

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS UTILIZANDO-SE ETILENOGLICOL,
DIMETILSULFÓXIDO E DIMETILFORMAMIDA COMO
AGENTES CRIOPROTETORES

ELEN SILVIA CARVALHO SIQUEIRA PYLES

Botucatu – SP

Julho 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS UTILIZANDO-SE ETILENOGLICOL,
DIMETILSULFÓXIDO E DIMETILFORMAMIDA COMO
AGENTES CRIOPROTETORES

ELEN SILVIA CARVALHO SIQUEIRA PYLES

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Doutora

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda da
Cruz Landim e Alvarenga

Botucatu – SP

Julho 2006

Elen Silvia Carvalho Siqueira Pyles

Botucatu, 24 de julho de 2006.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Adjunto Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Prof. Ass. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Profa. Titular Eunice Oba

Profa. Ass. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção

Profa. Adjunto Maria Denise Lopes

***Aos meus pais Sylvia (em
memória) e José Siqueira
pelo exemplo de vida,
dedico...***

A Deus, que me revestiu de forças e aperfeiçoou o meu caminho.

Ao Marcelo Damas Pyles, pela paciência constante... Por seu compromisso com a nossa profissão. Principalmente por sua dedicação incondicional como pai e esposo sempre presente, mesmo que somente em pensamento.

Ao Mateus, responsável pela minha alegria e imenso prazer em ser mãe!

Aos meus irmãos Elenice e Elter, por não me deixarem desistir de tudo nos momentos difíceis que passamos... Por poder contar com eles sempre, apesar da distância.

À grande amiga Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, por todos os ensinamentos, pela confiança em mim, pela disposição em me ajudar a qualquer momento, pela orientação, sugestões, amizade e pelos momentos inesquecíveis que vivemos juntas.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes Prof. Nereu, Profa. Denise, Prof. Sony, Profa. Eunice, Prof. Papa, Prof. Meira e Prof. João, por tudo que aprendi com o nosso convívio.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Christina, Walter e Edílson, pela atenção e disposição em colaborar.

Ao Prof. Dr. Marco Alvarenga, Karen Leão, Milena Machado, Luciano Mundim, Claudia Fernandes, Gustavo Gomes (Bigú), Letícia Macedo, pelo incentivo mútuo, pelos agradáveis momentos, pela amizade eterna.

Ao Sr. Celso e D. Leca, por serem minha segunda família.

Ao Paulo José, pela companhia, pela força, pelo auxílio com o Mateus e por estar sempre do meu lado pronto a me ajudar.

À Oldete, pelo seu carinho oferecido ao Mateus. Por me deixar tranqüila por saber que na minha ausência ele está sempre bem ao seu lado.

A todos os meus amigos, que de formas diferentes contribuíram e foram essenciais para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Aos colegas e estagiários do laboratório, por trabalharmos juntos em harmonia sempre.

Ao frigorífico Frigol – Lençóis Paulista/SP, por estar sempre de portas abertas para que fosse possível a colheita dos ovários durante a realização do experimento.

À amiga Profa. Lídia Raquel de Carvalho, por todas as análises estatísticas. Pela atenção e disponibilidade a qualquer momento.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (processo 02/01065-4), sem o qual a realização do presente estudo não teria sido possível.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 1.....	46
QUADRO 2: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 2.....	48
QUADRO 3: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 3.....	49
QUADRO 4: Distribuição dos embriões entre os grupos controle (não vitrificados).....	52
QUADRO 5: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 4.....	53
QUADRO 6: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 5.....	55
QUADRO 7: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 6.....	55
QUADRO 8: Número e distribuição dos ovócitos destinados a coloração para análise da distribuição das mitocôndrias.....	64
QUADRO 9: Número e distribuição dos ovócitos destinados a coloração para análise da distribuição dos grânulos corticais.....	64
QUADRO 10: Distribuição dos embriões entre todos os grupos dos Experimentos 4, 5 e 6, com o número total de embriões que foram vitrificados, aquecidos e recolocados em cultivo para avaliação das taxas de re-expansão e aquecidos para avaliação da viabilidade celular.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estágio de maturação nuclear de ovócitos controle, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas de maturação <i>in vitro</i>	68
TABELA 2: Estágio de maturação nuclear de ovócitos pertencentes aos grupos 1G0h, 2G0h e 3G0h, após aquecimento e período de maturação <i>in vitro</i> de 22 horas.....	68
TABELA 3: Estágio de maturação nuclear de ovócitos pertencentes aos grupos 1G22h, 2G22h e 3G22h, após aquecimento.....	69
TABELA 4: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 1, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	72
TABELA 5: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 2, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	72
TABELA 6: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 3, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	73
TABELA 7: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos expostos ou vitrificados imaturos dos Experimentos 1, 2 e 3.....	73
TABELA 8: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos expostos ou vitrificados maturados dos Experimentos 1, 2 e 3.....	73
TABELA 9: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 1, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	74
TABELA 10: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 2, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	75
TABELA 11: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 3, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.....	75

TABELA 12: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupos expostos ou vitrificados imaturos dos Experimentos 1, 2 e 3.....	76
TABELA 13: Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupos expostos ou vitrificados maturados dos Experimentos 1, 2 e 3.....	76
TABELA 14: Porcentagem de células viáveis dos embriões analisados de todos os grupos estudados nos Experimentos 4, 5 e 6.....	77
TABELA 15 - Taxas de re-expansão dos embriões, segundo cada grupo testado nos Experimentos 4, 5 e 6.....	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Seqüência de imagens da aspiração dos folículos.....	44
FIGURA 2: Delineamento dos Experimentos 1, 2 e 3.....	51
FIGURA 3: Delineamento dos Experimentos 4, 5 e 6.....	57
FIGURA 4: Seqüência de imagens da vitrificação em OPS.....	58
FIGURA 5: Seqüência de imagens da maturação <i>in vitro</i>	60
FIGURA 6: Avaliação do estágio de maturação ovocitária.....	63
FIGURA 7: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos não submetidos à vitrificação.....	69
FIGURA 8: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos imaturos submetidos à vitrificação.....	70
FIGURA 9: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos submetidos à vitrificação após 22 horas de MIV.....	70
FIGURA 10: Distribuição dos grânulos corticais em ovócitos não submetidos à vitrificação.....	71
FIGURA 11: Células viáveis de um blastocisto com núcleos corados pelo HOECHST 33342.....	77

