

**RODRIGO DUARTE MARTINS**

**VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS E SEU  
EFEITO NA TAXA DE MATURAÇÃO “IN VITRO”**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M386v  
2004

Martins, Rodrigo Duarte, 1978-  
Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos e seu  
efeito na taxa de maturação “*in vitro*” / Rodrigo Duarte  
Martins. – Viçosa : UFV, 2004.  
xiv, 70f. : il. ; 29cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-70.

1. Bovino - Oócito - Criopreservação. 2. Bovino -  
Oócito - Maturação. 3. Bovino - Reprodução. 4. Etileno-  
glicol. 5. Dissacarídeos. 6. Biotecnologia animal. I. Uni-  
versidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 636.20824

*À minha Juju,*

*Aos meus pais, Hélio e Maria Helena,*

*Aos meus irmãos, Helinho e Icaro,*

*Aos meus avós, Onofre e Rita.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, Aquele que me deu a vida e a vocação, lhe agradeço por mais está vitória.

Aos meus pais, Maria Helena Duarte Martins e Hélio Duarte Martins, por terem compartilhado e alimentado meus ideais, incentivando-me a prosseguir nesta difícil jornada. A vocês que se mantiveram sempre ao meu lado, lutando comigo, dedico minha conquista com a mais profunda gratidão e respeito.

Aos meus irmãos, meus avós, tios, tias, primos e primas, seja pela presença, pela palavra, pelo sorriso ou pela simples lembrança, que me deram coragem e determinação para traçar o caminho em busca de meus objetivos.

À minha Juju, por sempre ter acreditado que eu iria alcançar meus objetivos, mesmo quando nem eu acreditava, por ter estado sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, pela sua paciência nos meus dias de mau humor, pelos seus conselhos, pela sua alegria, pelo seu carinho, pelo seu amor incondicional, enfim, por fazer parte da minha vida.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa, pela orientação, pela oportunidade, pela amizade, pelos conselhos, pelo exemplo de ética profissional e por ter acreditado em meu potencial.

Às estagiárias Juliana Chagas e Fernanda Ignácio, pela amizade, pela paciência, pela ajuda durante todo período experimental e por tornarem o dia-a-dia no laboratório muito mais fácil, alegre e agradável.

Ao estagiário Edirlez Junior (UFG), pela amizade e pela ajuda no difícil início deste trabalho.

Ao Sr. Nenzinho (José Cândido), que com sua alegria e palavras de sabedoria, deixou o dia-a-dia no laboratório muito mais agradável.

Ao proprietário e aos funcionários do Frigorífico Mendonça e Silva (Ubá-MG), pela colaboração na obtenção dos ovários utilizados neste trabalho.

Aos funcionários do Setor de Transportes da UFV, por disponibilizarem o transporte até o frigorífico.

Aos secretários da Graduação, Geraldinho e Cléia, pela gentileza na marcação das viagens para Ubá (MG).

À secretária da Pós-Graduação, Rosi, pela atenção e gentileza nos diversos momentos que tive que incomodá-la.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFV, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões na elaboração final deste trabalho.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela ajuda na análise estatística.

À professora Concepta McManus Pimentel (UnB), por ter acreditado no meu potencial, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa científica e pela ajuda na análise estatística.

Aos professores Alexandre Sardinha Carvalhêdo e Natália Ribeiro dos Santos (UnB), que com sua paixão e dedicação pela área de reprodução animal, me encorajaram a trilhar o mesmo caminho.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf (Embrapa-Cenargen), pela oportunidade de estágio em um centro de excelência, onde pude ter os primeiros contatos com as biotecnologias da reprodução animal.

Aos colegas de mestrado, Adolfo Lima Neto, Alessandra Silva, Carol de Castro, Flávio Lopes, Jeanne Siqueira, Márcio Nunes, Nilo Sá e Thiago Silveira, pelo acolhimento, amizade e convivência agradável.

À colega de mestrado Giorgia Haas, pela amizade e pelo empréstimo da máquina digital que possibilitou as fotos aqui apresentadas.

Aos amigos da República Zona da Mata, Bruno “Lambari” Dourado, Fábio “Balaban”, Mário “Bitoca” Peres, Paulo “Paulão” Franco, Rafael “Múrcia”, Wellington “Cumaru” de Mello, “Tabaco e Coringa” e em especial, Robson “Robgol” Vêras, pela amizade, pelo convívio, pela paciência e pelo companheirismo, seja no dia-a-dia, seja nas festas, cervejadas e noitadas em Viçosa. Brigas, mágoas e brincadeiras passaram. Não nos veremos mais todos os dias, talvez nem todos os anos... Mas certamente, jamais nos esqueceremos...

A todos aqueles que fizeram parte da minha trajetória por Viçosa e que não tiveram os nomes aqui citados,

Obrigado!!!

*“Somos o que repetidamente  
fazemos, portanto a excelência não  
é um feito, mas um hábito.”*

Aristóteles (384-332 a.C.)

## **BIOGRAFIA**

RODRIGO DUARTE MARTINS, filho de Hélio Duarte Martins e Maria Helena Duarte Martins, nasceu em 28 de novembro de 1978, em Brasília – Distrito Federal.

Em fevereiro de 2002, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade de Brasília, em Brasília – Distrito Federal.

Em setembro de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais.



## ÍNDICE

Lista de Tabelas .....	ix
Lista de Figuras.....	x
Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1. SENSIBILIDADE DO OVÓCITO AO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO .....	4
2.2. FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS .....	7
2.2.1. <i>Estágio de Desenvolvimento dos Ovócitos</i> .....	7
2.2.2. <i>Método de Congelamento</i> .....	12
2.2.2.1. Congelamento Lento .....	12
2.2.2.2. Congelamento Rápido .....	14
2.2.2.3. Congelamento Ultra-Rápido .....	15
2.2.3. <i>Os Crioprotetores</i> .....	20
2.2.3.1. Crioprotetores Permeáveis .....	20
2.2.3.2. Crioprotetores Não Permeáveis .....	22
2.2.3.3. Tempo de Exposição aos Crioprotetores .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
3.1. COLETA DOS OVÁRIOS E MANIPULAÇÃO DOS OVÓCITOS .....	26
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	27

3.3. EQUILÍBRIO E VITRIFICAÇÃO DOS OVÓCITOS .....	29
3.4. DESCONGELAMENTO E REIDRATAÇÃO DOS OVÓCITOS.....	30
3.5. TAXA DE RECUPERAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS OVÓCITOS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO .....	31
3.6. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV).....	32
3.7. AVALIAÇÃO DA TAXA DE MATURAÇÃO .....	32
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1. TAXA DE RECUPERAÇÃO DOS OVÓCITOS APÓS O DESCONGELAMENTO E REIDRATAÇÃO .....	34
4.2. MORFOLOGIA DOS OVÓCITOS APÓS O DESCONGELAMENTO .....	37
4.3. TAXA DE MATURAÇÃO DOS OVÓCITOS APÓS O DESCONGELAMENTO E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	45
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos tratamentos proposta no delineamento experimental para vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos .....	28
Tabela 2 - Resumo da análise de variância para taxa de recuperação de ovócitos imaturos após o descongelamento .....	35
Tabela 3 - Resumo da análise de variância para morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento .....	38
Tabela 4 - Efeito da solução de equilíbrio e do tempo de equilíbrio sobre a morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento .....	40
Tabela 5 - Efeito da solução de vitrificação sobre a morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento .....	41
Tabela 6 - Porcentagem de ovócitos com retração citoplasmática após o descongelamento, de acordo com a solução e o tempo de equilíbrio .....	42
Tabela 7 - Resumo da análise de variância para taxa de maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos imaturos após o descongelamento .....	46
Tabela 8 - Taxa de condensação da cromatina após o descongelamento e reidratação, para ovócitos imaturos vitrificados com a solução de vitrificação contendo trealose ou sacarose .....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de maturação nuclear após o descongelamento e reidratação, para ovócitos imaturos vitrificados com a solução de vitrificação contendo trealose ou sacarose .....	47
Figura 2 – Taxa de desenvolvimento ovocitário para os ovócitos não vitrificados (tratamento controle) e para os ovócitos vitrificados em 20% de EG por 5 minutos, com SV contendo 40% de EG + 1,0 mol L <sup>-1</sup> de sacarose (tratamento 14) .....	55
Figura 3 - Ovócito em metáfase II (Tratamento 14) 1000X.....	58
Figura 4 - Ovócito em anáfase I (Tratamento 18) 1000X .....	58
Figura 5 - Ovócito em metáfase I (Tratamento 14) 1000X .....	58
Figura 6 - Ovócito em prófase I (Tratamento 15) 1000X.....	58
Figura 7 - Ovócito com condensação da cromatina (Tratamento 1) 1000X .....	58
Figura 8 - Ovócito com condensação da cromatina (Tratamento 4) 1000X .....	58

## RESUMO

MARTINS, Rodrigo Duarte, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **“Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos e seu efeito na taxa de maturação *in vitro*”**. Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Conselheiros: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, utilizando diferentes tempos e concentrações de etilenoglicol (EG) no equilíbrio, com a solução de vitrificação contendo o EG associado com dois dissacarídeos. Avaliou-se a influência de cada tratamento sobre a taxa de maturação dos ovócitos, após o descongelamento. O experimento foi realizado no LRA-DVT-UFV. Foram testados três soluções de equilíbrio (SE), contendo 3, 20 ou 40% de EG, três tempos de equilíbrio (TE), 0,5, 5 e 15 minutos, e duas soluções de vitrificação (SV), contendo 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de trealose ou 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose. As três SE, os três TE e as duas SV foram combinadas entre si, perfazendo um total de 18 tratamentos. O tratamento controle continha ovócitos frescos não congelados, maturados *in vitro*. Foram utilizados 2.103 ovócitos imaturos, distribuídos em 19 tratamentos. Os ovócitos selecionados foram mantidos imersos na SE (meio-base com 3, 20 ou 40% de EG) por um determinado TE (0,5, 5 ou 15 minutos). Após o término do TE os ovócitos foram transferidos para a SV (meio-base com 40% de EG e 1,0 mol L<sup>-1</sup> de trealose ou 40% de EG e 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose), por um minuto. Durante este tempo, os ovócitos foram envasados em palheta

de 0,25 mL e colocados diretamente no nitrogênio líquido. Os ovócitos foram descongelados por meio da exposição das palhetas por cinco segundos ao ar, seguida da imersão em Banho Maria a 37 °C por 30 a 45 segundos, e reidratados gradativamente em soluções de trealose (para os tratamentos 1 a 9) ou sacarose (para os tratamentos 10 a 18). Após a reidratação, foi avaliado a taxa de recuperação e a morfologia dos ovócitos. Os ovócitos foram cultivados durante 22 a 24 horas. Observou-se que a SE, TE e a SV não influenciaram a taxa de recuperação, mas influenciaram a morfologia dos ovócitos. A SE que continha 40% EG proporcionou maior taxa de ovócitos normais (OVNORM) (76,94%). O TE de 15 minutos proporcionou maior taxa de OVNORM (80,58%) e menor taxa de ovócitos com retração citoplasmática (OVRET) (16,02%). As soluções de vitrificação contendo a trealose também proporcionaram maior OVNORM (76,80%) e menor OVRET (19,93%). As combinações TE por 15 minutos e SE com 3, 20 ou 40% de EG proporcionaram as menores OVRET (17,40; 20,78 e 9,88%, respectivamente). A combinação (tratamento 14) SV com sacarose, TE por cinco minutos, SE com 20% de EG proporcionou a maior taxa de MII (metáfase II) (44,55%). As piores taxas de MII para os ovócitos dos tratamentos que envolveram a sacarose, foram encontradas nas combinações de SE com 40% de EG e TE por 15 e 5 minutos (0,95 e 0,00%, respectivamente). A maior taxa de MII para os ovócitos dos tratamentos que envolveram a trealose foi de 5,32%. As maiores taxas de CC (condensação da cromatina) foram observadas nos tratamentos que envolveram a trealose. Observou-se que a taxa de MII do tratamento 14 foi significativamente diferente do tratamento controle (44,55% e 74,95%, respectivamente). Conclui-se que a avaliação morfológica de ovócitos imaturos após o descongelamento e reidratação, com base na retração citoplasmática, não reflete o verdadeiro potencial de maturação *in vitro* dos ovócitos. O uso da trealose na SV influenciou negativamente a maturação ovocitária. O uso da sacarose na SV influenciou positivamente a maturação ovocitária. Concentrações elevadas de EG (40%) associado a um longo TE (cinco e 15 minutos) não favoreceram o desenvolvimento ovocitário. O protocolo utilizando 20% de EG na SE, com TE de cinco minutos e com a SV contendo 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionou índices razoáveis de maturação *in vitro*, para ovócitos imaturos de bovinos.

## ABSTRACT

MARTINS, Rodrigo Duarte, M.S., Universidade Federal de Viçosa, august 2004. “**Vitrification of immature bovine oocytes and its effect on the *in vitro* maturation rates**”. Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee Members: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

The aim of this study was to evaluate the vitrification of immature bovine oocytes, using different equilibrium times and different concentrations of ethylene glycol (EG) during equilibrium period, with a vitrification solution containing EG associated with two disaccharides. It was evaluated the influence of each treatment on the oocytes maturation rates, after thawing. The experiment was conducted in the LRA-DVT-UFV. It was tested three equilibrium solutions (ES), containing 3, 20 or 40% of EG, three equilibrium times (ET), 0,5, 5 and 15 minutes, and two vitrification solutions (VS), containing 40% of EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> of trehalose or 40% of EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> of sucrose. The three ES, the three ET and the two VS were combined among each other, completing 18 treatments. The controlled treatment had fresh oocytes non vitrified matured *in vitro*. It was used 2.103 immature oocytes, distributed in 19 treatments. The selected oocytes were kept in the ES (base-medium with 3, 20 or 40% of EG) for a determined ET (0,5, 5 or 15 minutes). After the end of the ET, the oocytes were transferred to the VS (base-medium with 40% of EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> of trehalose or 40% of EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> of sucrose), for one minute. During this time, the oocytes were loaded in 0,25 mL

straw and dipped directly in liquid nitrogen. The oocytes were thawed by exposing the straw for five seconds to air, followed by immersion in water bath at 37 °C for 30 to 45 seconds, and were gradually rehydrated in trehalose solutions (for treatments 1 to 9) or sucrose solutions (for treatments 10 to 18). After rehydration, the recovery rate and morphology of the oocytes were evaluated. The oocytes were cultured for 22 to 24 hours. The recovery rate was not affected by ES, ET and VS, but the morphology of the oocytes was. The ES containing 40% of EG showed the highest rate of normal oocytes (NORM) (76,94%). The ET of 15 minutes showed the highest rate of NORM (80,58%) and lowest rate of oocytes with cytoplasmic retraction (CITRET) (16,02%). Vitrification solutions containing trehalose also showed the highest rate of NORM (76,80%) and the lowest rate of CITRET (19,93%). The combinations ET for 15 minutes and ES containing 3, 20 ou 40% of EG showed the lowest rates of CITRET (17,40; 20,78 and 9,88%, respectively). The combination (treatment 14) VS with sucrose, ET for five minutes, ES with 20% of EG showed the highest rate of MII (metaphase II) (44,55%). The lowest rate of MII in the treatments that used sucrose, were found in the combinations ES with 40% of EG and ET for 15 and five minutes (0,95 and 0,00%, respectively). The highest rate of MII in the treatments that used trehalose was 5,32%. The highest rates of CC (chromatin condensation) were found in the treatments that used trehalose. It was observed that the rate of MII of treatment 14 was significantly different from the controlled treatment (44,55% and 74,95%, respectively). The results point out that morphologic evaluation of immature oocytes after thawing and rehydration, based on cytoplasmic retraction, do not reflect the potential of the oocytes for *in vitro* maturation. The use of trehalose in the VS influenced negatively the oocyte maturation. The use of sucrose in the VS influenced positively the oocyte maturation. Elevated concentrations of EG (40%) associated with a long ET (five and 15 minutes) did not favor the oocyte development. The protocol using 20% of EG in the ES, with ET of five minutes and the VS containing 40% of EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> of sucrose, showed good rates of *in vitro* maturation, for immature bovine oocyte.



