborate previous findings indicating reduced oxygen consumption and low ATP production in early stages of oocytes and embryos. This is consistent with the use of the adenosine rescue pathway by the bovine oocyte as an alternative way of generating ATP to meet its energy needs.^{[16][17]} The quality of oocytes is closely related to the number and function of mitochondria, as they play a crucial role in the maturation process. As the oocyte develops, mitochondria exhibit significant motility and aggregate at local locations.

In the present study, the used vibratory stimulation intensities of 30 and 50 Hz applied to immature oocytes were chosen in order to define the best parameters for the species. Nevertheless, it was observed that there was no increase in the developmental potential of oocytes, and searches could be expanded to different frequencies, as well as to the duration of vibrations and the interval between them.

Acknowledgment

This study was supported and financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and by the Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Conflict of interests

The authors declare that there are no commercial or financial conflicts of interest.

Declaration of data availability

Numerical data supporting the findings of this study are available in Supplementary Material.

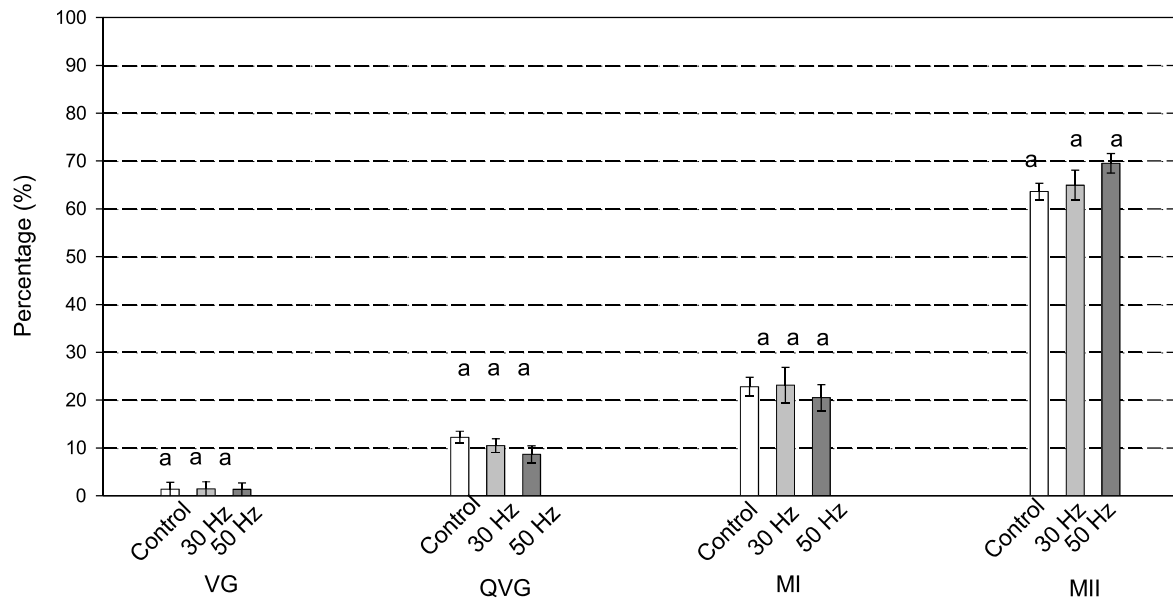
Other data are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