LISTA DE ABREVIÇÕES

BSA = Albumina sérica bovina

CIV = Cultivo *in vitro*

DF = Dimetilformamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

DPBS = Dubelco's Phosphate Buffered

E₂ = Estradiol

EG = Etilenoglicol

exp = Expostos aos crioprotetores

FIV = Fertilização *in vitro*

FSH = Hormônio folículo estimulante

g = Grama

GV = Vesícula germinativa

GVBD = Vesícula germinativa quebrada

h = hora

hCG = Gonadotrofina coriônica humana

HM = Holding Medium – Meio de manutenção

HTF = Human Tubal Fluid – Fluido de tuba humana

LH = Hormônio luteinizante

MI = Metáfase I

MII = Metáfase II

MIV = Maturação *in vitro*

OPS = Open pulled straw

PHE = Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina

PIV = Produção *in vitro*

SFB = Soro fetal bovino

SM = Sucrose Medium – Meio de sacarose

TCM 199 = Tissue Culture Médium

µg = micrograma

µl = microlitro

% = por cento

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
1. Maturação ovocitária.....	19
2. Influência do estado de maturação na criopreservação de ovócitos.....	20
3. Criopreservação.....	23
4. Toxicidade dos agentes crioprotetores.....	28
5. Vitrificação.....	31
6. Vitrificação em Open Pulled Straw (OPS).....	38
OBJETIVOS.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
1. Obtenção e seleção dos ovócitos.....	44
2. Distribuição dos ovócitos entre os Experimentos 1, 2 e 3.....	45
2.1 Experimento 1.....	45
2.1.1 Grupos do Experimento 1.....	45
2.1.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 1.....	47
2.2 Experimento 2.....	48
2.2.1 Grupos do Experimento 2.....	48
2.2.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 2.....	49
2.3 Experimento 3.....	49
2.3.1 Grupos do Experimento 3.....	49
2.3.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 3.....	50
3. Distribuição dos embriões entre os Experimentos 4, 5 e 6 e seus grupos....	52
3.1 Experimento 4.....	53
3.1.1 Grupos do Experimento 4.....	53
3.1.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 4.....	53
3.2 Experimento 5.....	54
3.2.1 Grupos do Experimento 5.....	54

3.2.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 5.....	55
3.3 Experimento 6.....	55
3.3.1 Grupos do Experimento 6.....	55
3.3.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 6.....	56
4. Envase e aquecimento dos ovócitos dos Experimentos 1, 2 e 3.....	58
4.1 Envase dos ovócitos para vitrificação.....	58
4.2 Aquecimento dos ovócitos vitrificados.....	58
5. Maturação <i>in vitro</i>	59
6. Fertilização <i>in vitro</i>	60
7. Cultivo <i>in vitro</i>	61
7.1 Preparação das placas de co-cultivo.....	61
7.2 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	62
8. Avaliação da maturidade nuclear dos ovócitos.....	62
9. Avaliação da distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias dos ovócitos.....	64
10. Avaliação da viabilidade embrionária dos Experimentos 4, 5 e 6.....	65
11. Avaliação das taxas de re-expansão após o aquecimento dos embriões dos Experimentos 4, 5 e 6.....	66
12. Análise estatística.....	67
RESULTADOS.....	68
1. Experimentos 1, 2 e 3.....	68
1.1 Avaliação da maturidade nuclear dos ovócitos.....	68
1.2 Avaliação da distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias dos ovócitos.....	69
1.3 Taxas de clivagem.....	71
1.4 Taxas de produção de blastocistos.....	74
2. Experimentos 4, 5 e 6.....	76
2.1 Avaliação da viabilidade embrionária nos Experimentos 4, 5 e 6.....	76
2.2 Avaliação das taxas de re-expansão nos Experimentos 4, 5 e 6.....	77
DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	112

RESUMO

Elen Silvia Carvalho Siqueira Pyles. Vitriificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. Botucatu, 2006, 112 páginas. Tese doutorado. UNESP – FMVZ.

Neste estudo vitrificou-se em OPS ovócitos (Experimentos 1, 2 e 3) e embriões bovinos (Experimentos 4, 5 e 6) em três soluções de vitriificação distintas: Experimentos 1 e 4) 20%EG + 20%DMSO + 0,5M sacarose; Experimentos 2 e 5) 20%DF + 20%EG + 0,5M sacarose; Experimentos 3 e 6) 20%DF + 20%DMSO + 0,5M sacarose. Os embriões foram vitrificados na presença ou não de citocalasina B. Os ovócitos foram vitrificados ou somente expostos aos crioprotetores imaturos (G0h e G0hexp), ou após 6 horas (G6h e G6hexp), 12 horas (G12h e G12hexp) ou 22 horas de MIV (G22h e G22hexp). Após a exposição ou aquecimento, parte dos ovócitos completou as 22 horas de MIV e foi destinada à PIV, para avaliação da capacidade de se desenvolverem até blastocisto. No restante avaliou-se o estágio de maturação nuclear e a distribuição dos grânulos corticais e das mitocôndrias. Observou-se que a exposição dos ovócitos imaturos (0 ou 6 horas de MIV) aos crioprotetores nos experimentos 1, 2 e 3 resultou em perda substancial de viabilidade, avaliada pelas taxas de clivagem (GC=79,4%; 1G0hexp=37,1%; 1G6hexp=51,1%; 2G0hexp=33%; 2G6hexp=52,5%; 3G0hexp=36,2%; 3G6hexp=49,8%), o que foi menos notável nos ovócitos expostos após 12 ou 22 horas de MIV (1G12hexp=59,1%; 1G22hexp=71,1%; 2G12hexp=61,5%; 2G22hexp=62,5%; 3G12hexp=58,8%; 3G22hexp=68,6%). A realização da MIV antes da vitriificação foi benéfica. Apesar de nenhuma das soluções de crioprotetores ter sido capaz de promover proteção adequada aos ovócitos submetidos à vitriificação em qualquer momento da MIV, no Experimento 1 foi observada clivagem (1G12h=7,3%; 1G22h=4,2%) indicando que a mistura de crioprotetores EG+DMSO foi a mais eficiente nas condições utilizadas. Entretanto, não houve produção de blastocistos em nenhum experimento. Nos Experimentos 4, 5 e 6 notou-se que em todos os grupos o número de células viáveis dos embriões após a vitriificação foi significativamente menor que nos grupos controles, utilizando-se ou não a citocalasina B (GC c/CitB=98,4%; GC s/CitB=97,8%; G4 c/CitB=35,6%; G4 s/CitB=25,1%; G5 c/CitB=31,2%; G5

s/CitB=48,8%; G6 c/CitB=37,8%; G6 s/CitB=39,6%), indicando que a vitrificação aumentou o número de células inviáveis dos embriões. As taxas de re-expansão foram mais altas nos grupos controle do que nos demais grupos após o aquecimento (GC c/CitB=29,8%; GC s/CitB=54,3%; G5 s/CitB=10,5%; G6 s/CitB=7,4%; 0% no restante). Os únicos grupos de embriões vitrificados nos quais ocorreu re-expansão foram aqueles que utilizaram DF na composição da solução crioprotetora indicando que esta substância pode ter um efeito benéfico na vitrificação de embriões bovinos. Os resultados deste trabalho confirmam a dificuldade em se criopreservar ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. Mais estudos precisam ser realizados na tentativa de melhorar os índices de clivagem e produção de blastocistos utilizando-se ovócitos vitrificados. Da mesma forma o efeito benéfico da DF na vitrificação de embriões bovinos também precisa ser confirmada.