## 1. INTRODUÇÃO

A estocagem de células em baixas temperaturas permite a sua preservação por um período aparentemente indefinido, sem redução da sua viabilidade. Isso é comprovado pelo grande número de animais domésticos que já nasceram a partir de embriões e espermatozóides mantidos por décadas no nitrogênio líquido (- 196°C).

De fato, particularmente para espécie bovina, observa-se que a criopreservação de embriões proporciona taxas de sobrevivência embrionária relativamente consistentes e comercialmente aceitáveis. Já em relação aos gametas, infelizmente, ainda hoje, a eficiência observada nos métodos de criopreservação dos espermatozóides não se repete com os ovócitos. Se por um lado o sêmen bovino criopreservado tem sido usado comercialmente há décadas e as taxas de concepção obtidas com este sêmen, hoje, são comparáveis as obtidas com a monta natural (WATSON, 2000), os resultados alcançados com a criopreservação de ovócitos bovinos ainda são considerados inconsistentes e extremamente variáveis (VAJTA, 2000).

Durante o congelamento e o descongelamento podem ocorrer injúrias letais ou subletais nas células (COTICCHIO et al., 2004). Essas injúrias ocorrem em decorrência das numerosas situações estressantes as quais as células são submetidas nestes procedimentos, incluindo a formação intra e extra-celular de gelo, desidratação não controlada, formação de bolhas de gás e aumentos na viscosidade e concentração iônica dos meios (SHAW et al., 2000).

A dificuldade em se obter taxas aceitáveis de sobrevivência e funcionalidade ovocitária após a criopreservação ocorre em decorrência, principalmente, do tamanho desta célula e de suas características morfológicas e funcionais únicas, que a tornam mais sensível aos procedimentos de criopreservação.

Diferentes estratégias têm sido testadas na tentativa de se minimizar as injúrias sofridas pela célula ovocitária na criopreservação, visto que, um método eficiente na criopreservação de ovócitos irá proporcionar inúmeros benefícios, tais como, a preservação de recursos genéticos (linhagens genéticas consideradas superiores e espécies em risco de extinção), o comércio nacional e internacional de gametas femininos, o melhor aproveitamento de fêmeas consideradas geneticamente superiores, maior disponibilidade de citoplasmas receptores para uso na transferência nuclear (ATABAY et al., 2004) e principalmente, a maior flexibilidade nas pesquisas e no uso comercial da fecundação *in vitro* (SAUNDERS e PARKS, 1999).

Ainda hoje, a produção *in vitro* de embriões bovinos não é tão difundida e utilizada comercialmente como outras biotecnologias reprodutivas. Acredita-se que uma das principais razões seja a necessidade de um laboratório

adequadamente equipado na própria fazenda ou próximo dela, pois após serem coletados, os ovócitos possuem viabilidade reduzida e precisam ser rapidamente transportados ao laboratório, onde serão realizados a maturação, fecundação e cultivo dos embriões produzidos *in vitro*. O desenvolvimento de um protocolo eficiente para a criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos, diminuirá bastante os custos e tornará o procedimento comercialmente mais viável, pois os ovócitos poderão ser criopreservados na própria fazenda, e transportados com maior facilidade até o laboratório onde será realizada a produção *in vitro* de embriões.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, utilizando diferentes tempos e concentrações de etilenoglicol no equilíbrio, com a solução de vitrificação contendo o etilenoglicol associado a dois dissacarídeos. Avaliou-se a influência de cada tratamento sobre a taxa de maturação dos ovócitos, após o descongelamento.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Sensibilidade do Ovócito ao Processo de Criopreservação**

Os diversos protocolos de criopreservação possuem princípios comuns que objetivam proteger os ovócitos dos efeitos nocivos do resfriamento, da formação intracelular de gelo, da desidratação e dos efeitos tóxicos dos crioprotetores (SHAW et al., 2000).

Os locais da célula ovocitária que parecem ser mais sensíveis a criopreservação são a membrana plasmática (SCHMIDT et al., 1995), o citoesqueleto (SAUNDERS e PARKS, 1999), os microtúbulos (AMAN e PARKS, 1994; WU et al., 1999; SAUNDERS e PARKS, 1999), os cromossomos (AMAN e PARKS, 1994; SAUNDERS e PARKS, 1999), a zona pelúcida (DINNYES et al., 2000) e os grânulos corticais (FUKU et al., 1995).

A análise ultraestrutural de ovócitos após o congelamento (SCHMIDT et al., 1995) revelou que ocorre a movimentação anormal das vesículas lipídicas e das mitocôndrias para a periferia dos ovócitos, além da quebra da membrana plasmática. Esta última também foi observada por SAUNDERS e PARKS (1999). Esses fatos foram correlacionados com o processo de desidratação e

redução de volume que ocorre nos ovócitos durante o congelamento. A formação intracelular de gelo também foi associada a danos à membrana plasmática, o que geralmente é fatal para a célula (OTOI et al., 1994).

A quebra da membrana plasmática parece ocorrer durante a fase de transição da membrana lipídica (ARAV et al., 1996). Essa transição ocorre no momento em que a energia térmica é removida da membrana do ovócito, causando a diminuição da movimentação na bicamada lipídica, aumentando a interação entre moléculas lipídicas e resultando na transição de uma fase mais fluida para outra mais rígida, comprometendo, assim, a integridade da membrana. As alterações de membrana parecem ocorrer principalmente entre 20 e  $-5^{\circ}\text{C}$  (VAJTA, 2000).

Além do efeito sobre os fosfolipídeos de membrana, a criopreservação também parece afetar as proteínas de membrana, causando mudanças de conformação irreversíveis tanto em proteínas periféricas quanto em proteínas integrais da membrana (NARDID et al., 1997), afetando o transporte de íons através dos canais iônicos formados por proteínas (WATSON, 2000).

O resfriamento também pode causar a ruptura dos microfilamentos de actina do citoesqueleto ovocitário (SAUNDERS e PARKS, 1999). Como estes microfilamentos estão ligados a outras estruturas celulares, o seu rompimento também pode ser causado por alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias, decorrentes do resfriamento (SCHMIDT et al., 1995). Esses danos à membrana e a extensiva desorganização citoplasmática podem prejudicar o processo de fertilização levando ao aumento dos índices de poliespermia (OTOI et al., 1995).

Os microtúbulos do fuso mitótico dos ovócitos bovinos também são extremamente sensíveis ao resfriamento e começam a despolimerizar ainda na temperatura de 25°C (AMAN e PARKS, 1994), sendo que o desagrupamento dos microtúbulos é mais extensivo em temperaturas iguais ou menores que 4°C (AMAN e PARKS, 1994; WU et al., 1999). Ao contrário de ovócitos de camundongos, o fuso mitótico não se forma novamente após o descongelamento. Isto ocorre provavelmente devido a falta de material pericentriolar disponível para a ligação dos microtúbulos e formação do fuso após o reaquecimento (SAUNDERS e PARKS, 1999). As alterações de microtúbulos e microfilamentos parecem ocorrer principalmente entre 20 e – 5°C (VAJTA, 2000).

AMAN e PARKS (1994) e SAUNDERS e PARKS (1999) observaram clara dispersão dos cromossomos da placa metafásica durante o procedimento de resfriamento e aquecimento dos ovócitos maduros. Alterações cromossômicas desta natureza podem levar a formação de aberrações cromossômicas nos embriões em desenvolvimento (AMAN e PARKS, 1994). Alterações cromossômicas também são observadas na criopreservação de ovócitos imaturos (LUNA et al., 2001), mas neste caso a alteração é causada pela não extrusão do primeiro corpúsculo polar, levando a formação de células diplóides.

Devido a diferenças de temperatura entre as camadas externas e o centro da solução de congelamento durante a criopreservação, podem se formar rachaduras na amostra congelada, o que pode causar rupturas na zona pelúcida do ovócito durante o congelamento e o descongelamento (DINNYES et al., 2000).

A redução da temperatura também pode levar a liberação prematura dos grânulos corticais, o que por sua vez pode causar o endurecimento da zona pelúcida (FUKU et al., 1995), prejudicando o processo de fertilização. A distribuição irregular dos grânulos corticais também pode ser causada por exposição prolongada aos crioprotetores (HURT et al., 2000).

Essas lesões decorrentes do processo de criopreservação observadas nos ovócitos são as principais responsáveis pela baixa eficiência da técnica. Sendo que existem fatores que podem afetar a incidência destas lesões e o desenvolvimento destes ovócitos após o descongelamento, contribuindo assim para a melhora da eficiência do procedimento. Os principais fatores estão relacionados ao estágio de desenvolvimento do ovócito, ao procedimento de congelamento e à solução crioprotetora.

## **2.2. Fatores que Interferem na Eficiência da Criopreservação de Ovócitos Bovinos**

### **2.2.1. Estágio de Desenvolvimento dos Ovócitos**

Dentro dos folículos ovarianos, até algumas horas antes da ovulação, o ovócito se encontra estacionado no estágio de diplóteno da profase I da meiose, também chamado de estágio dictioteno ou vesícula germinativa (FIGUEIREDO et al., 2002). Neste estágio a cromatina está descondensada e alguns poucos centros organizados de microtúbulos são encontrados na região perinuclear (HOCHI et al., 1998). Momentos antes da ovulação, se observa modificações

citoplasmáticas, envolvendo principalmente a síntese de proteínas e mudanças no número, tamanho e posição de organelas, tais como a migração periférica dos grânulos corticais (GONÇALVES et al., 2002).

Além de mudanças citoplasmáticas, o processo de maturação envolve modificações nucleares, que se iniciam com a retomada da meiose e o núcleo ovocitário entrando em diacinese (FIGUEIREDO et al., 2002).

Com o início da maturação, os centros de microtúbulos citoplasmáticos são recrutados no processo de organização dos microtúbulos (HOCHI et al., 1998). Segue-se então o processo de quebra da vesícula germinativa, seguida das fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, quando então ocorrerá a expulsão do primeiro corpúsculo polar (FIGUEIREDO et al., 2002). Durante a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina, os centros de microtúbulos se combinam com o material pericentriolar nuclear e polimerizam os microtúbulos em direção aos cromossomos condensados iniciando a formação do fuso mitótico, que dará origem a placa metafásica do ovócito maduro (ASADA e FUKUI, 2000). Após a telófase I, se observa a segunda divisão meiótica, que se caracteriza pela prófase II extremamente rápida, seguida pela segunda parada da meiose, que ocorre na fase de metáfase II (FIGUEIREDO et al., 2002).

A correta ocorrência desta sequência de eventos é muito importante pois a habilidade do ovócito em ser fertilizado e desenvolver normalmente, depende tanto da maturação nuclear quanto da maturação citoplasmática (HURT et al., 2000). O ovócito somente reiniciará a meiose se for fecundado pelo espermatozóide (FIGUEIREDO et al., 2002).



Como os ovócitos imaturos apresentam seu material genético envolvido pelo envelope nuclear, acreditava-se que ele fosse mais resistente que o ovócito maduro ao processo de criopreservação (MARTINO et al., 1996). Entretanto, resultados inconsistentes têm sido reportados com a criopreservação de ovócitos imaturos. OTOI et al. (1995) observaram menor taxa de fertilização com ovócitos congelados imaturos em relação aos ovócitos maduros. LE GAL e MASSIP (1999), YANG et al. (2000), LUNA et al. (2001) e BRANDÃO (2001), todos trabalhando com a vitrificação de ovócitos imaturos, obtiveram taxas de maturação muito baixas quando comparadas com o grupo controle não congelado. FAGUNDES (2002) congelou ovócitos imaturos pelo método lento e também obteve taxa de maturação reduzida. MATSUMOTO et al. (2001) obtiveram baixas taxas de fertilização com ovócitos congelados imaturos, sem nenhum embrião se desenvolvendo até o estágio de blastocisto. SOUZA (2001) e COSTA et al. (2002) vitrificaram ovócitos imaturos, com e sem células do *cumulus*, em palhetas de 0,25 mL, e nenhum ovócito se desenvolveu até o estágio de mórula ou blastocisto.

Evidencia-se que os ovócitos imaturos são mais sensíveis ao resfriamento que ovócitos maduros. ZERON et al. (1999) observaram que ao resfriar ovócitos à temperatura de 16°C ocorre maior redução da viabilidade com ovócitos imaturos do que com maduros. Nesta temperatura os ovócitos imaturos apresentam a fase de transição da membrana lipídica, fato correlacionado com a quebra da integridade da membrana plasmática (ARAV et al., 1996). Esta redução na viabilidade também pode estar relacionada com o fato de que o citoesqueleto de ovócitos imaturos é particularmente mais susceptível ao frio

que o citoesqueleto mais flexível de ovócitos em metáfase II (HURT et al., 2000).

Apesar de em alguns aspectos os ovócitos maduros serem menos sensíveis ao resfriamento que os ovócitos imaturos, o fato de seu material genético estar desprotegido da membrana nuclear o deixa mais vulnerável a alterações cromossômicas causadas pelo frio (SAUNDERS e PARKS, 1999). Além disso, nestes ovócitos é observada maior incidência de poliespermia (OTOI et al., 1995; ARAV et al., 1996; HOCHI et al., 1998), fato que é atribuído principalmente a lesões nos microtúbulos e microfilamentos, causadas pelo frio.

SCHELLANDER et al. (1994) congelando ovócitos imaturos e maturados de bovinos pelo método lento, não observaram diferenças entre os dois estágios de maturação. LE GAL e MASSIP (1999) também não observaram diferenças significativas, em termos de desenvolvimento até blastocisto, ao se criopreservar ovócitos imaturos e maduros. Apesar de não ter sido observado diferenças entre os dois estágios de desenvolvimento ovocitários, em ambos trabalhos, os resultados foram considerados muito baixos.

Devido as dificuldades observadas na criopreservação de ovócitos maduros e imaturos, tentou-se o congelamento de ovócitos em outros estágios de desenvolvimento. Comparando ovócitos no estágio de quebra da vesícula embrionária (8 horas de maturação) com ovócitos no estágio de metáfase II (22 horas de maturação), MEN et al. (2002) observaram maior número de ovócitos vivos pós descongelamento e maior taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto para os ovócitos congelados em metáfase II. HOCHI et al. (1998) vitrificaram ovócitos bovinos, em diferentes estágios de maturação (0, 6, 12 e

24 horas de maturação), e observaram taxas de fertilização semelhantes, com tendência de maior taxa de fertilização normal no grupo 12 horas.