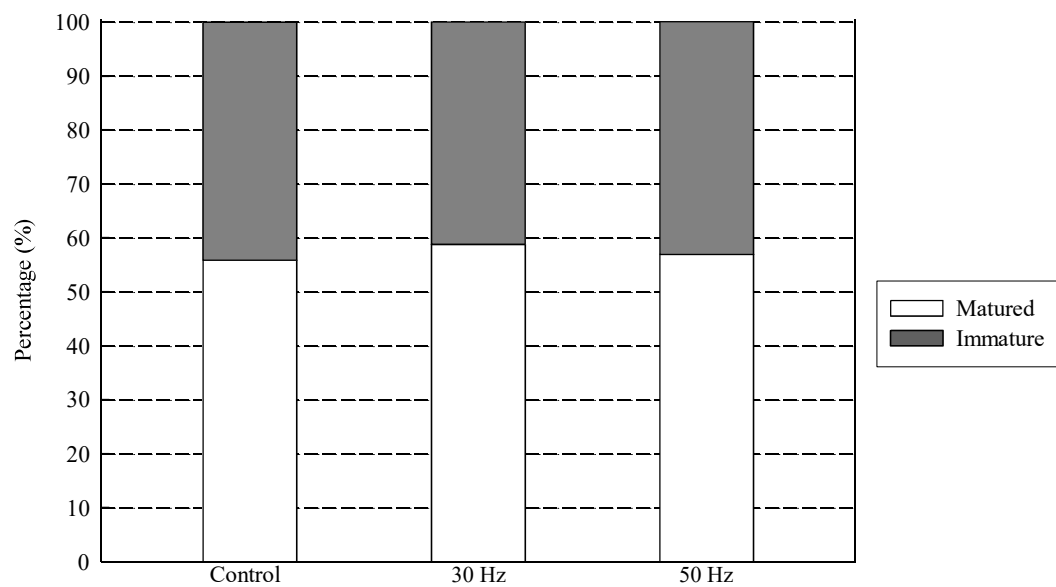
2. Aguila, L., Treulen, F., Therrien, J., Felmer, R., Valdivia, M., & Smith L.C. (2020). Oocyte selection for *in vitro* embryo production in bovine species: Noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 10, 1-24
6. Hur, Y.S., Park, J.H., Ryu, E.K., Park, S.J., Lee, J.H., Lee, S.H., Yoon, J., Yoon, S.H., Hur, C.Y., Lee, W.D., & Lim, J.H. (2013). Effect of micro-vibration culture system on embryo development. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30, 835-841.
9. Kątska-Książkiewicz, L., Alm, H., Torner, H., Heleil, B., Tuchscherer, A., & Rnyska, B. (2011). Mitochondrial aggregation patterns and activity in *in vitro* cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, 75, 662-670.
4. Isachenko, E., Maettner, R., Isachenko, V., Roth, S., Kreienberg, R., & Sterzik, K. (2010). Mechanical agitation during the *in vitro* culture of human pre-implantation embryos drastically increases the pregnancy rate. *Clinical laboratory journal*, 56, 569-576.
3. Isachenko, V., Maettner, R., Sterzik, K., Strehler, E., R., Kreienberg, R., Roth, S., & Isachenko, E. (2011). In-vitro culture of human embryos with mechanical micro-vibration increases implantation rates. *Reproductive biomedicine online*, 22, 536-544.
11. Liu, Q., Zhao, S., Zhou, J., Liu, P., & Huo, B. (2022). Effects of microvibration stimulation on developmental potential of discarded germinal vesicle oocytes of human. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1-7.
17. Lodde, V., Luciano, A.M., Musmeci, G., Miclea, I., Tessaro, I., Aru, M., Albertini, D.F., & Franciosi, F. (2021). A Nuclear and Cytoplasmic Characterization of Bovine Oocytes Reveals That Cysteamine Partially Rescues the Embryo Development in a Model of Low Ovarian Reserve. *Animais*, 11, 1-22.
13. López-Teijón, M., Castelló, C., Asensio, M., Fernández, P., Ferreras, A., Rovira, S., Capdevila, J.M., & Velilla, E. (2015). Improvement of fertilization rates of *in vitro* cultured human embryos by exposure to sound vibrations. *Journal of fertilization*, 3, 1-6.

5. Mizobe, Y., Yoshida, M., Miyoshi, K. (2010). Enhancement of cytoplasmic maturation of *in vitro*-matured pig oocytes by mechanical vibration. *Journal of reproduction and development*, 56, 285-290.
12. Montenegro-Johnson, T. D., Smith, A.A., Smith, D.J., Loghin, D., & Blake, J.R. (2012). Modelling the fluid mechanics of cilia and flagella in reproduction and development. *The european physical journal E*, 35, 1-17.
16. Scantland, S., Tessaro, I., Macabelli, C.H., Macaulay, A.D., Cagnone, G., Fournier, E., Luciano, A.M., & Robert, C. (2014). The adenosine salvage pathway as an alternative to mitochondrial production of ATP in maturing mammalian oocytes. *Biology of reproduction*, 91, 1-11.
7. Shahverdi, M., Akbarinejad, V., Dalman, A., Hajinasrollah, M., Vodjgani, M., Vash, N.T., Nasr-Esfahani, M.H., & Eftekhari-Yazdi, P. (2022). Effect of Mechanical Micro-Vibrations on The Efficiency of Leopard Inter-Species Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell journal*, 24, 612-619.
8. Takahashi, M., Honda, T., Hatoya, S., Inaba, T., Kawate, N., & Tamada, H. (2018). Efficacy of mechanical micro-vibration in the development of bovine embryos during *in vitro* maturation and culture. *Journal of veterinary medical science*, 80, 532-535.
15. Van Blerkon J. (2015). Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, 11, 797-813.
1. Varago, F.C., Mendonça, L.F., & Lagares M.A. (2008). Produção *In Vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista brasileira de reprodução animal*, 32, 100-109.
10. Yang, S.H., Yoon, S.H., Jung, J.H., Lim, J.H., & Ko, Y. (2019). Improvement of embryonic development and clinical outcomes of germinal vesicle stage oocytes using a microvibration culture system. *Systems biology in reproductive medicine*, 65, 333-341.
14. Yu, Y., Dumollard, R., Rossbach, A., Lai, F. A., & Swann, K. (2010). Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *Journal of cellular physiology*, 224, 672–680.