ABSTRACT

Elen Silvia Carvalho Siqueira Pyles. Vitrification of bovine oocytes and embryos using ethylene-glycol (EG), DMSO and dimethylformamide (DF) as cryoprotectors. Botucatu, 2006, 112 p. PhD Thesis. UNESP – FMVZ.

In this study bovine oocytes (Experiments 1, 2 and 3) and embryos (Experiments 4, 5 and 6) were vitrified in OPS using 3 different cryoprotectant solutions: Experiments 1 and 4) 20%EG + 20%DMSO + 0,5M sucrose; Experiments 2 and 5) 20%DF + 20%EG + 0.5M sucrose; Experiments 3 and 6) 20%DF + 20%DMSO + 0.5M sucrose. Embryos were vitrified in the presence or not of cytochalasin B. Oocytes were vitrified or just exposed to the cryoprotectant solutions after 0h (G0h and G0hexp), 6h of IVM (G6h and G6hexp), 12h of IVM (G12h and G12hexp) and 22h of of *in vitro* maturation (IVM) (G22h and G22hexp). Oocytes from groups 0 and 6h were considered immature and from 12 and 22h groups were considered mature. After exposure to cryoprotectants or warming, part of the oocytes that completed 22h of IVM were submitted to IVF to evaluate their developmental ability. Another part of the oocytes were used to evaluate nuclear maturation in the distribution of mitochondria and cortical granules. The results showed that the exposure of immature oocytes (0 and 6 hours of MIV) to cryoprotectants reduce their viability, since cleavage rates of all groups were significantly lower compared to control group (GC=79.4%; 1G0hexp=37.1%; 1G6hexp=51.1%; 2G0hexp=33%; 2G6hexp=52.5%; 3G0hexp=36.2%; 3G6hexp=49.8%). This effect was less evident in the groups of mature oocytes submitted to IVM for 12 or 22 hours (1G12hexp=59.1%; 1G22hexp=71.1%; 2G12hexp=61.5%; 2G22hexp=62.5%; 3G12hexp=58.8%; 3G22hexp=68.6%). The previous IVM is beneficial to vitrification. Although none of the cryoprotectant solutions utilized were totally efficient in protecting the oocytes from cryodamage, in Experiment 1 cleavage was observed (1G12h=7.3%; 1G22h=4.2%) indicating that the combination of EG+DMSO was more effective than the other two. However in none of the groups blastocyst was formed. When embryos were vitrified in experiments 4, 5 and 6 the results showed that the number of viable cells in the control group, independently of the use of cytochalasin B, was significantly higher than all vitrified groups (GC c/CitB=98.4%; GC s/CitB=97.8%; G4 c/CitB=35.6%; G4

s/CitB=25.1%; G5 c/CitB=31.2%; G5 s/CitB=48.8%; G6 c/CitB=37.8%; G6 s/CitB=39.6%). The re-expansion rates were also significantly higher in the control group than in the vitrified groups (GC c/CitB=29.8%; GC s/CitB=54.3%; G5 s/CitB=10.5%; G6 s/CitB=7.4%; 0% in other groups). However, only the groups with DF in its composition showed re-expansion, indicating a potential beneficial effect of this compound. Cytochalasin B showed no effect on re-expansion of control embryos, but was deleterious after cryopreservation. The results of this study confirm the difficulties to criopreserve oocytes and *in vitro* produced embryos. More studies need to be done to improve cleavage rate and blastocyst formation after vitrification of oocytes and the beneficial effect of DF to vitrified embryos need to be confirmed.

INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a criobiologia reprodutiva tem sido desenvolver um método eficiente de criopreservação de ovócitos e embriões humanos e de animais domésticos. Várias técnicas têm sido testadas para a criopreservação dessas estruturas, utilizando ovócitos em diferentes estágios de maturação, diferentes crioprotetores, temperatura de exposição aos crioprotetores, curvas de congelamento, estabilizadores do citoesqueleto e protocolos de descongelamento.

O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação aplicável às espécies mamíferas tem diversas implicações em técnicas de reprodução assistida. Na medicina veterinária, os objetivos primordiais são aumentar a produtividade de animais de alto valor genético ou mesmo a preservação de espécies raras ameaçadas de extinção, as quais podem ser utilizadas para propagar e proteger a biodiversidade. A constituição destes bancos possibilita a conservação e posterior utilização (à medida que houver necessidade) de ovócitos oriundos de folículos pré-antrais, obtidos a partir de um único ovário pertencente a animais de alto valor zootécnico e/ou em risco de extinção. Sendo assim, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos específicos que resultem em boa preservação de ovócitos, os quais possam minimizar os danos ultra-estruturais causados às células em decorrência do processo de vitrificação e, conseqüentemente, maximizar a sua viabilidade.

No entanto, até hoje não foi proposto um protocolo ideal para a criopreservação de ovócitos e de embriões bovinos. Vários são os agentes crioprotetores testados. Os mais utilizados são o glicerol, etilenoglicol e o DMSO. A dimetilformamida (DF) é um crioprotetor utilizado na congelamento de sêmen equino, sendo observada uma melhora na motilidade quando comparado a outros crioprotetores. Baseado nestes resultados o EG, o DMSO e a DF foram testados como agentes crioprotetores na vitrificação de ovócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Devido à fragilidade da membrana plasmática e sua sensibilidade à congelamento é necessária a investigação de métodos para superar ou prevenir a ruptura do citoesqueleto embrionário durante e após a criopreservação. Segundo a literatura os crioprotetores e a criopreservação podem provocar

ruptura no citoesqueleto do embrião e para se evitar este fato, uma alternativa seria provocar a despolimerização reversível dos filamentos de actina antes da criopreservação. Para se melhorar os índices de sobrevivência de blastocistos produzidos *in vitro* após a criopreservação, as citocalasinas têm sido empregadas como estabilizadores de microfilamentos para prevenir danos e estabilizar a membrana plasmática.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Maturação Ovocitária

A maturação ovocitária é definida como o conjunto de eventos associados ao reinício da meiose, o qual culmina com a quebra da vesícula germinativa e finalização da primeira divisão meiótica, caracterizando a maturação nuclear. O processo da maturação ovocitária também inclui alterações citoplasmáticas, caracterizadas por mudanças na morfologia de diversas organelas, bem como no padrão de fosforilação de proteínas (THIBAUT et al., 1975).

A maturação do ovócito constitui a transição de prófase da primeira divisão meiótica para metáfase da segunda divisão meiótica (DURANTHON e RENARD, 2001). *In vivo*, a maturação é um processo que coincide com o desenvolvimento folicular e progressão da meiose. O reinício da meiose é marcado pela extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação da placa metafásica II (LEE e NURSE, 1988; CRAN e MOOR, 1990).