Os resultados destes dois experimentos podem ser explicados, em parte, pelo que foi observado por LUNA et al. (2001) e por BRANDÃO (2001). LUNA et al. (2001) demonstraram que ovócitos congelados imaturos e com 8 horas de maturação apresentam maior taxa de diplóidia na maturação pós descongelamento que ovócitos congelados com 12 e 22 horas de maturação, mostrando que o congelamento de ovócitos imaturos e no estágio de quebra da vesícula embrionária pode impedir a extrusão do primeiro corpúsculo polar, levando ao desenvolvimento de células diplóides. BRANDÃO (2001) observou que ovócitos vitrificados com 12 horas de maturação apresentam maior capacidade de recuperação e reestabelecimento da configuração normal da cromatina que ovócitos imaturos, maturando (8 horas) e maduros.

Observa-se que ovócitos no estágio de quebra da vesícula embrionária também possuem alta sensibilidade a baixa temperatura. Aparentemente alguns processos bioquímicos importantes são afetados pela criopreservação, o que influencia negativamente a maturação citoplasmática destes ovócitos (MEN et al., 2002).

Contudo, apesar de nascimentos já terem ocorrido a partir de ovócitos imaturos de bovinos vitrificados (VIEIRA et al., 2002), deve ser ressaltado que índices razoáveis de desenvolvimento até blastocisto, 10,0 a 15,0% (MARTINO et al., 1996), 11,0 a 13,0% (VAJTA et al., 1998), 11,0 a 20,0% (DINNYES et al., 2000) e 29,6% (PAPIS et al., 2000), até o momento, só foram alcançados com a criopreservação de ovócitos maduros.

## 2.2.2. Método de Congelamento

Quando as células são congeladas, elas são submetidas a uma situação de stress resultante de interações água-soluto que levam a formação de cristais de gelo (HOLT, 2000). Soluções crioprotetoras são utilizadas para desidratar a célula, com o intuito de prevenir a formação intracelular de gelo (SHAW et al., 2000). A medida que a água se cristaliza fora da célula, a concentração de solutos na água restante aumenta, aumentando a força osmótica deste meio (WATSON, 2000), e isto retira mais água da célula. Quanto menor a temperatura, mais água se torna gelo, contudo, a quantidade de água que é capaz de sair da célula se reduz a medida que a temperatura ambiente é reduzida (SHAW et al., 2000).

Os métodos de congelamento podem ser divididos de acordo com a velocidade de congelamento em: congelamento lento, congelamento rápido e congelamento ultra-rápido.

### 2.2.2.1. *Congelamento Lento*

O sucesso do congelamento lento depende da taxa de resfriamento ideal que permita o perfeito equilíbrio entre a saída de água da célula e a sua conversão em cristais de gelo fora da célula (SHAW et al., 2000).

No geral as técnicas de congelamento lento envolvem o resfriamento dos ovócitos até a temperatura de “seeding” (ao redor de  $-7^{\circ}\text{C}$ ), a manutenção dos

ovócitos nesta temperatura por alguns minutos, antes ou após o “seeding”, e finalmente o resfriamento (taxa de resfriamento menor que 1°C/min.) até a temperatura de -30°C, seguida pela colocação dos ovócitos direto no nitrogênio líquido (MARTINO et al., 1996).

Comparando diferentes taxas de resfriamento (0,3; 0,6 e 0,9°C por minuto), OTOI et al. (1994) não observaram diferenças na taxa de desenvolvimento até blastocisto, contudo havia tendência de redução da taxa de desenvolvimento a medida que a taxa de resfriamento aumentava. Trabalhando com o congelamento lento (taxa de resfriamento de 0,3°C/min.), OTOI et al. (1995) obtiveram baixas taxas de desenvolvimento até blastocisto entre ovócitos congelados imaturos e maduros. Também com o método de congelamento lento (taxa de resfriamento de 0,5°C/min. e 0,3°C/min., respectivamente), LIM et al. (1999) e SUZUKI et al. (1996) obtiveram taxas de desenvolvimento até blastocisto semelhantes, embora tenham trabalhado com ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (maduros e imaturos, respectivamente). FAGUNDES (2002) não obteve desenvolvimento embrionário congelando ovócitos pelo método lento.

Os baixos resultados encontrados com estes procedimentos podem ser atribuídos ao longo tempo em que os ovócitos são mantidos em temperaturas extremamente críticas (+10°C e -10°C) para a integridade da membrana plasmática e demais organelas (MARTINO et al., 1996).

### 2.2.2.2. *Congelamento Rápido*

Devido a extrema sensibilidade dos ovócitos ao frio foi proposto o aumento da velocidade de congelamento com o intuito de se ultrapassar rapidamente as fases críticas de injúria celular. Nestes protocolos os ovócitos são colocados em soluções com alta concentração de crioprotetores, de forma que as células se tornam altamente desidratadas e podem ser colocadas diretamente no nitrogênio (SHAW et al., 2000).

Na técnica de congelamento rápido (HAMANO et al., 1993), a solução de congelamento e os ovócitos são envasados em palhetas de 0,25 mL, e então colocados diretamente no nitrogênio líquido. Neste método as taxas de resfriamento e de reaquecimento não atingem 2000°C/min. (MATSUMOTO et al., 2001). Tanto no congelamento rápido quanto no ultra-rápido, pode ocorrer o fenômeno da vitrificação em maior ou menor grau. Vitrificação é a solidificação de uma solução em baixas temperaturas sem a formação de cristais de gelo (VAJTA, 2000). Como já enfatizado, os cristais de gelo são extremamente deletérios para a sobrevivência ovocitária.

Com esta metodologia, HAMANO et al. (1993) produziram prenhez a partir de ovócitos maduros criopreservados de bovinos. OTOI et al. (1998) obtiveram taxas de desenvolvimento até blastocisto de 3,3 a 10,0%, também para ovócitos maduros. Já KUCHENMEISTER e KUWAYAMA (1997) e HOCHI et al. (1998) obtiveram taxas de desenvolvimento até blastocisto um pouco menores (1,7 a 5,7% e 4,8%, respectivamente), contudo nestes experimentos trabalhou-se com ovócitos imaturos e maturados por apenas 12 horas, respectivamente.

Os resultados obtidos com esta metodologia ainda são considerados insuficientes. Esta situação pode ser explicada pelo fato de o resfriamento dos ovócitos até  $-196^{\circ}\text{C}$ , com a taxa de resfriamento de  $2000^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ , os expõe por cerca de um segundo às temperaturas críticas ( $+10$  e  $-10^{\circ}\text{C}$ ), tempo suficiente para causar as injúrias associadas a estas temperaturas, segundo MARTINO et al. (1996).

#### 2.2.2.3. *Congelamento Ultra-Rápido*

Como os resultados com as técnicas de congelamento lento e congelamento rápido não têm sido satisfatórios, foram desenvolvidos métodos alternativos que permitem o contato direto entre o nitrogênio líquido e o meio contendo os ovócitos proporcionando aumento significativo nas taxas de resfriamento e de reaquecimento (congelamento ultra-rápido). Dentre esses métodos destaca-se: o uso de grades de microscópio eletrônico (EMGRID - MARTINO et al., 1996), de “Open Pulled Straw” (OPS - VAJTA et al., 1998), de “cryoloop” (LANE et al., 1999), de microgotas em uma superfície de metal resfriada (SSV - DINNYES et al., 2000), de microgotas colocadas diretamente no nitrogênio líquido (PAPIS et al., 2000) e de malha de nylon (MATSUMOTO et al., 2001). Nestas técnicas, além da vantajosa ocorrência da vitrificação, se trabalha com menor volume de solução, o que proporciona congelamento mais homogêneo e menor incidência de fraturas de membrana (HOCHI et al., 1998).

A EMGRID foi usada por MARTINO et al. (1996) com o intuito de se obter taxas de resfriamento elevadas. Essas grades possuem 3,05 mm de diâmetro, com poros de cerca de 55  $\mu\text{m}$ . Grupos de dez a 15 ovócitos são colocados na grade em gotas de um  $\mu\text{L}$ , e em seguida a grade é colocada diretamente no nitrogênio líquido.

Na técnica do OPS (VAJTA et al., 1998), as palhetas de 0,25 mL são aquecidas e esticadas, reduzindo seu diâmetro pela metade, com o intuito de se aumentar a taxa de resfriamento. Os ovócitos são colocados no OPS por capilaridade e em seguida são colocados diretamente no nitrogênio líquido.

O “cryoloop” (LANE et al., 1999) consiste de um arame circular (0,5 a 0,7 mm de diâmetro; 20  $\mu\text{m}$  de largura), que no procedimento de vitrificação é mergulhado na solução de vitrificação, criando um filme bem fino. Com o uso de uma micropipeta, os ovócitos são suspensos neste filme e em seguida o “cryoloop” é colocado no nitrogênio, dentro de um criotubo.

Na SSV (DINNYES et al., 2000), as microgotas (1 a 2  $\mu\text{L}$ ), contendo solução de vitrificação e os ovócitos, são gotejadas sobre a superfície de metal pré resfriado (um cubo de metal parcialmente imerso em nitrogênio líquido) e se vitrificam imediatamente. As microgotas vitrificadas são recolhidas com um fórceps e colocadas em criotubos no botijão de nitrogênio líquido.

PAPIS et al. (2000) vitrificaram os ovócitos em microgotas colocadas diretamente no nitrogênio líquido. Utilizando uma pipeta de Pasteur posicionada a 15 cm do nitrogênio, os ovócitos são jogados em gotas em uma caixa de metal preenchida com o nitrogênio. As microgotas contendo 4 a 8  $\mu\text{L}$



de solução são coletadas utilizando um fórceps resfriado e acondicionadas em criotubos imersos no nitrogênio líquido.

A malha de nylon (MATSUMOTO et al., 2001) consiste em peças de nylon cortadas em forma triangular (base, 1,0 cm, altura, 1,3 cm). Após ser mergulhada na solução de vitrificação, a malha de nylon é colocada sobre um filtro de papel (para remover o excesso de solução) e os ovócitos na solução de vitrificação são colocados sobre a malha, e então a peça de nylon é colocada no nitrogênio líquido.

No geral, os resultados obtidos com estes métodos de congelamento ultra-rápido são melhores que os obtidos com o congelamento rápido. Comparando dois métodos de congelamento, congelamento rápido em palhetas e congelamento ultra-rápido em EMGRID, MARTINO et al. (1996) observaram maior taxa de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto para os ovócitos criopreservados utilizando a EMGRID. LE GAL e MASSIP (1999) compararam o método de congelamento rápido (utilizando palhetas de 0,25 mL) com o método de congelamento ultra-rápido (utilizando o OPS) e obtiveram maior taxa de desenvolvimento até blastocisto utilizando o método de congelamento ultra-rápido.

Existem também diferenças, em termos de eficiência, entre as técnicas de congelamento ultra-rápido. BEGIN et al. (2003) vitrificando ovócitos de caprinos, compararam a SSV e o “cryoloop” e obtiveram maior taxa de sobrevivência utilizando o “cryoloop”. Comparando o uso da malha de nylon com a EMGRID, MATSUMOTO et al. (2001) observaram maior taxa de recuperação e de sobrevivência dos ovócitos após descongelamento utilizando a

malha de nylon. LI et al. (2002) compararam a vitrificação de ovócitos maduros de bovinos em duas metodologias: OPS e SSV. Não se observou diferenças entre as taxas de clivagem e de blastocisto, contudo mostrou-se relativa tendência de melhores resultados para o uso da OPS. LE GAL e MASSIP (1999) também obtiveram melhores resultados com a OPS em comparação com a SSV.

Contudo, DINNYES et al. (2000), utilizando a SSV, obtiveram altas taxas de sobrevivência no pós-descongelamento, o que pode ser atribuído ao método utilizado, que é capaz de atingir altas taxas de resfriamento, e ao uso de microgotas, que permitiu atingir altas taxa de reaquecimento (simplesmente colocando-se a microgota em uma solução aquecida) e a redução de rachaduras.

Até o momento os melhores resultados obtidos na criopreservação de ovócitos bovinos maduros, foram atingidos por PAPIS et al. (2000) que vitrificaram os ovócitos em microgotas colocadas diretamente no nitrogênio líquido e produziram taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto semelhantes ao grupo controle não vitrificado.

Contudo, o fato de que, nas técnicas de congelamento ultra-rápido, a amostra congelada mantém contato direto com o nitrogênio líquido, é um risco potencial para contaminações biológicas. De uma maneira geral, é reconhecido que os procedimentos de coleta, manipulação e criopreservação de sêmen, embriões e ovócitos não são totalmente estéreis (BIELANSKI et al., 2003). Tanto sêmen quanto embriões e ovócitos podem estar associados com um grande número de agentes potencialmente patogênicos (BIELANSKI, 1997) e podem contaminar o nitrogênio líquido quando estocados em containers abertos

ou quando há vazamentos de containers mal fechados ou rachados (RUSSEL et al., 1997; BIELANSKI et al., 2000). BIELANSKI et al. (2003) analisaram amostras de sêmen, embriões e nitrogênio líquido de 16 botijões localizados em dois locais diferentes e encontraram contaminações bacterianas em 69,0% das amostras de nitrogênio, 62,0% das amostras de sêmen e 37,0% das amostras de embriões. BIELANSKI et al. (2000), utilizando botijão que continha nitrogênio líquido previamente contaminado com o vírus da diarreia viral bovina e com o herpes vírus bovino 1, observaram que dos embriões ali estocados, só apresentaram contaminações virais aqueles que foram congelados em containers abertos (ampola não vedada, palheta de 0,25 mL não vedada e OPS). Quando a ampola e a palheta de 0,25 mL foram vedadas não houve contaminação. Portanto, tanto a amostra congelada pode contaminar o nitrogênio quanto o nitrogênio contaminado pode contaminar a amostra que foi congelada aberta.

Deste modo, para trabalhar com segurança utilizando as metodologias de congelamento que permitem o contato direto da amostra congelada com o nitrogênio líquido, é necessário um sistema eficiente de filtragem do nitrogênio (VAJTA et al., 1998) e/ou o uso de containers lacrados (HURT et al., 2000). Se observa em estudos com ovócitos humanos (PARK et al., 2003) e de camundongos (EUN et al., 2002) a substituição do uso de containers abertos, por palhetas vedadas.

Deve ser ressaltado, a dificuldade de acondicionamento no botijão de nitrogênio convencional de itens como, grade de microscópio eletrônico, malha de nylon, criotubos, etc. Com relação a OPS, deve ser considerado ainda a variabilidade no diâmetro destas palhetas, pois elas são preparadas de forma artesanal por cada laboratório.

### 2.2.3. Os Crioprotetores

O principal fator biofísico causador de lesões celulares durante o processo de criopreservação é formação intracelular de gelo, que pode ser evitada por meio da adequada desidratação celular. O processo de desidratação pode ser afetado pela presença de crioprotetores na solução de resfriamento e pelas taxas de resfriamento e de descongelamento (FABBRI et al., 2000).

Os crioprotetores podem ser classificados, de acordo com a sua permeabilidade à membrana celular, em permeáveis: glicerol (GLI), dimetil-sulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG), propanediol (PROH); e em não permeáveis, divididos em carboidratos: sacarose, glicose, lactose, trealose, raffinose; e em polímeros: ficoll, dextran, polivinil pirrolidona (PVP).