Graph 1- Evaluation of the influence of sound vibration on nuclear maturation after *in vitro* maturation.



Graph 2- Evaluation of the influence of sound vibration on the cytoplasmic maturation of oocytes matured in vitro.



Graph 3- Evaluation of the influence of sound vibrations on the bioenergetic potential of bovine oocytes matured in vitro.

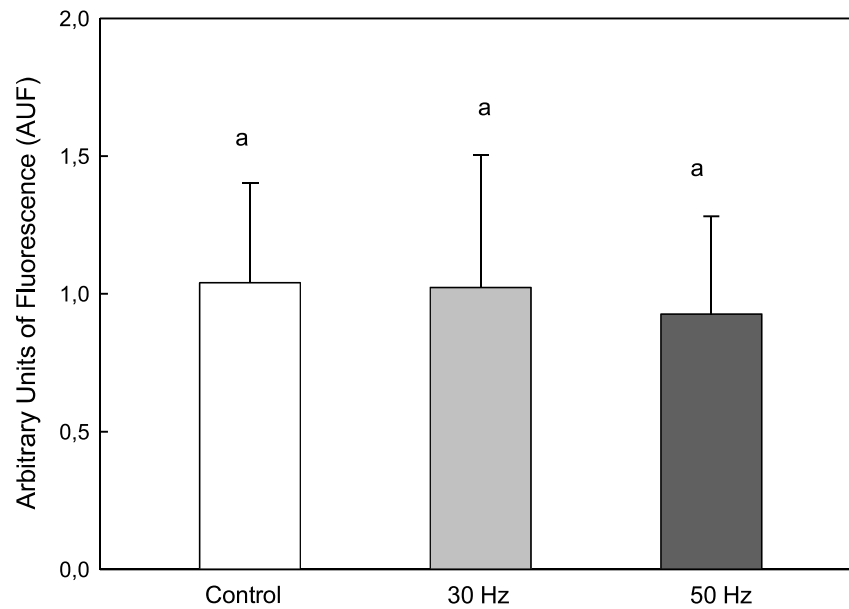


Figure 1- Representative image of matured oocyte stained with Hoechst 33342 probe. Scale bars = 20 μ m. $P > 0,05$.

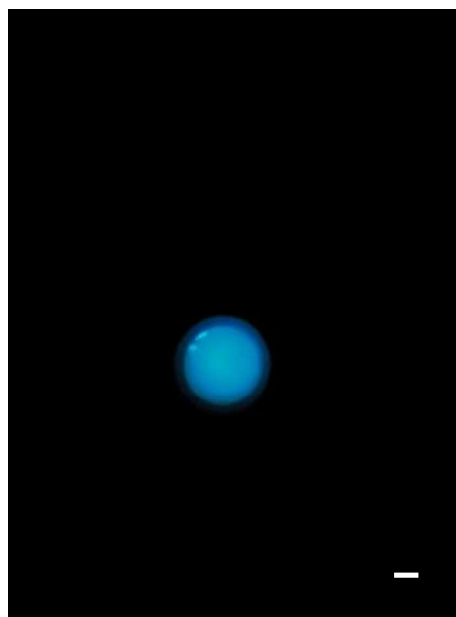


Figure 2- Representative image of mature (arrow) and immature (arrowhead) oocyte stained with MitoTracker Red® probe. Scale bars = 20 μm . $P>0,05$.