No ovário, os ovócitos são mantidos no estágio de diplóteno da prófase I da meiose. Em mamíferos a maturação ovocitária é estimulada pela retirada da influência inibitória das células foliculares. A adição de hormônios (ou remoção do ovócito do interior do folículo) é seguida por um período latente, de duração variável entre as espécies. Este período corresponde a transdução do sinal hormonal. Sendo assim, a ocorrência da maturação meiótica é acompanhada e provavelmente regulada por mudanças no padrão de fosforilação de várias proteínas celulares. Um componente importante é a atividade do fator promotor de maturação (MPF) (MASUI e MARKERT, 1971), o qual acredita-se ser um regulador universal do ciclo celular, tanto na mitose como na meiose (NURSE, 1990).

In vivo, os ovócitos bovinos reassumem a meiose após o pico pré-ovulatório de LH, enquanto *in vitro* reassumem a meiose espontaneamente quando os complexos cumulus-oócitos são retirados do folículo e incubados sob condições favoráveis (MAYES e SIRARD, 2001).

A progressão do processo de meiose no ovócito é marcada por uma série de mudanças estruturais. A presença de um núcleo intacto ou vesícula

germinativa (GV) é indicativa de imaturidade do ovócito (McGAUGHEY et al., 1990). Os ovócitos imaturos sofrem poucas modificações durante a fase de crescimento folicular. As mudanças citoplasmáticas características do final do crescimento folicular incluem aumento no número de mitocôndrias, as quais modificam seu aspecto arredondado adquirindo a forma de alteres (VOLGELSANG et al., 1987). O aparato de Golgi também se modifica e ao mesmo tempo ocorre aumento no número de ribossomos presentes (FULKA et al., 1998). A formação de estruturas parecidas com lisossomas, os grânulos corticais, é essencial para a maturação ovocitária. Os grânulos corticais se formam no aparato de Golgi e migram para a borda externa do ooplasma. Acredita-se que a migração dos grânulos corticais seja um passo importante na maturação citoplasmática (CRAN, 1989) e pode ser utilizada como indicativo da maturidade citoplasmática do ovócito (LONG et al., 1994; GOUDET et al., 1997). A redistribuição dos grânulos corticais propicia ao ovócito a capacidade de iniciar o bloqueio à polispermia (CRAN, 1989).

O ovócito imaturo, em resposta ao MPF ativo inicia a condensação dos cromossomos, o desaparecimento do envelope nuclear (GVBD), formando-se então a placa metafásica da primeira divisão meiótica (MI) com a expulsão do primeiro corpúsculo polar, em paralelo com um decréscimo na atividade do MPF (MURRAY, 1989; MURRAY e KIRSHNER, 1989; MOTILIK e KUBELBA, 1990). A atividade do MPF aumenta novamente, induzindo a formação imediata do fuso da segunda divisão meiótica, sem a reorganização do envelope nuclear, descondensação dos cromossomos e replicação de DNA. Os ovócitos ficam então parados no estágio de metáfase II, com altos níveis de MPF até o momento da fecundação (HASHIMOTO e KISHIMOTO, 1988; CHOI et al., 1991; NAITO e TOYODA, 1991; JELINKOVA et al., 1994; DEDIEU et al., 1996; TAIEB et al., 1997; WU et al., 1997).

2. Influência do Estágio de Maturação na Criopreservação de Ovócitos

Ovócitos são particularmente difíceis de serem criopreservados por serem as maiores células do corpo de mamíferos. Durante o equilíbrio, altas concentrações de gradientes de crioprotetores podem surgir resultando em danos tóxicos numa parte da célula e crioproteção insuficiente em outra. Os

efeitos osmóticos são também aumentados e durante o equilíbrio e a diluição os ovócitos podem sofrer mudanças extremas na forma resultando em possíveis danos à membrana e ao citoesqueleto (AMAN e PARKS, 1994; MARTINO et al., 1996 a). O resfriamento pode também resultar em diminuição dos índices de fertilização causada pela exocitose prematura dos grânulos corticais e o endurecimento da zona pelúcida (FUKUI et al., 1995).

Os ovócitos respondem à criopreservação diferentemente dependendo do estágio de maturação nuclear. Ovócitos em GV parecem ser mais sensíveis à criopreservação do que ovócitos em MII. Ovócitos em GVBD são mais resistentes ao resfriamento do que aqueles em GV e MII. Quando resfriados à 5,5°C por 10 minutos, ovócitos em GVBD produzem maiores taxas de clivagem e blastocistos do que aqueles em GV ou MII. Porém, quando ocorre criopreservação, os ovócitos em GVBD demonstram sensibilidade maior à baixas temperaturas quando comparados com aqueles em MII, pela produção de blastocistos observada após fertilização e cultivo *in vitro*. A razão para a maior sensibilidade natural dos ovócitos bovinos nesse estágio para a criopreservação é desconhecida (MEN et al., 2002).

Em adição aos efeitos negativos, os processos bioquímicos no interior dos ovócitos também podem ser afetados pela criopreservação, assim influenciando negativamente a maturação citoplasmática dos ovócitos (MEN et al., 2002). Didion et al. (1990) examinaram a viabilidade de ovócitos imaturos de porcas após o resfriamento ou congelação pelos métodos convencionais, e observaram que ovócitos imaturos com cumulus intacto não sobrevivem ao resfriamento à temperatura de 15°C ou menores. No mesmo trabalho constatou-se que após a centrifugação, a redistribuição dos lipídeos ocorre dentro de 48 horas de cultura *in vitro* em ovócitos controle, porém depois da congelação e descongelação a polarização dos lipídeos é irreversível. Isto sugere que os processos de congelação e descongelação podem alterar as propriedades físico-químicas dos lipídeos intracelulares. Os lipídeos intracelulares são fonte de energia para o ovócito e constituem material para a membrana citoplasmática do futuro embrião.

Hochi et al. (1997) vitrificaram ovócitos às 0, 6, 12 e 24 horas de maturação e notaram que aqueles maturados por 12 horas se encontravam no melhor estágio para vitrificação. Entre todos os estágios de meiose

examinados, ovócitos em MII provaram ser o estágio mais resistente à criopreservação. A maior porcentagem de blastocistos provenientes de ovócitos criopreservados foi obtida de ovócitos vitrificados em estágio de MII. Esses resultados sugerem que a tolerância dos ovócitos à criopreservação aumenta de acordo com o estágio de maturação.

LeGal et al. (1994) também afirmaram que o estágio da meiose em que a célula se encontra afeta a sobrevivência dos ovócitos após a criopreservação. Estes autores demonstraram que ovócitos em metáfase II da meiose são mais permeáveis aos crioprotetores em comparação com ovócitos em prófase ou metáfase I e concluíram que as modificações do citoesqueleto afetam as propriedades osmóticas do ovócito.