#### 2.2.3.1. *Crioprotetores Permeáveis*

O crioprotetores permeáveis atuam por de diferentes mecanismos (FABBRI et al., 2000): reduzindo o ponto de congelamento da solução; interagindo com as modificações da membrana que estão ocorrendo durante o processo de criopreservação; e prevenindo a exposição do ovócito a altas concentrações de eletrólitos intra e extracelular, se ligando aos eletrólitos e substituindo parcialmente a água (RALL et al., 1984).

Existem diferenças quanto a eficácia dos crioprotetores permeáveis na criopreservação de ovócitos bovinos. Comparando três crioprotetores diferentes

(GLI, DMSO e PROH), SCHELLANDER et al. (1994) observaram que o DMSO proporcionou menor taxa de clivagem para ovócitos imaturos, contudo com ovócitos maduros, não se observou diferença em termos de desenvolvimento até blastocisto entre os três crioprotetores. Entretanto, LIM et al. (1999) compararam os mesmos crioprotetores e observaram diferenças na porcentagem de ovócitos morfológicamente normais e na taxa de desenvolvimento até mórula, e demonstraram que o GLI não foi um crioprotetor eficaz para a criopreservação de ovócitos bovinos maduros. Utilizando o GLI como agente crioprotetor no congelamento de ovócitos, SCHMIDT et al. (1995) não obtiveram nenhum ovócito se desenvolvendo até o estágio de blastocisto. Estes resultados demonstram que o GLI pode ser tóxico para os ovócitos.

Entretanto diversos estudos demonstram que o EG seria o crioprotetor ideal (SHAW et al., 1997), pois possui maior permeabilidade de membrana que o GLI (CHA et al., 2000) e menor citotoxicidade que outros crioprotetores permeáveis (MARTINO et al., 1996; CHA et al., 2000; DINNYES et al., 2000).

Soluções de congelamento contendo associações entre os crioprotetores permeáveis (normalmente contendo o EG) e os crioprotetores não permeáveis parecem ser mais vantajosas que soluções contendo apenas um crioprotetor permeável (SHAW et al., 2000).

### 2.2.3.2. *Crioprotetores Não Permeáveis*

Os crioprotetores não permeáveis são representados por moléculas com grandes dimensões que não atravessam a membrana celular, mas aumentam a concentração extracelular de solutos, gerando um gradiente osmótico através da membrana da célula, que induz a saída de água, causando a desidratação celular antes do procedimento de congelamento (FABBRI et al., 2000).

Os carboidratos e os polímeros, quando adicionados à solução de congelamento, auxiliam na desidratação e, conseqüentemente, na diminuição do efeito tóxico da solução por substituírem, em parte, a quantidade de crioprotetores e alterarem muito pouco o estado característico da solução crioprotetora (SHAW et al., 1997; KULESHOVA et al., 1999).

Além disso, os carboidratos são capazes de preservar a integridade funcional e estrutural de membranas em baixa atividade de água (MASSIP et al. 1987). Particularmente, os dissacarídeos melhoram a desidratação osmótica, diminuindo a água intra-celular, reduzindo os danos causados pela cristalização (FEITOSA et al., 2003).

De um modo geral, os dissacarídeos (sacarose e trealose) são os carboidratos mais utilizados na criopreservação de ovócitos. A sacarose age como uma substância estabilizadora, minimizando os efeitos de elevadas concentrações de EG (FAGUNDES, 2002). A trealose parece agir diretamente nos lipídeos e proteínas de membrana alterando seu comportamento (HOLT, 2000), substituindo as moléculas de água da superfície da membrana, inibindo assim a desnaturação e a agregação das proteínas durante a desidratação (PUHLEV et al., 2001).

Por outro lado, KULESHOVA et al. (1999) sustenta que os monossacarídeos (glicose, frutose e sorbitol) parecem ser mais efetivos que os outros açúcares, pois eles combinam baixa toxicidade com habilidade de formar soluções vítreas em baixa concentração de soluto e também são mais facilmente e eficientemente dissolvidos nas soluções crioprotetoras que os dissacarídeos (sacarose e trealose) e polissacarídeos (rafinose). Contudo, LE GAL e MASSIP (1999) vitrificaram ovócitos imaturos de bovinos utilizando a OPS, com a galactose (monossacarídeo) na solução de vitrificação e obtiveram baixa taxa de maturação e de desenvolvimento embrionário. DHALI et al. (2000b) utilizando outro monossacarídeo (glicose) na solução de vitrificação também não observaram aumentos na taxa de maturação, ao vitrificar ovócitos imaturos de bubalinos pelo método rápido.

#### 2.2.3.3. *Tempo de Exposição aos Crioprotetores*

Nos procedimentos de vitrificação, o tempo de exposição dos ovócitos às soluções crioprotetoras deve ser rápido devido os efeitos tóxicos decorrentes das altas concentrações de crioprotetores nestas soluções, contudo se a exposição for rápida demais, a penetração do crioprotetor será inadequada, e podendo se formar gelo intracelular, mesmo na ausência de gelo extracelular (OTOI et al., 1998). A maneira de contornar os efeitos nocivos dos crioprotetores na vitrificação pode ser por meio do aumento crescente, em curtos períodos, das concentrações dos crioprotetores durante o equilíbrio (VAJTA et al., 1998) ou pode ser por meio do aumento no período de

equilíbrio, utilizando concentrações mais baixas de crioprotetores (PAPIS et al., 2000).

Sem equilíbrio, MARTINO et al. (1996), mantendo os ovócitos maduros por apenas 20 segundos na solução de vitrificação, obtiveram bons resultados em termos de desenvolvimento embrionário, utilizando a EMGRID. Por outro lado, MATSUMOTO et al. (2001) não obtiveram nenhum blastocisto ao criopreservar ovócitos imaturos com a EMGRID mantendo-os por apenas 30 a 50 segundos na solução de vitrificação, sem equilíbrio.

Utilizando o equilíbrio por curtos períodos, foram obtidos diversos resultados. VAJTA et al. (1998) vitrificaram ovócitos maduros bovinos utilizando o OPS mantendo-os por 30 a 45 segundos na solução de equilíbrio, seguido por 25 segundos na solução de vitrificação e alcançaram altas taxa de desenvolvimento até blastocisto. Com a mesma técnica (OPS), LE GAL e MASSIP (1999) não encontraram resultados tão expressivos, mantendo os ovócitos maduros por um minuto na primeira solução de equilíbrio, seguido por um minuto na segunda solução de equilíbrio, e por 45 a 60 segundos na solução de vitrificação. HURT et al. (2000), também com a OPS, mantiveram ovócitos imaturos e maduros por 30 segundos na solução de equilíbrio, e 20 a 25 segundos na solução de vitrificação e não observaram diferenças em termos de sobrevivência no pós-descongelamento, de distribuição dos grânulos corticais e de maturação nuclear. MEN et al. (2002), também com a OPS, mantiveram ovócitos em diferentes estágios de maturação por 45 segundos na solução de equilíbrio, seguido por 25 a 30 segundos na solução de vitrificação e observaram maior taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto para os ovócitos congelados em metáfase II.



Utilizando o equilíbrio por longo período e baixas concentrações de crioprotetores, foram obtidos bons resultados com a criopreservação de ovócitos bovinos. KUCHENMEISTER e KUWAYAMA (1997) vitrificaram ovócitos imaturos em palhetas de 0,25 mL, mantendo-os por cinco minutos na solução de equilíbrio e um minuto na solução de vitrificação e obtiveram boas taxas de desenvolvimento embrionário na criopreservação de ovócitos imaturos. PAPIS et al. (2000) vitrificaram ovócitos maduros de bovinos, em microgotas colocadas diretamente no nitrogênio líquido, utilizando o equilíbrio por 12 a 15 minutos, seguido por 30 segundos em solução de vitrificação e produziram taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto semelhantes ao grupo controle não vitrificado. DINNYES et al. (2000) realizaram o equilíbrio por dez a 15 minutos e em seguida lavaram os ovócitos maduros, três vezes, em gotas contendo a solução de vitrificação e vitrificaram os ovócitos na SSV. Com este protocolo conseguiu-se taxas de clivagem semelhante ao grupo controle, não vitrificado.

Uma outra alternativa ao uso de tempos curtos ou longos de equilíbrio, é o uso de três etapas de desidratação, que foi testado por alguns pesquisadores. Realizando o equilíbrio em três etapas de cinco minutos, FAGUNDES (2002) e COSTA et al. (2002) obtiveram baixas taxas de maturação e de desenvolvimento embrionário ao criopreservar ovócitos imaturos. Utilizando duas etapas de cinco minutos, seguido por 1,5 minutos na solução de vitrificação, LE GAL e MASSIP (1999) vitrificaram ovócitos imaturos pelo método rápido e obtiveram taxa de maturação também reduzidas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos**

O experimento foi realizado no período de outubro de 2003 a agosto de 2004, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LRA-DVT-UFV).

Foram utilizados 905 ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça definida e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em matadouro localizado a 60 km da UFV. Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica de 35 a 38<sup>0</sup>C, acrescida de sulfato de estreptomicina (SIRARD e BILODEAU, 1990). Ao término da coleta, os ovários foram transportados, em garrafa térmica, até o LRA-DVT-UFV, em tempo máximo de duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para nova solução fisiológica, acrescida de sulfato de estreptomicina, e colocados em Banho Maria a 37<sup>0</sup>C. Os folículos ovarianos ( $\leq 10$  mm) foram puncionados, utilizando-se agulhas 25 x 7 gauge, acopladas em seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos, foi depositado em cálice cônico contendo

aproximadamente 15 mL de meio Talp-hepes (BAVISTER et al., 1983) mantido a 37<sup>0</sup>C. Ao término da aspiração, aguardou-se aproximadamente dez minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o “pellet” contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice, com o auxílio da pipeta de Pasteur, sendo então transferido para placa de Petri, contendo meio Talp-Hepes, mantida em placa aquecedora a 37<sup>0</sup>C. Com auxílio de um microscópio estereoscópio e uma micropipeta, foram selecionados os ovócitos. Em seguida foram transferidos para outra placa de Petri contendo meio Talp-Hepes e então classificados morfológicamente, segundo COSTA et al. (1997a). Apenas os ovócitos classificados como *cumulus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus* foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo meio Talp-Hepes, e posteriormente utilizados nos tratamentos.

### **3.2. Delineamento Experimental**

O deliamento experimental foi feito no esquema fatorial (3 x 3 x 2) + 1, [3 Soluções de Equilíbrio (SE) X 3 Tempos de Equilíbrio (TE) X 2 Soluções de Vitriificação (SV)] + 1 Grupo Controle, perfazendo um total de 18 tratamentos teste e um tratamento controle.

Foram utilizados 2103 ovócitos imaturos, distribuídos nos 19 tratamentos, com cinco repetições para cada tratamento. Cada repetição continha cerca de 20 ovócitos. Foram testados três soluções de equilíbrio (SE), contendo 3, 20 ou 40% de etilenoglicol (EG), três tempos de equilíbrio (TE),

0,5, 5 e 15 minutos, e duas soluções de vitrificação (SV), contendo 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de trealose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>.2H<sub>2</sub>O) ou 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>).

Tabela 1 - Distribuição dos tratamentos proposta no delineamento experimental para vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos

Tratamento	N	Solução de Equilíbrio	Tempo de Equilíbrio	Solução de Vitrificação
1	121	3% de EG		
2	115	20% de EG	15 minutos	
3	113	40% de EG		
4	108	3% de EG		40% de EG + 1,0 mol L <sup>-1</sup> de trealose
5	108	20% de EG	5 minutos	
6	107	40% de EG		
7	105	3% de EG		
8	112	20% de EG	0,5 minutos	
9	110	40% de EG		
10	112	3% de EG		
11	110	20% de EG	15 minutos	
12	110	40% de EG		
13	109	3% de EG		40% de EG + 1,0 mol L <sup>-1</sup> de sacarose
14	114	20% de EG	5 minutos	
15	110	40% de EG		
16	107	3% de EG		
17	110	20% de EG	0,5 minutos	
18	112	40% de EG		

N: total de ovócitos vitrificados

EG: etilenoglicol

O tratamento controle (0) foi constituído de 110 ovócitos frescos que, imediatamente após a seleção, foram submetidos aos procedimentos de maturação *in vitro* (MIV), conforme descrito posteriormente.

### **3.3. Equilíbrio e vitrificação dos ovócitos**

Os tratamentos foram agrupados três a três (1 a 3; 4 a 6; 7 a 9; 10 a 12; 13 a 15; 16 a 18). A cada coleta de ovários, os ovócitos selecionados foram aleatoriamente divididos em três grupos e submetidos aos procedimentos de equilíbrio e vitrificação de acordo com cada tratamento. Uma vez realizadas as cinco repetições para cada tratamento, passava-se ao próximo grupo de três tratamentos. O tratamento 0 (zero) foi efetuado no momento do descongelamento dos ovócitos dos outros tratamentos, que ocorreu durante o mês de agosto de 2004.

O meio-base utilizado para a manipulação e para as soluções de equilíbrio, vitrificação e reidratação foi o Talp-Hepes, acrescido de 0,4% de Albumina Sérica Bovina (BSA) e ajustado para 285 mOsm/kg (BAVISTER et al., 1983).

Para o processo de equilíbrio, foi utilizada uma placa de vidro com nove escavações. Os ovócitos selecionados que estavam em meio Talp-Hepes, foram transferidos (oito de cada vez, em média) para uma das escavações que continha a SE (meio-base com 3, 20 ou 40% de EG). Os ovócitos foram mantidos imersos na SE por um determinado TE (0,5, 5 ou 15 minutos). Após o término do TE os ovócitos foram transferidos para outra escavação que continha a SV

(meio-base com 40% de EG e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de trealose ou 40% de EG e  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose). Na SV, os ovócitos de todos os tratamentos foram mantidos por um minuto. Durante este tempo, os ovócitos foram envasados em palheta de 0,25 mL, no seguinte esquema: uma coluna de SV, seguida de uma coluna de ar, uma coluna de SV contendo os ovócitos, uma coluna de ar, e mais uma coluna de SV. As palhetas foram vedadas e, ao término do um minuto, foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido. Aproximadamente metade da palheta foi colocada rapidamente no nitrogênio e o restante foi colocado lentamente.

#### **3.4. Descongelamento e reidratação dos ovócitos**

Os ovócitos de todos os tratamentos foram descongelados por meio da exposição das palhetas por cinco segundos ao ar, seguida da imersão em Banho Maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 a 45 segundos.

Após a imersão em Banho Maria, os ovócitos foram reidratados gradativamente em soluções de trealose (para os tratamentos 1 a 9) ou sacarose (para os tratamentos 10 a 18).