Im et al. (1997) observaram que complexos cumulus-ovócitos bovinos maturados por 21 horas *in vitro* antes de serem submetidos à criopreservação foram menos danificados quando o mesmo protocolo de congelação lenta foi utilizado para ovócitos imaturos. Otoi et al. (1995) utilizaram etilenoglicol e diferentes concentrações de sacarose para congelar ovócitos maduros e imaturos de bovino, sendo que o grupo de imaturos foi subsequenteamente maturado *in vitro* após a descongelação. Os índices de fertilização no grupo de ovócitos imaturos foram de 27,8, 22,2 e 16,7% para 0, 0,1 e 0,2M de sacarose, respectivamente. No grupo de maduros foram obtidos índices de fertilização de 63,4, 54,5 e 63,3% para 0, 0,1 e 0,2M de sacarose, respectivamente. Os índices de fertilização no grupo controle (ovócitos não congelados) foram de 86,6%.

Lim et al. (1992) concluíram que ovócitos bovinos imaturos não sobrevivem à congelação da mesma forma que os maturados *in vitro*, pois o arranjo das micro-organelas no ovócito imaturo é mais sensível ao choque térmico, com comprometimento da síntese protéica envolvida na maturação, fertilização e desenvolvimento. Após a criopreservação, os ovócitos apresentam competência de desenvolvimento comprometido. Isto pode ser primeiramente explicado pelo dano nuclear, incluindo desorganização do fuso e perda de parte dos microtúbulos, como também outras alterações ultra-estruturais vistas em ovócitos vitrificados. O estágio nuclear no qual os ovócitos são submetidos à criopreservação influencia a habilidade futura do ovócito em se desenvolver após a FIV. Durante a MIV, condições de maturação podem

influenciar na sensibilidade dos ovócitos à criopreservação. Ovócitos maturados por 0, 6 e 12 horas têm menos habilidade de sobreviver à criopreservação que os maturados por 24 horas (DIEZ et al., 2005).

Os elementos do citoesqueleto são sensíveis às alterações de temperatura. A congelação das células resulta numa despolimerização prematura dos filamentos de actina (HALL et al., 1993; SAUNDERS e PARKS, 1999). Estudos relacionados com sensibilidade ao frio conduzidos com ovócitos em MII mostraram que o principal dano ocorre devido à desorganização do fuso meiótico seguido pela despolimerização dos microtúbulos. Assim, ovócitos em estágio de GV são extremamente sensíveis à temperaturas baixas, com os danos ocorrendo na membrana citoplasmática. A exposição aos crioprotetores contidos numa solução de vitrificação afeta mitocôndrias, vesículas e/ou microvilos e reduz o desenvolvimento embrionário após a fecundação de ovócitos em MII, provavelmente como consequência do choque osmótico. A apoptose e a desorganização do fuso da MII levando à aberrações cromossômicas são observadas em ovócitos após a vitrificação. Modificações na estrutura do citoesqueleto, mitocôndria, complexo de Golgi, nucléolo e retículo endoplasmático liso também são observadas em ovócitos bovinos vitrificados e aquecidos (DIEZ et al., 2005).

3. Criopreservação

Em bovinos, o significado prático da criobiologia reprodutiva é a preservação das raças com risco de extinção, bem como o desenvolvimento de tecnologias relacionadas à transferência nuclear ou microinjeção de genes. Um dos princípios da criopreservação mais importantes reside na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes de se proceder a sua congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr, 1986).

O principal solvente biológico responsável pelo transporte de nutrientes e substâncias químicas é a água, que em estado puro forma cristais a 0°C, enquanto quando contém íons e/ou outras substâncias em solução congela à temperaturas mais baixas, dependendo da concentração e natureza dessas.

Quando ocorre a congelação das soluções aquosas, parte da água forma cristais de água pura, tornando a solução restante cada vez mais concentrada (PICKETT e BERNDTSON, 1978). Este processo provoca um aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a este estresse, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto torna-se grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY e STOREY, 1990).

Dessa forma, os danos causados aos tecidos durante os processos de congelação e descongelação são devido principalmente a: formação de cristais de gelo intracelulares que afetam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação que ocorre durante a congelação tanto no meio extra como intracelular; interação entre esses dois fatores. A natureza exata dos danos causados pela congelação aos tecidos não está totalmente esclarecida. Aparentemente o dano causado pela congelação é consequência da pressão diferencial de vapor entre o gelo e a água, em temperaturas abaixo de 0°C. A teoria diz que uma grande pressão de vapor de água poderia levar à injúria por desidratação durante a congelação lenta e à ruptura das membranas celulares, durante a congelação rápida (PICKETT, 1986).

Como resultado dos danos causados pelos efeitos da solução, as células de mamíferos, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20°C, a não ser que se utilize um crioprotetor (SZELL e SHELTON, 1986).

Se a redução do volume celular atingir um mínimo crítico, a bicamada de fosfolipídeos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se quebra. Com isso, as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas, ao mesmo tempo, rupturas na membrana se tornam porta de entrada do gelo extracelular para o interior da célula (STOREY e STOREY, 1990). Desta forma, para que uma substância tenha uma boa ação crioprotetora, deve atuar elevando a osmolaridade intracelular, para controlar a desidratação e deve ainda interagir com a membrana celular, estabilizando-a (MERYMAN, 1974).

McGann (1978), considerando as inter-relações dos crioprotetores com as membranas biológicas, classificou-as em crioprotetores que penetram na

célula (dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol, glicerol, etilenoglicol (EG), etc.) e crioprotetores que não penetram na célula (polímeros (PVC), sacarose, etc.).

O mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não está completamente elucidado. Mazur (1970 e 1980), Leibo (1977), Meryman et al. (1977), McGann (1978), Jondet et al. (1984) e Lehn-Jensen (1984) consideraram que o mecanismo de ação dessas substâncias baseia-se principalmente na promoção do abaixamento do ponto de solidificação da solução na congelação. Isto é benéfico por várias razões, mas principalmente porque promove um maior tempo para que ocorra desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares.

Uma segunda função do crioprotetor parece ser sua interação com a membrana celular exercendo ação estabilizadora durante as mudanças do estado relativamente líquido, para o estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido na descongelação. Por exemplo, o crioprotetor parece diminuir a fragilidade das membranas impedindo que se quebrem (SEIDEL Jr., 1986). Além disso, alguns crioprotetores como o DMSO podem inibir a atividade da catalase e da peroxidase, diminuindo assim a produção de radicais livres envolvidos nas injúrias causadas pela congelação (RAMMLER, 1967).

Outra possível ação dos crioprotetores é a de diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular; muitas moléculas se dissolvem na mistura de crioprotetor e na água, tornando-se menos lesivas do que quando dissolvidas em altas concentrações em um líquido na ausência do crioprotetor (SEIDEL Jr., 1986).

Pesquisas têm mostrado que um dos fatores que afetam a competência do desenvolvimento de ovócitos bovinos congelados é o tipo de crioprotetor utilizado. O EG devido à sua alta permeabilidade e baixa toxicidade tem se mostrado ser o mais conveniente para a vitrificação de ovócitos humanos, bovinos e eqüinos. O DMSO causa separação dos fusos dos microtúbulos e movimentação do material pericentriolar para o centro do ovócito (CETIN e BASTAN, 2006).

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a congelação e descongelação, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento

consideradas ótimas. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: primeiro, a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1986); segundo, os agentes crioprotetores podem ter ação direta na produção de crioinjúrias, como por exemplo, alterando a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (ARNOLD et al., 1983).

A propensão de um ovócito para sobreviver à criopreservação depende de seu tamanho (LeGAL et al., 1994; AL-HASINI e DIEDRICH, 1995) e do estágio celular em que se encontra (OTOI et al., 1995). Quanto maior o volume do ovócito, maior o tempo necessário para que a célula atinja o equilíbrio osmótico em presença de crioprotetores. Desta forma, sucesso limitado na criopreservação tem acontecido em espécies com ovócitos muito grandes, entretanto, o tamanho tem feito do ovócito uma célula exemplar para o estudo teórico de princípios da criopreservação, como os coeficientes de permeabilidade (LeGAL et al., 1994; AL-HASINI e DIEDRICH, 1995). Isto explica o motivo da criopreservação de ovócitos bovinos ser difícil de se realizar com sucesso e resultar em baixas taxas de produção de blastocistos após o aquecimento, FIV e cultura *in vitro*, pois devido ao seu grande tamanho é mais difícil para a água e os crioprotetores se moverem através da membrana plasmática (SEIDEL Jr., 2006).

Um embrião quando é exposto a um crioprotetor de baixo peso molecular, permeável à membrana, geralmente se retrai dada a saída de água intracelular, causada pela concentração hiperosmótica do meio extracelular. Como o embrião é mais permeável à água do que ao crioprotetor, a retração celular continua, até que o efluxo da água seja equilibrado com o influxo da solução crioprotetora, conforme descreveram Lehn-Jensen (1984) e Seidel Jr. (1986). A formação de cristais de gelo é diretamente proporcional ao volume e inversamente proporcional à viscosidade da solução e à taxa de resfriamento. Uma diminuição na taxa de sobrevivência após a criopreservação foi notada quando o volume da cavidade blastocélica foi aumentado (LIEBERMANN et al., 2002). Uma penetração insuficiente de crioprotetor para o interior da cavidade pode permitir a formação de cristais de gelo durante o resfriamento, reduzindo a taxa de sobrevivência após o aquecimento. A desidratação da blastocele pode não ocorrer adequadamente após três minutos de exposição à solução de

vitricificação. As taxas de sobrevivência de blastocistos expandidos criopreservados podem ser melhoradas pela redução artificial da cavidade blastocélica (LIEBERMANN et al., 2002).

No caso de embriões congelados, as taxas de resfriamento e aquecimento e a composição do meio de congelação são os principais fatores críticos que influenciam na viabilidade pós-aquecimento. O resfriamento pode causar injúria celular pela exposição prolongada numa solução extremamente concentrada, causando o dano denominado “efeito da solução”, e ainda pode causar injúria celular pela formação de gelo intracelular. Embriões resfriados apropriadamente devem também ser aquecidos numa taxa ótima para evitar danos causados pelo choque osmótico ou recristalização do gelo durante o processo de aquecimento (HOCHI et al., 2001).

O intervalo de tempo em que ocorre o retorno ao volume inicial atingindo-se o equilíbrio osmótico está relacionado: a) espécie animal do embrião em questão; b) estágio de desenvolvimento; c) relação superfície/volume do embrião; d) características intrínsecas do crioprotetor; e) temperatura em que o embrião é exposto. De acordo com Leibo (1996), esses aspectos relativos à permeabilidade de membrana explicariam em parte, as diferenças observadas entre os vários crioprotetores, quanto à eficiência.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* não sobrevivem à criopreservação tão bem como aqueles produzidos *in vivo*, o que pode estar relacionado ao seu maior conteúdo lipídico. Embriões cultivados *in vitro* na ausência de SFB são mais criotolerantes que aqueles cultivados em meio contendo soro. A redução do conteúdo lipídico citoplasmático dos embriões com fenazina etosulfato (PES), um composto que oxida NADPH, promove criotolerância aos embriões bovinos cultivados na ausência de soro (SEIDEL Jr., 2006).

Em um estudo realizado por Lazar et al. (2000), 117 blastocistos foram vitrificados, utilizando a associação de EG e DMSO como crioprotetores. Após o aquecimento, foram cultivados durante 24 horas. As taxas de re-expansão foram de 69,2% (81) e 39,5% (32) eclodiram. As taxas de re-expansão e eclosão diferiram entre os blastocistos vitrificados nos dias 7 e 8 ou 9 (74,6% e 46% versus 62% e 29%). Nasceram 3 bezerros dos 18 embriões transferidos (16,7%).

A dimetilformamida e dietilformamida podem ser crioprotetores interessantes se não forem tóxicos quando adicionados antes da criopreservação. Para a vitrificação completa da solução crioprotetora, a efetividade da dietilformamida e dimetilformamida é média, comparada a outros crioprotetores; é comparável ao DMSO, maior que a do glicerol e EG e menor que a do 1,2 propanodiol e levo-2,3-butanodiol. Estes componentes (dietilformamida e dimetilformamida) poderiam ser novos crioprotetores efetivos para órgãos dependendo da sua toxicidade química e osmótica quando adicionados para a criopreservação, na dependência de sua toxicidade na solução suporte, e na possibilidade da presença simultânea de outros crioprotetores (BAUDOT e BOUTRON, 1998).

Alvarenga et al. (2000) testaram o glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida na congelação de sêmen eqüino. Após a descongelação foi observado menor número de espermatozóides móveis e também de espermatozóides com movimento progressivo no grupo congelado na presença de DMSO. A porcentagem de espermatozóides viáveis não diferiu entre os grupos. Foi observada melhora na motilidade quando a dimetilformamida foi utilizada. Os autores concluíram que o EG e a dimetilformamida promoveram crioproteção similar ao glicerol e foram mais eficazes na preservação de espermatozóides móveis de eqüinos que o DMSO.

4. Toxicidade dos Agentes Crioprotetores

A criopreservação causa aumento significativo nas taxas de degeneração de ovócitos e de embriões bovinos durante a cultura. As células normalmente se degeneram pelos mecanismos de apoptose ou de necrose. A apoptose é um mecanismo de degeneração celular endógeno que é necessário para o desenvolvimento normal e homeostase tecidual (MEN et al., 2003).