Para a reidratação foi utilizada uma placa de vidro escavada com nove escavações. O conteúdo das palhetas (ovócitos na SV) foi depositado na primeira escavação, que continha  $300 \text{ } \mu\text{L}$  de meio-base com  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de trealose ou sacarose. Neste meio os ovócitos permaneceram por no máximo um minuto. Em seguida os ovócitos foram transferidos sucessivamente para a

segunda, terceira e quarta escavação, que continham, respectivamente, 500  $\mu\text{L}$  de meio-base com 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  de trealose ou sacarose, 500  $\mu\text{L}$  de meio-base com 0,33 mol  $\text{L}^{-1}$  de trealose ou sacarose e 500  $\mu\text{L}$  de meio-base com 0,17 mol  $\text{L}^{-1}$  de trealose ou sacarose. Em cada uma destas soluções os ovócitos foram mantidos por um minuto. Ao término da última reidratação, os ovócitos foram lavados sucessivamente em meio Talp-Hepes. Para tanto, foram transferidos para a quinta, sexta e sétima escavação, que continham 500  $\mu\text{L}$  de meio Talp-Hepes. Todos os meios utilizados na reidratação estavam aquecidos a 37°C. Na sétima escavação os ovócitos foram avaliados com auxílio de um microscópio estereoscópio, e obteve-se a taxa de recuperação e a classificação morfológica.

### **3.5. Taxa de recuperação e classificação morfológica dos ovócitos submetidos ao processo de vitrificação**

A taxa de recuperação consistiu do número de ovócitos contabilizados após o final da reidratação, em relação ao total de ovócitos envasados e vitrificados.

Os ovócitos foram classificados morfológicamente, segundo PARK et al. (1997), em ovócitos:

- Com fratura de zona pelúcida: caracterizada pelo rompimento da zona pelúcida, sem rompimento da membrana plasmática;
- Com perda do conteúdo celular: caracterizada pelo rompimento da zona pelúcida e da membrana plasmática, com perda do conteúdo citoplasmático;

- Com retração citoplasmática: caracterizada pela retração do citoplasma sem rompimento da zona pelúcida e da membrana plasmática;
- Normais: ovócitos sem as alterações anteriormente citadas;

Após a classificação, os ovócitos normais e os com retração citoplasmática foram submetidos ao processo de maturação *in vitro*. O restante foi descartado.

### **3.6. Maturação *in vitro* (MIV)**

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 10 µg/mL de FSH (COSTA, 1994). A maturação foi realizada em placas de Petri de 35 milímetros de diâmetro, contendo 1,5 mL de meio de maturação previamente equilibrado por no mínimo duas horas à 38,5 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 22 a 24 horas. Após este período foram submetidos a avaliação da taxa de maturação.

### **3.7. Avaliação da taxa de maturação**

Para avaliação da taxa de maturação, os ovócitos de todos os tratamentos foram inicialmente submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus*



*oophorus* (COSTA et al., 1997b). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâminas e corados com orceína a 2%, segundo COSTA et al. (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1000X em imersão, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração dos cromossomos, em metáfase II (MII), anáfase I (AI), metáfase I (MI), prófase I (PI), cromatina condensada (CC) ou sem configuração cromossômica (SCC). Foi considerado com maturação nuclear, o ovócito que apresentou configuração cromossômica em metáfase II, e também o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente.

### **3.8. Análise Estatística**

A análise foi montada segundo um esquema fatorial (3 x 3 x 2) + 1, [3 Soluções de Equilíbrio (SE) X 3 Tempos de Equilíbrio (TE) X 2 Soluções de Vitriificação (SV)] + 1 Grupo Controle, com cinco repetições. Os dados foram transformados (transformação angular) e analisados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias dos fatores foram comparadas utilizando o teste t, com 5% de probabilidade de erro. Os dados foram analisados através do programa estatístico SAS (1999).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Taxa de recuperação dos ovócitos após o descongelamento e reidratação

A Tabela 2 apresenta a análise de variância para a taxa de recuperação dos ovócitos após o descongelamento e reidratação. Observa-se que a solução de equilíbrio (SE), o tempo de equilíbrio (TE) e a solução de vitrificação (SV) não influenciaram a taxa de recuperação.

Resultados semelhantes foram observados por outros pesquisadores. SCHELLANDER et al. (1994) não verificaram efeito da concentração (1,0 ou 1,5 mol L<sup>-1</sup>) e do tipo de crioprotetor (glicerol, propanediol e DMSO) sobre a taxa de recuperação. LIM et al. (1999) também não observaram influencia do tipo de crioprotetor (glicerol, DMSO e propilenoglicol) sobre a taxa de recuperação. DHALI et al. (2000a) e DHALI et al. (2000b) também não observaram efeito do tempo de equilíbrio e da solução de vitrificação sobre a taxa de recuperação. WANI et al (2004b) testaram diferentes concentrações (3,5; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mol L<sup>-1</sup>) e diferentes crioprotetores (DMSO,

etilenoglicol, propanediol e glicerol) e encontraram taxas de recuperação semelhantes.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para taxa de recuperação de ovócitos imaturos após o descongelamento

Fonte de Variação	GL	Taxa de Recuperação Média = 96,91% ( $\pm$ 4,89)*
SE	2	NS
TE	2	NS
SE x TE	4	NS
SV	1	NS
SE x SV	2	NS
TE x SV	2	NS
SE x TE x SV	4	NS
Resíduo	72	-
Total	89	-

NS: não significativo; GL: graus de liberdade

SE: solução de equilíbrio; TE: tempo de equilíbrio; SV: solução de vitrificação

\* Total de ovócitos vitrificados: 1993

Além dos fatores aqui analisados, a taxa de recuperação parece não ser influenciada pelo estágio de desenvolvimento do ovócito (FAGUNDES, 2002) e pelo método de congelamento, rápido ou lento (SOUZA, 2001; FAGUNDES 2002).

De um modo geral, a taxa de recuperação parece ser influenciada principalmente pela dificuldade de manipulação dos ovócitos, o que depende,

em parte, do tipo de ovócito vitrificado (desnudo ou não), do container utilizado na sua vitrificação e da técnica utilizada. SOUZA (2001), ao comparar a taxa de recuperação de ovócitos vitrificados desnudos e com células do *cumulus*, observaram menor recuperação com ovócitos desnudos. O autor sustenta que a elevada viscosidade da solução de reidratação aliada a dificuldade de visualização de ovócitos desnudos dificulta a recuperação e manipulação dos mesmos. MATSUMOTO et al. (2001) compararam dois containers de vitrificação (EMGRID e malha de nylon) e observaram redução da taxa de recuperação ao utilizar a grade, em virtude da dificuldade de manipulação dos ovócitos durante a colocação e retirada dos mesmos deste container. BEGIN et al. (2003) compararam duas técnicas (SSV e “cryoloop”) que não utilizam containers na vitrificação de ovócitos de caprinos e observaram redução da taxa de recuperação. No caso do “cryoloop”, este método impede que o manipulador visualize os ovócitos durante o procedimento e se o “cryoloop” tocar a parede interna do tubo de estocagem a amostra pode ser perdida. No uso da SSV, ovócitos podem ser perdidos ao ficarem presos na pipeta ou ao se dispersarem quando a gota de vitrificação cai sobre a superfície de metal pré resfriado.

A taxa média de recuperação dos ovócitos após o descongelamento foi de 96,91% (Tabela 2) de um total de 1.993 ovócitos vitrificados. Taxas de recuperação acima de 90,0% também foram observadas por HAMANO et al. (1992), 95,0 a 96%; SCHELLANDER et al. (1994), 90,0 a 95,0%; LIM et al. (1999), 93,0 a 96,0%; MATSUMOTO et al. (2001), 94,0 a 97,0%; DHALI et al. (2000a), 91,0%; SOUZA (2001), 92,2%; FAGUNDES (2002), 92,6 a 97,5%. Taxas inferiores a 90,0% foram observadas por MATSUMOTO et al. (2001),

84,0%, por SOUZA (2001), 79,0% e por BEGIN et al. (2003), 74,0 a 86,0%, em virtude de dificuldades na manipulação dos ovócitos.

#### **4.2. Morfologia dos ovócitos após o descongelamento**

Em relação a morfologia, observa-se (Tabela 3) que apenas a porcentagem de ovócitos normais sofreu influência da solução de equilíbrio (SE). As porcentagens de ovócitos normais e com retração citoplasmática foram influenciadas pelo tempo de equilíbrio (TE). As porcentagens de ovócitos normais e de ovócitos com retração citoplasmática e com perda do conteúdo citoplasmático sofreram influência do tipo de solução de vitrificação (SV). Apenas a porcentagem de ovócitos com retração citoplasmática sofreu efeito da interação SE x TE.

A taxa de ovócitos morfologicamente normais parece ser influenciada por uma série de fatores, tais como o tipo de crioprotetor (LIM et al., 1999; WANI et al., 2004b), a concentração de crioprotetor (OTOI et al., 1998; WANI et al., 2004b), o tempo de equilíbrio (OTOI et al., 1998; DHALI et al., 2000b), o estágio de desenvolvimento do ovócito congelado (OTOI et al., 1995; BRANDÃO, 2001; FAGUNDES, 2002), o grau de desnudamento do ovócito congelado (SOUZA, 2001, FAGUNDES, 2002), a técnica utilizada (BEGIN et al., 2003) e o container utilizado (MARTINO et al., 1996).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento

Fonte de Variação	GL	Morfologia			
		Normal (%)	Retração Citoplasmática (%)	Fratura de Zona Pelúcida (%)	Perda de Conteúdo Citoplasmático (%)
SE	2	*	NS	NS	NS
TE	2	**	**	NS	NS
SE x TE	4	NS	*	NS	NS
SV	1	**	**	NS	*
SE x SV	2	NS	NS	NS	NS
TE x SV	2	NS	NS	NS	NS
SE x TE x SV	4	NS	NS	NS	NS
Resíduo	72	-	-	-	-
Total	89				
Média (± desvio padrão)		74,25 (± 8,93)	23,27 (± 9,15)	1,80 (± 3,33)	0,66 (± 2,10)

NS: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; GL: graus de liberdade

SE: solução de equilíbrio; TE: tempo de equilíbrio; SV: solução de vitrificação

De um modo geral (Tabela 3), a incidência das anormalidades fratura de zona pelúcida e perda do conteúdo citoplasmático foi baixa (1,80 e 0,66%, respectivamente). Isto pode ter ocorrido devido ao uso de ovócitos imaturos com células do *cumulus*. CAMARGO (1995) e FAGUNDES (2002) sustentam que a presença das células do *cumulus* protege a zona pelúcida, reduzindo a ocorrência de lise de zona pelúcida e membrana plasmática durante os

procedimentos de criopreservação. É também provável que as células do *cumulus* possam oferecer alguma proteção contra as súbitas mudanças osmóticas que podem ser induzidas durante o rápido influxo ou efluxo de crioprotetores no momento de pré e pós-congelamento, respectivamente (FABBRI et al., 2000).

Dentre as soluções de equilíbrio, a que continha 40% EG proporcionou maior taxa de normalidade, em números absolutos (76,94%; Tabela 4). OTOI et al. (1998) encontraram resultados semelhantes ao criopreservar ovócitos maduros pelo método rápido, utilizando 40% de EG + 0,35 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (79,40% de normalidade) e 50% de EG + 0,35 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (76,90% de normalidade). Resultados superiores foram observados por DHALI et al. (2000a), que testando duas SV (25% de EG + 24,28% de DMSO + 5,56 mol L<sup>-1</sup> de glicose e 19,44% de EG + 24,28% de DMSO + 5,56 mol L<sup>-1</sup> de glicose) sem equilíbrio, não observaram diferenças quanto taxa de normalidade (89,0 a 86%) ao vitrificar ovócitos imaturos de bubalinos pelo método rápido. WANI et al. (2004b), ao testar quatro soluções de vitrificação (DMSO, EG, propanediol e glicerol) em cinco concentrações (3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 mol L<sup>-1</sup>) na vitrificação de ovócitos imaturos de bubalinos, obtiveram taxas de normalidade superiores a 90,0% quando utilizaram concentrações maiores (5,0, 6,0 e 7,0 mol L<sup>-1</sup> de DMSO, EG e propanediol).

Tabela 4 - Efeito da solução de equilíbrio e do tempo de equilíbrio sobre a morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento

SE	N	Morfologia
		Normal (%)*
3% de EG	30	73,39 <sup>a,b</sup>
20% de EG	30	72,41 <sup>a</sup>
40% de EG	30	76,94 <sup>b</sup>
TE		
0,5 min.	30	71,01 <sup>a</sup>
5 min.	30	71,16 <sup>a</sup>
15 min.	30	80,58 <sup>b</sup>

\*Médias, na mesma coluna e dentro de cada fator, seguidas por letras diferentes diferem entre si ( $P < 0,05$ )

N: número de repetições

SE: solução de equilíbrio; TE: tempo de equilíbrio;

Com relação ao tempo de equilíbrio (Tabela 4), o tempo de 15 minutos proporcionou maior taxa de normalidade (80,58%). Resultados superiores foram observados por DHALI et al. (2000b), que testando dois tempos de exposição (um e três minutos), não observaram diferenças quanto à taxa de normalidade (89,0 a 86%) ao vitrificar ovócitos imaturos de bubalinos pelo método rápido.



Soluções de vitrificação contendo a trealose (Tabela 5) também proporcionaram maior taxa de normalidade (76,80%) e menor taxa de retração citoplasmática (19,93%) que as que continham sacarose. A SV contendo a sacarose apresentou a menor incidência de perda do conteúdo citoplasmático (0,10%). Baixas taxas de normalidade após o descongelamento (7,30 a 8,20%) foram observadas por OTOI et al. (1995) ao criopreservar ovócitos imaturos, pelo método lento, utilizando o EG associado a sacarose. Utilizando SV com trealose (35% de EG + 5% de PVP + 0,4 mol L<sup>-1</sup> de trealose), BEGIN et al. (2003), vitrificando ovócitos de caprinos no método ultra-rápido (SSV), obtiveram taxa de normalidade após o descongelamento semelhante (77,0%). Trabalhando com o EG associado a trealose e ao PVP, e congelando ovócitos imaturos de bovinos pelo método rápido, SOUZA (2001) também obteve taxas de normalidade semelhantes, para ovócitos com células do *cumulus* (72,6%).

Tabela 5 - Efeito da solução de vitrificação sobre a morfologia dos ovócitos imaturos após o descongelamento

SV	N	Morfologia		
		Normal (%)*	Retração Citoplasmática (%)*	Perda do Conteúdo Citoplasmático (%)*
Trealose	30	76,80 <sup>a</sup>	19,93 <sup>a</sup>	1,23 <sup>a</sup>
Sacarose	30	71,69 <sup>b</sup>	26,61 <sup>b</sup>	0,10 <sup>b</sup>

\*Médias, na mesma coluna, seguidas por letras diferentes, diferem entre si (P < 0,05)

N: número de repetições

SV: solução de vitrificação

Analisando a interação SE x TE (Tabela 6), verificou-se que as combinações, TE por 15 minutos e SE com 3, 20 e 40% de EG proporcionaram as menores taxas de retração citoplasmática (17,40; 20,78 e 9,88%, respectivamente). SOUZA (2001) obteve taxa de retração citoplasmática ainda mais baixa (6,84%), contudo, outras alterações foram mais importantes (perda do conteúdo celular e citoplasma vacuolizado).

Tabela 6 - Porcentagem de ovócitos com retração citoplasmática após o descongelamento, de acordo com a solução e o tempo de equilíbrio

SE	TE	N	Retração Citoplasmática (%)*
3% de EG	0,5 min.	10	26,17 <sup>a,b</sup>
	5 min.	10	27,15 <sup>a</sup>
	15 min.	10	17,40 <sup>c</sup>
20% de EG	0,5 min.	10	25,27 <sup>a,b</sup>
	5 min.	10	28,25 <sup>a</sup>
	15 min.	10	20,78 <sup>b,c</sup>
40% de EG	0,5 min.	10	28,28 <sup>a</sup>
	5 min.	10	26,26 <sup>a,b</sup>
	15 min.	10	9,88 <sup>d</sup>

\* médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05)

N: número de repetições

SE: solução de vitrificação; TE: tempo de equilíbrio

Alguns estudos observaram a ocorrência da retração citoplasmática, contudo sem quantificá-la (CAMARGO, 1995; MARTINO et al., 1996) e outros poucos, chegaram a quantificá-la (SOUZA, 2001; FAGUNDES, 2002). ARAV et al. (1993) e SOUZA (2001) sustentaram que, de acordo com a intensidade, a retração citoplasmática pode alterar a relação espacial entre as organelas, comprometendo a organização citoplasmática e a integridade da membrana, prejudicando assim, a maturação e a fecundação.

Com base no exposto, era de se esperar que os tratamentos que tiveram altos índices de retração citoplasmática (a maior parte dos tratamentos que continham a sacarose na SV) deveriam ter baixos índices de maturação *in vitro*, visto que, tanto os ovócitos normais quanto os com retração foram colocados em cultivo. Contudo, como será apresentado posteriormente, os tratamentos que continham a sacarose na SV apresentaram as melhores taxas de maturação. Apenas a incidência de perda do conteúdo citoplasmático, que foi menor nos tratamentos com sacarose, correspondeu a esta expectativa.

Duas situações podem ter ocorrido: ou os ovócitos que apresentaram retração citoplasmática em menor intensidade se recuperaram durante o cultivo e alguns atingiram o estágio de MII, e/ou os que estavam normais apresentaram taxa de maturação muito mais elevada. Contudo, a única forma de ter a certeza do que aconteceu, seria ter realizado o cultivo em dois grupos (normais e retração citoplasmática) e talvez ter dividido a retração citoplasmática em graus de intensidade.

Ainda deve ser enfatizado, que conforme ocorreu em outros trabalhos (YANG et al., 1994; CAMARGO, 1995; DHALI et al., 2000a; DHALI et al.,

2000b; SOUZA, 2001; FAGUNDES, 2002; WANI et al., 2004b), os tratamentos que apresentaram as mais altas taxas de normalidade, tiveram a maturação reduzida.

Estes fatos nos levam a questionar a validade da análise morfológica de ovócitos após o descongelamento. Segundo LUVONI e PELIZZARI (2000), a relação entre morfologia e capacidade de maturação *in vitro* pode não existir, quando se refere a ovócitos criopreservados, pois, podem ocorrer lesões importantes no citoplasma sem que a morfologia seja alterada.

Alterações de colorações (cor pálida e amarelada) foram usadas por alguns pesquisadores (LIM et al., 1991; OTOI et al., 1997) para classificar os ovócitos anormais, contudo, mesmo estas alterações, podem passar despercebidas, como enfatizou MARTINO et al. (1996) que encontraram dificuldades para avaliar os ovócitos logo após o descongelamento, ficando as anormalidades mais nítidas, após 22 horas de cultivo.

Uma forma segura de quantificar alterações morfológicas de membrana, é a utilização de corantes especiais, como o azul de tripan, que é um corante de rápida e fácil aplicação e inócuo a célula viva, permitindo a continuidade de seu desenvolvimento (DIDION et al., 1990; ARAV et al., 1993). Contudo, a utilização de apenas quantificação de danos à membrana (utilizando o azul de tripan), não foi suficiente para explicar o comportamento dos ovócitos após o descongelamento (em termos de desenvolvimento), nos experimentos realizados por BRANDÃO (2001), com a vitrificação de ovócitos de bovinos em diferentes estágios de maturação.

Sendo assim, para diminuir a chance de erro nas avaliações morfológicas de ovócitos após o descongelamento, sugere-se então a combinação de técnicas: avaliação da coloração e textura, uso de corantes inócuos e avaliação após o cultivo.

#### **4.3. Taxa de maturação dos ovócitos após o descongelamento e maturação *in vitro***

Observa-se (Tabela 7) que a solução de equilíbrio (SE), o tempo de equilíbrio (TE) e a solução de vitrificação (SV) influenciaram a taxa de metáfase II (MII), metáfase I (MI) e condensação da cromatina (CC), sendo que a SV não influenciou a taxa de CC.

Analisando a interação SE x TE x SV, observa-se (Figura 1) que a combinação SV com sacarose, TE por cinco minutos, SE com 20% de EG (tratamento 14) proporcionou a maior taxa de MII (44,55%). Com protocolo idêntico, KUCHENMEISTER e KUWAYAMA (1997) vitrificaram ovócitos imaturos em palhetas de 0,25 mL, e obtiveram taxa de clivagem de 42,0% e de desenvolvimento até blastocisto de 5,7%. Contudo, no referido estudo a reidratação com sacarose foi feita na própria palheta (método “one-step”), diferente do método convencional utilizado no presente experimento. Estudos com embriões bovinos congelados no método “one-step” indicam que as taxas de gestação obtidas com este método são geralmente 5,0 a 10,0% inferiores ao método convencional de reidratação (REICHENBACH et al., 2002). Sendo

assim, é possível que o método de reidratação aqui utilizado tenha sido mais eficiente, contudo, a comparação direta fica impossibilitada, visto que, os referidos autores não avaliaram a taxa de maturação.

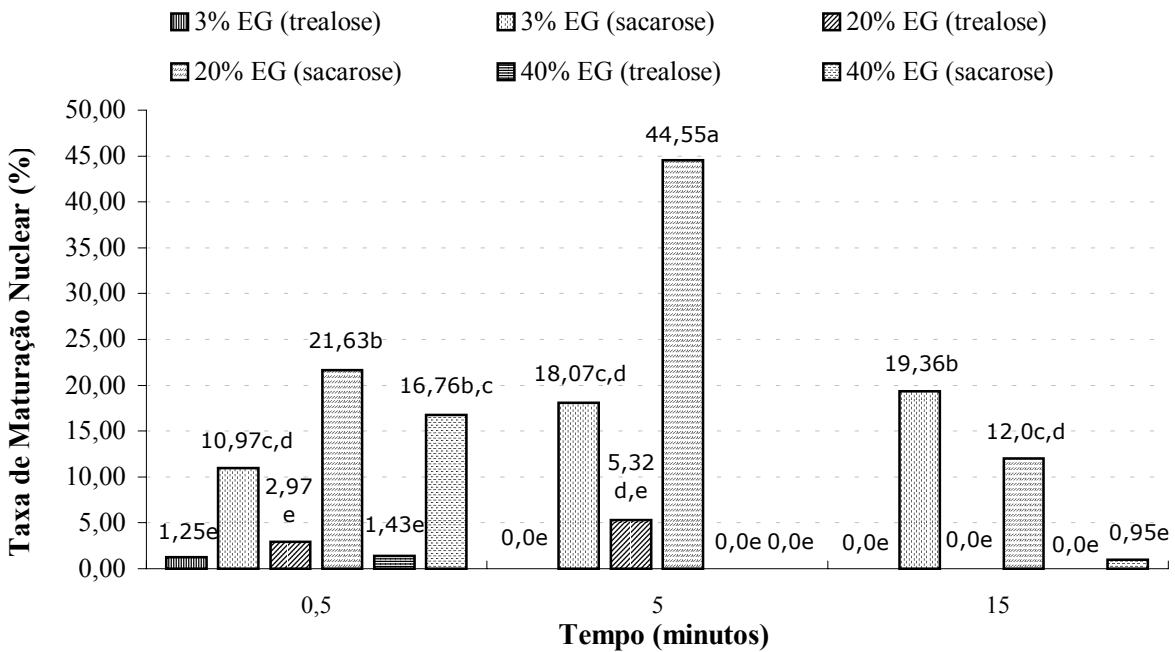
Tabela 7 – Resumo da análise de variância para taxa de maturação *in vitro* dos ovócitos imaturos após o descongelamento

Fonte de Variação	GL	Maturação <i>in vitro</i>					
		MII (%)	AI (%)	MI (%)	PI (%)	CC (%)	SCC (%)
SE	2	**	NS	**	NS	**	NS
TE	2	**	NS	**	NS	**	NS
SE x TE	4	**	NS	**	NS	**	NS
SV	1	**	NS	**	NS	NS	NS
SE x SV	2	**	NS	NS	NS	NS	NS
TE x SV	2	NS	NS	NS	NS	NS	NS
SE x TE x SV	4	**	NS	**	NS	**	NS
Resíduo	76						
Total	94						
Média (± desvio padrão)		12,11 (± 19,53)	0,16 (± 0,92)	11,51 (± 9,82)	2,00 (± 3,70)	62,81 (± 23,48)	11,52 (± 8,21)

NS: não significativo ( $P > 0,01$ ); \*\*:  $P < 0,01$ ; GL: graus de liberdade

SE: solução de equilíbrio; TE: tempo de equilíbrio; SV: solução de vitrificação

MII: % de metáfase II; AI: % de anáfase I; MI: % de metáfase I; PI: % de prófase I; CC: % de condensação da cromatina; SCC: % de sem configuração cromossômica



(médias seguidas de letras diferentes indicam diferença entre si,  $P < 0,05$ )

Figura 1 - Taxa de maturação nuclear após o descongelamento e reidratação, para ovócitos imaturos vitrificados com a solução de vitrificação contendo trealose ou sacarose

A Figura 1 demonstra que as piores taxas de MII nos tratamentos que envolveram a sacarose, foram encontradas nas combinações de SE com 40% de EG e TE por 15 e 5 minutos (0,95 e 0,00%, respectivamente). Assim, se pode deduzir que a concentração elevada de EG associada a um longo tempo de equilíbrio prejudicou o desenvolvimento ovocitário. VALDEZ et al. (1992) expuseram blastocistos de camundongo a 40% de EG por dez minutos e observaram redução da taxa de sobrevivência embrionária. O efeito do EG

sobre a sobrevivência de ovócitos bovinos maduros foi avaliado por ULLAH et al. (1997). Os ovócitos foram incubados por dez e 20 minutos em 10,0 e 20,0% de EG, e se observou que a taxa de desenvolvimento até blastocisto dos ovócitos expostos por dez ou 20 minutos em 10,0% de EG não diferiu do grupo controle. Contudo, o uso de 20,0% de EG por dez e 20 minutos reduziu drasticamente a taxa de desenvolvimento. IM et al. (1997) sugerem que ovócitos imaturos mantidos por longos períodos em soluções crioprotetoras podem ter sua viabilidade reduzida, não devido ao estresse osmótico, mas sim por eventos bioquímicos (inativação de enzimas necessárias para progressão meiótica) e/ou biofísicos (eluição de lipídeos das membranas).

Para a concentração de 40% de EG, o tempo de 0,5 minutos (Figura 1) parece mais adequado (taxa de maturação de 16,76%). De fato, em um teste de toxicidade, WANI et al. (2004a) expuseram ovócitos imaturos de bubalinos por 45 segundos em solução contendo  $7,0 \text{ mol L}^{-1}$  (38,88%) de EG e obtiveram taxas de maturação semelhantes ao grupo controle. Utilizando 40,0% de EG + 18,0% de Ficoll +  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de sacarose na solução de vitrificação por 30 a 50 segundos, sem equilíbrio, MATSUMOTO et al. (2001) obtiveram taxas de maturação de 20,0% e 10,0 a 19,0% ao criopreservar ovócitos imaturos com a EMGRID e a malha de nylon, respectivamente.

Com o TE de 0,5 minutos, SE contendo 3,0 ou 20,0% de EG e a sacarose na SV (Figura 1), foram obtidas taxas de maturação significativamente diferentes (10,97 e 21,63%, respectivamente). É provável que com o tempo reduzido, 3,0% de EG não tenha sido suficiente para desidratar adequadamente os ovócitos. Mesmo o uso de 20,0% de EG não foi capaz de proporcionar altas taxas de maturação. Pode-se supor também que com TE reduzido, o ideal seria



combinar o EG com outro crioprotetor, como foi proposto por alguns pesquisadores. Com equilíbrio em curto período, LUNA et al. (2001) e BRANDÃO (2001) vitrificaram ovócitos imaturos pelo método ultra-rápido (OPS), mantendo-os por 25 a 30 segundos na solução de equilíbrio (10% de DMSO + 10% de EG) e por 25 a 30 segundos na solução de vitrificação (20% de DMSO + 20% de EG + 0,5 mol L<sup>-1</sup> de sacarose) e obtiveram, respectivamente, 38,8 e 8,3% de maturação. Com o mesmo protocolo, VIEIRA et al. (2002) vitrificaram ovócitos imaturos pelo método ultra-rápido (OPS) e obtiveram taxas de clivagem de 46,4 a 49,0% e de blastocisto de 3,5 a 6,1%, contudo, não foi avaliada a taxa de maturação.

Com equilíbrio em curto período, HURT et al. (2000) vitrificaram ovócitos bovinos utilizando a OPS, com equilíbrio em 2,5 mol L<sup>-1</sup>(13,88%) de EG + 18,0% de Ficoll + 0,5 mol L<sup>-1</sup> de sacarose por 30 segundos, seguido pela solução de vitrificação com 5,0 mol L<sup>-1</sup>(27,77%) de EG + 18,0% de Ficoll + 0,5 mol L<sup>-1</sup> de sacarose por 20 a 25 segundos e obtiveram taxa de maturação nuclear de 70,0%. A taxa de maturação obtida pelos referidos autores foi superior a melhor taxa aqui encontrada (44,55%). A princípio, esses melhores resultados poderiam ser atribuídos, em parte, a associação do EG com o ficoll, contudo, SHAW et al. (1997), comparando o comportamento de polímeros na solução de congelamento, observaram que o ficoll contribui pouco para as propriedades vitrificantes da solução, se comportando de modo semelhante a uma substância inerte (NaCl), ocupando a mesma proporção da solução. Sendo assim, os resultados apresentados por HURT et al. (2000) podem ser questionados em relação ao número baixo de ovócitos vitrificados (30), e ainda, o fato de que dos 18 ovócitos que maturaram, apenas 55,55% estavam viáveis.

A viabilidade dos ovócitos que atingiram o estágio de MII não foi avaliada no presente trabalho.

PAPIS et al. (2000) vitrificaram ovócitos bovinos em microgotas colocadas diretamente no nitrogênio líquido e utilizando o equilíbrio com 3,0% de EG por 12 a 15 minutos, seguido por 30 segundos em solução de vitrificação contendo 5,5 mol L<sup>-1</sup> (30,55%) de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose e produziram taxas de clivagem e de desenvolvimento até blastocisto semelhantes ao grupo controle não vitrificado (75,0% e 88,7% e 29,6% e 41,5%, respectivamente). DINNYES et al. (2000) realizaram o equilíbrio em 4,0% de EG por 10 a 15 minutos e em seguida lavaram os ovócitos, 3 vezes, em gotas contendo 35,0% de EG + 5,0% de PVP + 0,4 mol L<sup>-1</sup> de trealose, e os ovócitos foram vitrificados em SSV. Com este protocolo se conseguiu taxas de clivagem semelhante ao grupo controle, não vitrificado (58,0 a 62,0% e 69,0%, respectivamente). No presente experimento, os protocolos semelhantes (3% EG, com TE de 15 minutos e SV com trealose ou sacarose) aos dos referidos autores não produziram resultados tão satisfatórios (0,00 e 19,36% de maturação, respectivamente; Figuras 1). Provavelmente, o uso de ovócitos maduros e o método de congelamento ultra-rápido utilizado, tenham sido responsáveis pelos melhores resultados. Pode-se supor também, que é necessário adequar o protocolo de congelamento de acordo com o tipo de ovócito (maduro ou imaturo) que se pretende criopreservar, visto que, apesar dos excelentes resultados com ovócitos maduros, os protocolos dos referidos autores, ao serem utilizados em ovócitos imaturos, não produziram bons resultados.