O processo apoptótico também pode ser ativado em resposta à uma grande variedade de estímulos não fisiológicos, como temperatura, agentes tóxicos, estresse oxidativo e radiação. As características morfológicas das células apoptóticas são marginalização da cromatina e formação de corpos apoptóticos. É muito importante que se elucide o mecanismo envolvido na degeneração dos ovócitos após a criopreservação porque geralmente os

ovócitos criopreservados são fertilizados e cultivados até blastocistos usando os mesmos protocolos de cultura desenvolvidos para ovócitos não criopreservados. Esta é uma das razões para que os ovócitos criopreservados necessitem de um sistema de cultivo especial (MEN et al., 2003).

Na pesquisa de Men et al. (2003), mais de 90% dos ovócitos criopreservados estavam viáveis imediatamente após o aquecimento, pela análise morfológica, confirmada pelo teste de permeabilidade da membrana com iodeto de propídeo. Porém, o efeito negativo da criopreservação foi se expressando gradualmente durante a cultura *in vitro*. A primeira perda massiva de viabilidade dos ovócitos ocorreu devido falha na fertilização. Apenas 50% dos ovócitos clivaram. Um mecanismo de degeneração se iniciou naqueles ovócitos não clivados. Sobre os embriões clivados, apenas 5% se desenvolveram até o estágio de blastocisto. A maioria parou seu desenvolvimento durante os primeiros dias de cultivo e começou a se degenerar. Segundo os autores, vários fatores como o resfriamento, crioprotetores, o efeito osmótico podem contribuir para o início da apoptose. A hipotermia pode induzir a apoptose de células germinativas de ratas em estágios específicos e em células murinas cultivadas. A alta concentração de crioprotetores usada para a vitrificação é tóxica para as células e os crioprotetores podem não ser completamente removidos das células após o aquecimento e assim, crioprotetor residual pode interagir com as estruturas celulares ou moléculas e resultar no impedimento do desenvolvimento.

Por outro lado, os agentes crioprotetores são essenciais para a criopreservação de células. Considerando-se a alta concentração de crioprotetores usados para a vitrificação e tendo em vista os seus efeitos biológicos e físico-químicos, a toxicidade desses agentes é o fator limitante na criobiologia (LIEBERMANN et al., 2002).

Hanada e Nagase (1980) afirmaram que as propriedades requeridas para um eficiente agente crioprotetor devem ser baixo peso molecular, habilidade para atravessar a membrana das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e ser atóxico.

A toxicidade do crioprotetor é um obstáculo fundamental para se obter sucesso na criopreservação. A alteração de uma enzima específica (frutose difosfatase – FDFase) é a causa da glicólise prejudicada após o tratamento e

remoção do DMSO. A alteração da FDPase pelo DMSO pode ser prevenida pela presença simultânea de amidas (FAHY et al., 1990).

A congelação e os agentes crioprotetores parecem alterar o equilíbrio entre os fatores fundamentais envolvidos na manutenção da estabilidade das estruturas biológicas (FAHY, 1986). Uma variedade de observações foi descrita na literatura tentando elucidar a natureza da toxicidade dos agentes crioprotetores como:

a) DMSO, propileno glicol, glicerol e formamida: promovem polimerização da tubulina e alteração no fuso meiótico (ROBINSON e ENGELBORGHES, 1982; KENNEDY, 1986; JOHNSON e PICKERING, 1987; RENARD e PRULIERE, 1988; VAN DER ELST et al., 1988).

b) DMSO: permeabiliza ou lisa a membrana plasmática (DE BRUIJNE e VAN STEVENINCK, 1969).

c) DMSO, glicerol e sorbitol: induzem a fusão celular (AHKONG et al., 1975).

d) DMSO: causa modificações na conformação da cromatina e do DNA em células viáveis (REBOULLEAU e SHAPIRO, 1983).

Tanto as baixas temperaturas a que são submetidos os ovócitos, como a adição de substâncias crioprotetoras modificam a organização dos microfilamentos de actina. Efeitos deletérios no citoesqueleto de actina foram observados após a criopreservação de ovócitos bovinos. Devido à associação dos microfilamentos com outras estruturas, é possível que sua destruição seja o resultado de danos em outros componentes celulares como a membrana plasmática ou mitocôndria. Sendo assim, quando a distribuição normal dos microfilamentos é modificada após a exposição aos crioprotetores e à vitrificação, alterações irreversíveis de outros componentes celulares podem ter ocorrido como a liberação precoce das enzimas dos grânulos corticais. Estas mudanças podem prevenir completamente a fertilização ou incompletamente o bloqueio à polispermia, ambos levando à diminuição nas taxas de clivagem após a inseminação (ALBARRACÍN et al., 2005).

Estudando o efeito do resfriamento de ovócitos de mamíferos, uma crio-influência negativa é percebida nos elementos do citoesqueleto. O resfriamento de ovócitos de ratos causa despolimerização das estruturas das proteínas do citoesqueleto. A maioria dos ovócitos de ratas resfriados à 25°C durante 10

minutos apresenta citoesqueleto anormal. Após exposição à 4°C durante 20 minutos ocorre desunião completa dos fusos. Este processo de despolimerização contudo é reversível, voltando ao normal após aquecimento à 37°C durante 60 minutos (LIEBERMANN et al., 2002). Os ovócitos bovinos também são sensíveis à diminuição na temperatura; sendo que 56% dos ovócitos expostos à 25°C e 90% dos expostos à 4°C por um minuto apresentaram fusos anormais. Ovócitos expostos à 0°C por apenas dois minutos tiveram uma redução significativa nas taxas de fertilização (LIEBERMANN et al., 2002).

A observação mais clara é que a estabilização excessiva dos microtúbulos provocada pelos agentes crioprotetores pode promover efeitos mínimos ou interferir com a divisão celular normal. A exposição de células de ovo ao DMSO, propileno glicol ou formamida pode levar à desmontagem do fuso meiótico. Esta desorganização pode ser observada pela formação anormal do áster durante a meiose no caso do DMSO e formamida (FAHY et al., 1990).

Existem evidências de que solventes orgânicos, como os crioprotetores, influenciem na dinâmica do citoesqueleto. De acordo com Gekko e Timasheff (1981), o glicerol ou o DMSO além de poderem induzir a montagem de microtúbulos *in vitro*, parecem estabilizar os filamentos de actina. Vicent et al. (1988) ao estudarem ovócitos de coelha submetidos à congelação observaram que a exposição tanto ao DMSO como ao 1,2 propanodiol levou ao aparecimento de microtúbulos no citoplasma e ao desarranjo do fuso meiótico. Estes microtúbulos citoplasmáticos ainda estavam presentes após a congelação, descongelação e remoção do crioprotetor. O mesmo tipo de alteração foi observado por Renard e Pruliere (1988), que constataram que este efeito é reversível, mas a organização normal dos microtúbulos só reaparece muitas horas após a remoção dos crioprotetores.