A Figura 1 demonstra que a maior taxa de MII nos tratamentos que envolveram a trealose foi de 5,32%, ficando a maioria das combinações com

taxa de 0,00%. A molaridade utilizada para trealose no presente experimento pode não ter sido a ideal, visto que, ARAV et al. (1993) compararam o efeito osmótico e citotóxico de diferentes concentrações (0,25; 0,5 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>) de sacarose e trealose sobre ovócitos imaturos de bovinos, e observaram que a exposição a trealose foi menos danosa que a sacarose, e que altas taxas de fertilização (70%) foram alcançadas com a exposição a 0,25 mol L<sup>-1</sup> de trealose. Também utilizando a concentração de 0,25 mol L<sup>-1</sup>, RAYOS et al. (1994) compararam a criopreservação de ovócitos de camundongos utilizando o EG associado a sacarose ou a trealose, e não observaram diferenças em termos de taxa de fertilização entre as duas substâncias. Com o congelamento rápido realizado com duas soluções de equilíbrio (10% de EG seguido de 10% de EG + 0,3 mol L<sup>-1</sup> de trealose), mantendo os ovócitos imaturos por cinco minutos em cada solução e um minuto na solução de vitrificação, que continha 40% de EG + 20% de PVP + 0,3 mol L<sup>-1</sup> de trealose, SOUZA (2001) obteve 17,5% de maturação.

A trealose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, enquanto que a sacarose é formada por uma glicose e uma frutose (TURNER et al., 2001) e ambas foram adicionadas a solução de vitrificação na mesma concentração molar (1,0 mol L<sup>-1</sup>). Segundo a teoria inicialmente proposta por Lovelock (1953) citado por KOSHIMOTO e MAZUR (2002a), a proteção conferida pelos carboidratos é proporcional a sua molaridade, sendo assim a proteção estaria relacionada com as propriedades coligativas da solução. De acordo com o exposto, seria de se esperar que não houvesse diferenças entre o uso destes dois dissacarídeos na solução de vitrificação, visto que, a molaridade foi a mesma.

Por outro lado, KOSHIMOTO e MAZUR (2002b), trabalhando com congelamento de espermatozoides de camundongo, propuseram que a concentração massal seria mais importante que concentração molar da solução crioprotetora, sendo assim, a proteção conferida pelos carboidratos estaria relacionada com o estado físico do meio congelado. Analisando os dois dissacarídeos (trealose e sacarose), observa-se que ambos, na sua forma simples, possuem o mesmo peso molecular (342,3 g), contudo no presente experimento a trealose foi utilizada na forma hidratada, o que lhe confere maior peso molecular (378,3 g). Portanto, apesar de na solução de vitrificação ter sido adicionado a mesma concentração molar para os dois dissacarídeos ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), a concentração massal de trealose (0,378 g/mL) foi maior que a de sacarose (0,342 g/mL). Segundo a teoria de KOSHIMOTO e MAZUR (2002b), era de se esperar que a solução contendo a trealose produzisse melhores resultados, fato que não foi observado. Pode-se supor então que as diferenças aqui observadas ocorreram devido as propriedades particulares de cada molécula de dissacarídeo.

Testando outros açúcares (monossacarídeos), LE GAL e MASSIP (1999) vitrificaram ovócitos imaturos de bovinos utilizando a OPS, mantendo-os em 10% de GLI por 1 minuto, seguido por 10,0% de GLI + 10,0% de EG por um minuto, seguido por 20,0% de GLI + 20,0% de EG +  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  galactose (monossacarídeo) por 45 a 60 segundos e obtiveram taxa de maturação de 27,5%. Sem equilíbrio, testando duas SV (25,0% de EG + 24,28% de DMSO +  $5,56 \text{ mol L}^{-1}$  de glicose e 19,44% de EG + 24,28% de DMSO +  $5,56 \text{ mol L}^{-1}$  de glicose), e dois tempos de exposição (um e três minutos), DHALI et al. (2000b) não observaram diferenças quanto taxa de maturação (24,0 a 33,0%) ao

vitrificar ovócitos imaturos de bubalinos pelo método rápido. Com os protocolos utilizados, não se observou melhoras na taxa de maturação ao utilizar monossacarídeos.

As maiores taxas de CC foram observadas quando se utilizou a trealose na SV (Tabela 8), contudo, taxas elevadas também foram observadas com sacarose na SV (Tabela 8). A CC pode ser indicativo de que houve reinício da maturação ou que ocorreu a degeneração do ovócito. Segundo STOJKOVIC et al. (1999), a condensação da cromatina é um mecanismo bioquímico essencial ao prosseguimento do ciclo celular, que ocorre na fase de pré-metáfase I. No caso dos ovócitos do presente experimento, a criopreservação pode ter inibido a atividade dos reguladores da meiose, inibindo o prosseguimento da maturação (WU et al., 1999). A condensação da cromatina também caracteriza um dos primeiros eventos do processo de morte celular, a apoptose (BETTS e KING, 2001; FARIN et al., 2001), ou seja os ovócitos do presente experimento também podem ter entrado em processo de degeneração. Fica difícil estabelecer o que realmente aconteceu, visto que, a avaliação dos ovócitos ocorreu somente após 24 horas de cultivo.

Tabela 8 - Taxa de condensação da cromatina após o descongelamento e reidratação, para ovócitos imaturos vitrificados com a solução de vitrificação contendo trealose ou sacarose

SV (40% EG + 1,0 mol L <sup>-1</sup> trealose ou sacarose)	TE (min.)	SE (% EG)	Total de ovócitos avaliados	Ovócitos com CC (%)*
Trealose	0,5	3	105	80,11 <sup>h,i,j,k</sup>
		20	112	68,26 <sup>c,d,e,f,g,h</sup>
		40	110	79,37 <sup>g,h,i,j,k</sup>
	5	3	108	73,84 <sup>e,f,g,h,i,j,k</sup>
		20	108	59,86 <sup>b,c,d,e</sup>
		40	107	85,11 <sup>j,k</sup>
	15	3	121	70,65 <sup>d,e,f,g,h,i,j</sup>
		20	115	84,88 <sup>i,j,k</sup>
		40	113	87,11 <sup>k</sup>
Sacarose	0,5	3	107	64,43 <sup>b,c,d,e,f,gh</sup>
		20	110	52,46 <sup>b,c</sup>
		40	112	53,04 <sup>b,c</sup>
	5	3	109	55,92 <sup>d,e,f</sup>
		20	114	19,88 <sup>a</sup>
		40	110	65,79 <sup>c,d,e,f,g,h</sup>
	15	3	112	49,27 <sup>b</sup>
		20	110	56,80 <sup>b,c,d</sup>
		40	110	78,86 <sup>f,g,h,i,j,k</sup>

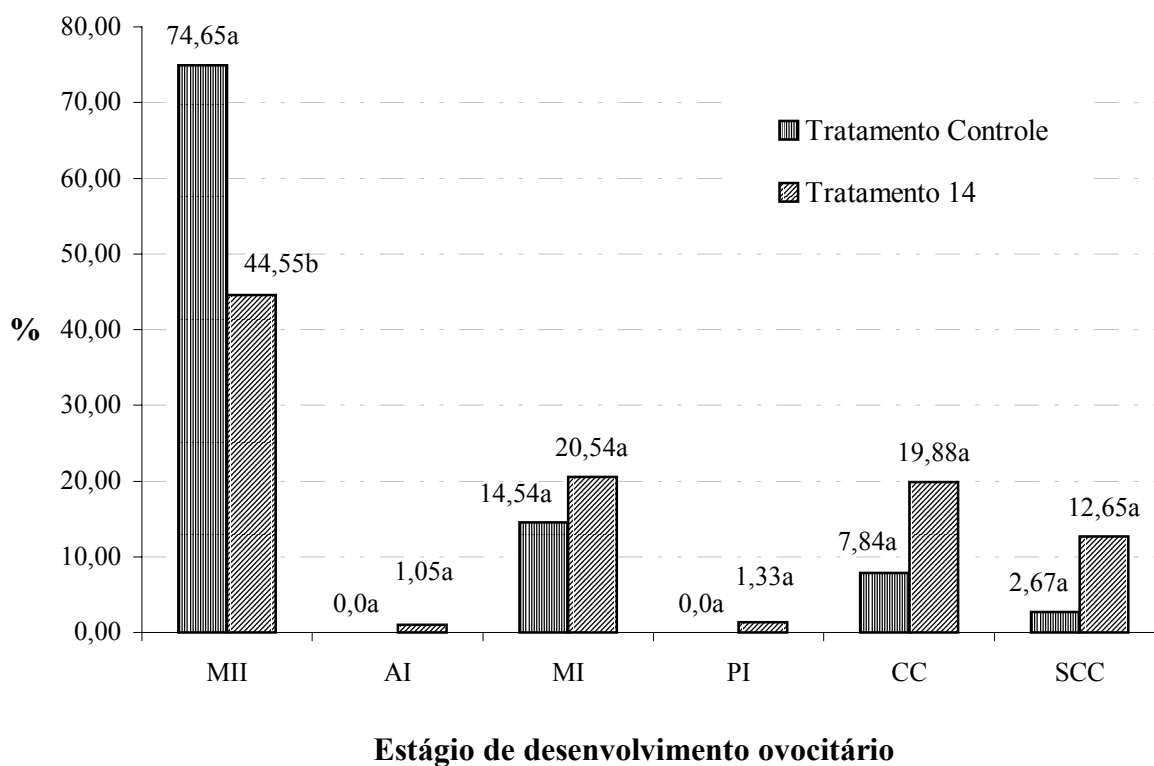
\* médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre si (P<0,05)

SE: solução de vitrificação; TE: tempo de equilíbrio; SV: solução de vitrificação

CC: condensação da cromatina

A Figura 2 apresenta a taxa de maturação para o tratamento controle. Observa-se que a taxa de MII do tratamento 14 (SE com 20% de EG, TE de 5 minutos e SV com sacarose) foi diferente do tratamento controle (44,55% e

74,95%, respectivamente), porém as taxas de AI, MI, PI, CC e SCC não foram diferentes (0,00% e 1,05%; 20,54% e 14,54%; 0,00% e 1,33%; 19,88% e 7,84%; 12,65% e 2,67%). Apesar de não terem sido diferentes, as taxas de MI, de CC e de SCC foram mais altas, em números absolutos, no tratamento 14, evidenciando que os ovócitos que não chegaram a MII, ou estacionaram em MI ou em CC e SCC.



(médias seguidas de letras diferentes indicam diferença entre si,  $P < 0,05$ )

MII: % de metáfase II; AI: % de anáfase I; MI: % de metáfase I; PI: % de prófase I; CC: % de condensação da cromatina; SCC: % de sem configuração cromossômica

Figura 2 – Taxa de desenvolvimento ovocitário para os ovócitos não vitrificados (tratamento controle) e para os ovócitos vitrificados em 20% de EG por 5 minutos, com SV contendo 40% de EG + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose (tratamento 14)

A ausência de configuração cromossômica (SCC) é comumente referida como sinal de degeneração (FAGUNDES, 2002). Neste caso, pode-se observar (Figura 2) que o processo de criopreservação, em números absolutos, causou maior degeneração (maior taxa de SCC) que o observado nos ovócitos não congelados.

A taxa de maturação do tratamento controle (Figura 2) foi semelhante a taxa observada por outros pesquisadores (CAMARGO, 1995; IM et al., 1997; LE GAL e MASSIP, 1999; SAUNDERS e PARK, 1999; DHALI et al., 2000a; MATSUMOTO et al., 2001; FAGUNDES, 2002; WANI et al., 2004b), que encontraram respectivamente, 84,0; 88,0; 71,0; 78,0; 67,0; 70,0; 82,5; 69,5% de maturação. As ligeiras diferenças podem ser atribuídas ao meio de maturação utilizado e a época do ano em que foram coletados os ovócitos (COSTA et al., 2002). De fato, fica evidenciado que os procedimentos adotados na maturação *in vitro* dos ovócitos foi adequado.

Deve ser enfatizado também, a maior precisão na avaliação da taxa de maturação, utilizando a técnica descrita por COSTA et al. (1997c). Nos procedimentos convencionais (utilizados pela maioria dos pesquisadores) não há hipotonização dos ovócitos, o que dificulta a diferenciação entre MI e MII, devido ao padrão tridimensional da cromatina, o que torna a interpretação muito variável entre os observadores, conforme salientado por BRANDÃO (2001). Essa possibilidade de erro de interpretação também foi ressaltada por outros pesquisadores (KING et al., 1986; LIM et al., 1992). Na técnica utilizada no presente experimento a diferenciação entre as fases de desenvolvimento ovocitário foi feita com muito mais segurança (Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8).



A habilidade do ovócito em ser fertilizado e se desenvolver normalmente requer tanto a maturação nuclear quanto a maturação citoplasmática (HURT et al., 2000). A maturação citoplasmática não foi avaliada no presente experimento. Sendo assim, não é possível afirmar que os 44,55% dos ovócitos do Tratamento 14 que maturaram, seriam potencialmente fertilizáveis e teriam a capacidade de se desenvolver normalmente. Contudo, com base nos resultados de WANI et al. (2004a), que vitrificaram (método rápido) ovócitos imaturos de bubalinos utilizando o EG associado a sacarose e obtiveram 42,55% de maturação nuclear, podemos esperar bons resultados para o tratamento 14, em termos de desenvolvimento embrionário, visto que, numa segunda série de experimentos com o mesmo protocolo, foram obtidas taxas de 30,8% de clivagem, 35,1% de mórula e 13,5% de blastocisto. Somente um novo experimento poderá dizer se o protocolo de criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos aqui adotado (tratamento 14), irá proporcionar índices semelhantes ou melhores de desenvolvimento embrionário.

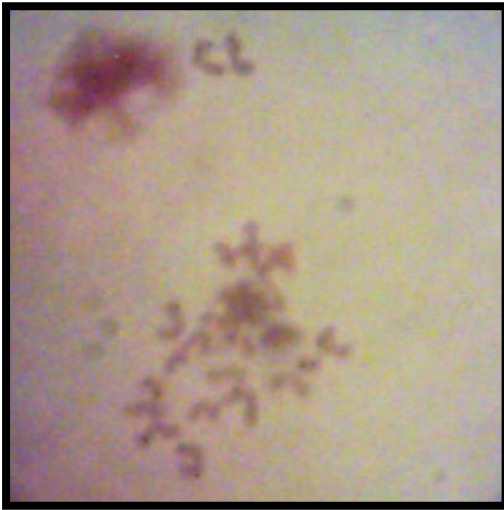


Figura 3 - Ovócito em metáfase II (Tratamento 14) 1000X



Figura 4 - Ovócito em anáfase I (Tratamento 18) 1000X

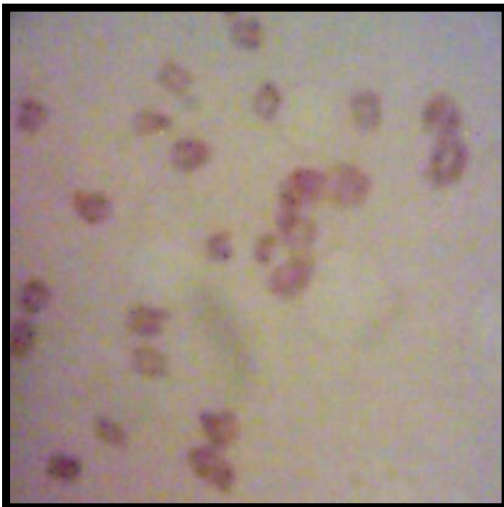


Figura 5 - Ovócito em metáfase I (Tratamento 14) 1000X



Figura 6 - Ovócito em prófase I (Tratamento 15) 1000X



Figura 7 - Ovócito com condensação da cromatina (Tratamento 1) 1000X

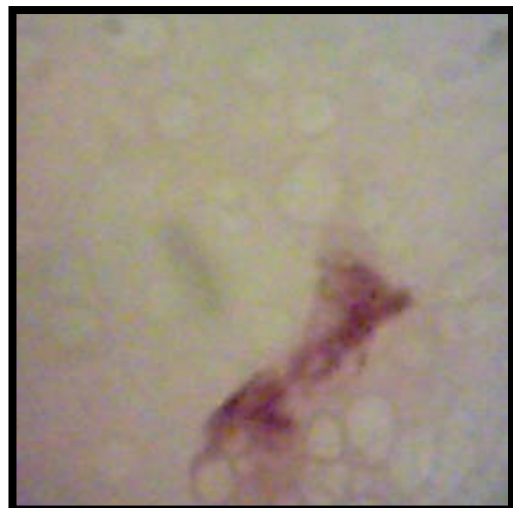


Figura 8 - Ovócito com condensação da cromatina (Tratamento 4) 1000X

## 5. CONCLUSÕES

A avaliação morfológica de ovócitos imaturos após o descongelamento e reidratação, com base na retração citoplasmática, não reflete o verdadeiro potencial de maturação *in vitro* dos ovócitos.

O uso da trealose na solução de vitrificação influenciou negativamente a maturação ovocitária após o descongelamento e reidratação.

O uso da sacarose na solução de vitrificação influenciou positivamente a maturação ovocitária após o descongelamento e reidratação.

Concentrações elevadas de etilenoglicol (40%) associado a um longo tempo de equilíbrio (cinco e 15 minutos) não favoreceram o desenvolvimento ovocitário após o descongelamento e reidratação.

O protocolo utilizando 20% de etilenoglicol na solução de equilíbrio, com tempo de equilíbrio de cinco minutos e com a solução de vitrificação contendo 40% de etilenoglicol + 1,0 mol L<sup>-1</sup> de sacarose, proporcionou índices razoáveis de maturação *in vitro*, para ovócitos imaturos de bovinos após o descongelamento e reidratação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGCA, Y., LIU, J., PETER, A.T., CRITSER, ES., CRITSER, LK. Cryoprotectant and water permeability of immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 340, 1997.
- AMAN, R.R. e PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103-110, 1994.
- ARAV, A., SHESHU, D., MATTIOLI, M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 353-358, 1993.
- ARAV, A., ZERON, Y., LESLIE, S.B., BEHBOODI, E., ANDERSON, G.B., CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 33, p. 589-599, 1996.
- ASADA, M. e FUKUI, Y. Effects on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 54, p.889-898, 2000.
- ATABAY, E.C., TAKAHASHI, Y., KATAGIRI, S., NAGANO, M., KOGA, A., KANAI, Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. **Theriogenology**, v. 61, p. 15-23, 2004.

- BAVISTER, B.D., BALL, G.D., LEIBFRIED, M.L., LENZ, R., AX, R.L., FIRST, N.L. Factor affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 717-725, 1983.
- BEGIN, I., BHATIA, B., BALDASSARE, H., DINNYES, A., KEEFER, C. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v. 59, p. 1839-1850, 2003.
- BETTS, D.H., KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, p. 171-191, 2001.
- BIELANSKI, A. A review on disease transmission studies in relationship to production of embryos by *in vitro* fertilization and related new reproductive technologies. **Biotechnology Advanced**, v. 15, p. 633-656, 1997.
- BIELANSKI, A., BERGERON, H., LAU, P.C.K., DEVENISH, J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 46, p. 146-152, 2003.
- BIELANSKI, A., NADIN-DAVIS, S., SAPP, T., LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, p. 110-116, 2000.
- BRANDÃO, D.O. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação *in vitro***. Belo Horizonte, MG: UFMG, 2002. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.
- CAMARGO, L.S.A. **Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos com 1,2 propanodiol**. Itaguaí, RJ: UFRRJ, 1995. 62 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.
- CHA, K.Y., CHUNG, H.M., LIM, J.M., KO, J.J., HAN, S.Y., CHOI, D.H., YOON, T.K. Freezing immature oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 43-47, 2000.

- COSTA, E. P. , VALE FILHO, V. R., NOGUEIRA, J. C. SÁ, W.F., COSTA, A. H. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 49, p. 417-424, 1997a.
- COSTA, E. P. , VALE FILHO, V. R., NOGUEIRA, J. C. SÁ, W.F., COSTA, A. H. Técnica para o desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 49, p. 425-432, 1997b.
- COSTA, E. P. , VALE FILHO, V. R., NOGUEIRA, J. C. SÁ, W.F., COSTA, A. H. Técnica para a avaliação do estágio de maturação "*in vitro*" de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 49, p. 433-440, 1997c.
- COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "*in vitro*".** Belo Horizonte: Universidade Federal De Minas Gerais, 1994. p.155. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- COSTA, E.P., GUIMARÃES, J.D., TORRES, C.A.A., FAGUNDES, L.M., GIOSO, M.M. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.º 3, p. 1122-1129, 2002.
- COTICCHIO, G., BONU, M.A., BORINI, A., FLAMIGNI, C. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115S, p. S2-S7, 2004.
- DHALI, A., MANIK, R.S., DAS, S.K., SINGLA, S.K., PALTA, P. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 159-165, 2000a.
- DHALI, A., MANIK, R.S., DAS, S.K., SINGLA, S.K., PALTA, P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 1295-1303, 2000b.

- DIDION, B.A., POMP, D., MARTIN, M.J. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2803-2810, 1990.
- DINNYES, A., DAÍ, Y., JIANG, S., YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 513-518, 2000.
- EUN, P.S., HWAN, L.S., BUM, K.S., SIK, L.W., PYUNG, K.Y., YUL, C.K. Vitrification of ICR mouse immature oocytes in a straw to prevent the risk of liquid nitrogen contamination. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. S284-S285, 2002.
- FABBRI, R., PORCU, E., MARSELLA, T., PRIMAVERA, M.R., ROCCHETA, G., CIOTTI, P.M., MAGRINI, O., SERACCHIOLI, R., VENTUROLI, S., FLAMIGNI, C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 39-42, 2000.
- FAGUNDES, L.M.. **Congelação de ovócitos desnudos ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o etilenoglicol pelo método convencional**. Viçosa, MG: DVT, 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- FARIN, P.W., CROSIRE, A.E., FARIN, C.E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.
- FEITOSA, W.B., FONTES, R.S., ADONA, P.R., QUIRINO, C.R., MATOS, L.F. Avaliação das soluções do choque osmótico para aumentar a interação da trealose com oócitos bovinos maturados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 390-391, 2003.
- FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R. & AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – Moifopa. **In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. e FREITAS, V.J.F.**

**Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p. 227-260, 2002.

FUKU, E., XIA, L. e DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v. 32, p. 139-156, 1995.

GONÇALVES, P.B.D., VISINTIN, J.A., OLIVEIRA, M.A.L., MONTAGNER, M.M., COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. **In:** GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. e FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p. 195-226, 2002.

HAMANO, S., KOIKEDA, A., KUWAYAMA, M., NAGAI, T. Full-term development of *in vitro*-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 38, p. 1085-1090, 1992.

HOCHI, S., ITO, K., HIRABAYASHI, M., UEDA, M., KIMURA, K., HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 49, p. 787-796, 1998.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, P. 3-22, 2000.

HURTT, A.E., LANDIM-ALVARENGA, F., SEIDEL, G.E., SQUIRES, E.L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v. 54, p. 119-128, 2000.

IM, K.S., KANG, J.K., KIM, H.S. Effects of *cumulus* cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 881-891, 1997.

KING, W.A., BUSQUET, D., GREEVE, T. Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 27, p. 267-279, 1986.



- KOSHIMOTO, C., MAZUR, P. The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type sugar, and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. **Cryobiology**, v. 45, p. 80-90, 2002a.
- KOSHIMOTO, C., MAZUR, P. Effects of cooling and warming rate to and from  $-70^{\circ}\text{C}$  and effects of cooling from  $-70$  to  $-196^{\circ}\text{C}$  on the motility of mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1477-1484, 2002b.
- KUCHENMEISTER, U. e KUWAYAMA, M. *In vitro* blastocyst formation after vitrification of immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 348, 1997.
- KULESHOVA, L.L., MACFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O., SHAW, J.M. Sugars exerts a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p. 119-130, 1999.
- LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1234-1236, 1999.
- LE GAL, F. e MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, p. 290-300, 1999.
- LI, X., SU, L., LI, Y., JI, W., DINNYES, A. Vitrification of Yunnan Yellow cattle oocytes: work in progress. **Theriogenology**, v. 58, p. 1253-1260, 2002.
- LIM, J.M., FUKUI, Y., ONO, H. Development competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 37, p. 351-361, 1992.
- LIM, J.M., KO, J.J., HWANG, W.S., CHUNG, H.M., NIWA, K. Development of *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 51, p. 1303-1310, 1999.

- LUNA, H.S., FERRARI, I., RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 23-28, 2001.
- LUVONI, G.C., PELIZZARI, P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. **Theriogenology**, v. 53, p. 1529-1540, 2000.
- MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.
- MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v. 27, p. 69-76, 1987.
- MATSUMOTO, H., JIANG, J.Y., TANAKA, T., SASADA, H., SATO, E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144, 2001.
- MEN, H., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v. 57, p. 1095-1103, 2002.
- NARDID, O., DYUBKO, T., REPINA, S. A comparative study of the effect of freeze-thawing on peripheral and integral membrane proteins. **Cryobiology**, v. 34, p. 107-113, 1997.
- OTOI, T., TACHIKAWA, S., KONDO, S., TAKAGI, M., SUZUKI, T. Developmental competence of bovine oocytes frozen at different cooling rates. **Cryobiology**, v. 31, p. 344-348, 1994.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., SUZUKI, T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v. 32, p. 455-460, 1995.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S., MUKAKAMI,

- M., KIKKAWA, Y., SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. **Cryobiology**, v. 34, p. 36-41, 1997.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHIKAWA, S., SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v. 37, p. 77-85, 1998.
- PAPIS, K., SHIMIZU, M., IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, p. 651-658, 2000.
- PARK, S.E., KIM, T.J., HONG, S.W., CHUNG, H.M., YOON, T.K., CHA, K.Y. Vitrification of human mature oocytes in a straw to prevent the risk of liquid nitrogen contamination during storage. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. S64-S65, 2003.
- PARK, S.E., LEE, K.A., SON, W.Y., KO, J.J., LEE, S.H., CHA, K.Y. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 920-926, 1997.
- PUHLEV, I., GUO, N., BROWN, D.R., LEVINE, F. Desiccation tolerance in human cells. **Cryobiology**, v. 42, p. 207-217, 2001.
- RALL, W.F., REID, D.S., POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v. 21, p. 106-121, 1984.
- RAYOS, A.A., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M., KANAGAWA, H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 123-129, 1994.
- REICHENBACH, H.D., OLIVEIRA, M.A.L., LIMA, P.F., SANTOS-FILHO, A.S., ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. **In:** GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R. e FREITAS,

- V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p. 127-177, 2002.
- RUSSEL, P.H., LYARUU, V.H., MILLAR, J.D., CURRY, M.R., WATSON, P.F. The potencial transmission of infections agents by semen packing during storage for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 337-342, 1997.
- SAS. Institute InC. **User's Guide Version 8**, Cary Indiana, 956p. 1999.
- SAUNDERS, K.M. e PARK, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro* matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 178-187, 1999.
- SCHELLANDER, K., PELI, J., SCHMOLL, F., BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 909-915, 1994.
- SCHMIDT, M., HYTTEL, P., AVERY, B., GREEVE, T. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 281-290, 1995.
- SHAW, J.M., KULESHOVA, L.L., MAC FARLANE, D.R., TROUSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.
- SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.
- SIRARD, M. A. e BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 5, p. 777-783, 1990.
- SOUZA, M.R. **Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos com e sem *cumulus oophorus***. Viçosa, MG: DVT, 2001. 54 p. Dissertação (Mestrado

em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

STOJKOVIC, M., MOTLIK, J., KOLLE, S. Cell cycle control and oocyte maturation: review of literature. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 34, p. 335-342, 1999.

SUZUKI, T., BOEDIONO, A., TAKAGI, M., SAHA, S., SUMANTRI, C. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution meted *in vitro*. **Cryobiology**, v. 33, p. 515-524, 1996.

TURNER, S., SENARATNA, T., TOUCHELL, D., BUNN, E., DIXON, K., TAN, B. Stereochemical arrangement of hydroxyl groups in sugar and polyalcohol molecules as na important factor in effective cryopreservation. **Plant Science**, v. 160, p. 489-497, 2001.

ULLAH, N., SHIMIZU, M., IZAYKE, Y., ANWAR, M. Survival of bovine oocytes after exposure to ethylene glycol. **Theriogenology**, v. 47, p. 357, 1997.

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

VAJTA, G., KUWAYAMA, M., HOLM, P., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VALDEZ, C.A., ABAS-MANZI, O., TAKAHASHI, Y., FUGIKAWA, S., KANAGAWA, H. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 793-802, 1992.

VIERA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 45, p. 91-94, 2002.

- WANI, N.A., MAURYA, S.N., MISRA, A.K., SAXENA, V.B., LAKHCHAURA, B.D. Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 61, p. 831-842, 2004a.
- WANI, N.A., MISRA, A.K., MAURYA, S.N. Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalu bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. **Animal Reproduction Science**, 2004b.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WU, B., TONG, J., LEIBO, S.P. Effect of cooling bovine germinal vesicle stage oocyte on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 388-395, 1999.
- YANG, B.C., YANG, B.S., SEONG, H.H., IM, G.S., PARK, S.J., CHANG, W.K., CHEONG, I.C., IM, K.S. Effects of vitrification methods and polyvinylpyrrolidone supplementation on the viability of immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.266, 2000.
- YANG, Q.Z., SUN, Q.Y., LIU, G.Y., QIN, P.C., FENG, H.L. Development competence and ultrastructure damage of cryopreserved GV stage bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 342, 1994.
- ZERON, Y., PEARL, M., BOROCHOV, A., ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 35-42, 1999.