5. Vitrificação

Um dos fatores que limita o sucesso na congelação de ovócitos é a ocorrência de injúrias causadas pelo abaixamento da temperatura durante o processo. Estas injúrias resultam em danos irreversíveis à membrana plasmática. Como os ovócitos bovinos são muito frágeis, neste estágio é

desejável que o decréscimo da temperatura ocorra rapidamente, como acontece no processo de vitrificação. A técnica de vitrificação tem como objetivo prevenir danos causados pelo frio, por evitar a formação de cristais de gelo. A vitrificação de ovócitos tem sido bem sucedida em várias espécies de mamíferos incluindo ratos, bovinos e humanos (CETIN e BASTAN, 2006).

O estoque de embriões produzidos *in vitro* em nitrogênio líquido é extremamente desejado, em especial no que diz respeito a formação de bancos genéticos e a otimização do uso de receptoras. Contudo, os embriões produzidos *in vitro* têm mostrado ser mais sensíveis à baixas temperaturas do que os produzidos *in vivo*. Para superar esta sensibilidade, o procedimento de vitrificação vem sendo utilizado, podendo produzir maiores taxas de sobrevivência para os embriões produzidos *in vitro* do que aquelas após congelação controlada (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999).

No início de 1985, a criopreservação livre de gelo de embriões de rato à -196°C pela vitrificação foi reportada como uma pesquisa alternativa para a crioestocagem. Desde então as técnicas de vitrificação têm sido utilizada na reprodução animal como um método de criopreservação alternativo ao tradicional protocolo de congelação lenta e aquecimento rápido. Os protocolos de vitrificação são muito simples. Neles as células ou tecidos são incubados na solução crioprotetora e colocados diretamente em contato com o nitrogênio líquido. A criopreservação de ovócitos, zigotos, embriões em estágio de clivagem e blastocistos recebeu destaque ao fazer parte de programas de fertilização *in vitro* (LIEBERMANN et al., 2002).

De acordo com Vajta (1997a), a vitrificação é definida como a solidificação de uma solução à baixa temperatura não pela formação de cristais de gelo, mas pela extrema elevação na viscosidade da solução durante o resfriamento. A viscosidade da amostra começa a aumentar até que as moléculas iniciem a imobilização e a amostra não mais é líquido, mas tem sim as propriedades de um sólido. Contudo, a vitrificação é resultado de altas taxas de resfriamento associadas com altas concentrações de crioprotetores. Isso pode ser conseguido através do aumento da viscosidade da solução associado à alta velocidade de resfriamento e aquecimento. Este método foi desenvolvido inicialmente para embriões murinos, mas tem sido aplicado também para embriões bovinos e eqüinos (RALL e FAHY, 1985; MASSIP et al., 1986;

HOCHI et al., 1996). Comparando as duas técnicas, a congelação lenta é uma tentativa de manutenção do equilíbrio entre danos osmóticos e tóxicos utilizando baixas concentrações de crioprotetores e controlando a formação de gelo através da congelação do meio extracelular e desidratação do embrião. Em contraste, a estratégia de vitrificação é mais radical, pois é baseada na eliminação total da formação de gelo. As altas concentrações de crioprotetores aumentam os danos osmóticos e tóxicos. Por outro lado a alta velocidade de resfriamento e aquecimento resulta em uma rápida passagem através da temperatura crítica ao redor de 0°C, o que minimiza os danos causados pelo resfriamento (LIEBERMANN et al., 2002).

A vitrificação pode ser obtida em dois passos: 1) aumentando a velocidade da condução de temperatura e 2) aumentando a concentração de crioprotetores. Em adição, usando um pequeno volume (<1µl) de crioprotetores em alta concentração, taxas de resfriamento muito rápidas de 15.000 a 30.000°C/min podem ser conseguidas. A estratégia da vitrificação resulta numa eliminação total de formação de cristais de gelo, tanto no interior das células vitrificadas (intracelular) como na solução extracelular. Os dois parâmetros mais importantes para o sucesso da criopreservação com equilíbrio e que também determinam o sucesso da vitrificação e tem um importante impacto na amostra biológica que é resfriada à temperatura fisiológica do nitrogênio líquido são: 1) a velocidade da congelação (isto é, taxa de resfriamento) e 2) os efeitos das substâncias dissolvidas (isto é, concentração dos crioprotetores) (LIEBERMANN et al., 2002).

É importante que haja um balanço entre a maximização da taxa de resfriamento e a minimização da concentração de crioprotetores. A taxa de resfriamento ótima é aquela que permite a máxima saída de água da célula e a vitrificação do meio extracelular. Assim, a estratégia primária de qualquer protocolo de vitrificação deve ser passar rapidamente através da temperatura crítica de 15 a -5°C para diminuir as injúrias (LIEBERMANN et al., 2002).

Como a vitrificação é uma técnica relativamente nova e não foi padronizada até o momento, existem diversos protocolos os quais apresentam diferentes detalhes técnicos (KASAI, 1996; PALASZ e MAPLETOFT, 1996; VAJTA, 1997b).

Para se obter altas taxas de resfriamento é necessário o uso de altas concentrações da solução de crioprotetores o que diminui a formação de cristais de gelo. Desta forma, uma concentração crítica é requerida para a vitrificação. Uma consequência disso é que em alguns crioprotetores, uma mínima concentração pode levar à toxicidade osmótica ou química. A redução na concentração do crioprotetor pode ser obtida através do uso adicional de polímeros não permeáveis, que assim permanecem na área extracelular. A minimização da toxicidade do crioprotetor também pode ser conseguida pelo uso de uma combinação de dois crioprotetores e exposição em dois passos das células às soluções de criopreservação (LIEBERMANN et al., 2002).

As soluções de vitrificação, assim como aquelas utilizadas para a congelação lenta, contêm um crioprotetor, vários sais e normalmente uma ou mais macromoléculas. No caso da vitrificação as macromoléculas parecem ser especialmente importantes, uma vez que nestas soluções a concentração de crioprotetor é muito alta e as macromoléculas modificam o crioprotetor durante o processo de vitrificação. A adição de polietilenoglicol aumenta a viscosidade de soluções de vitrificação contendo EG. Este protocolo foi utilizado para aumentar a sobrevivência de embriões de camundongo (O'NEIL et al., 1997). Outras macromoléculas comumente utilizadas são o Ficoll, o polivinil pirrolidona (PVP) e o dextran. Shaw et al. (1997) examinaram a ação destas três macromoléculas em soluções contendo EG observando que a adição de Ficoll e dextran resultou em uma transição mais lenta para o estado vitrificado comparado com o EG sozinho em salina. O EG e o PVP apresentaram propriedades similares, entretanto, conforme a concentração de PVP aumentou, a transição para o estado vitrificado passou a ser mais lenta.

Nos protocolos de vitrificação, o EG associado a outros crioprotetores não permeáveis tem se tornado a solução mais comumente utilizada (HOCHI et al., 1996; MARTINO et al., 1996b). Um agente crioprotetor não permeável comum é a sacarose, a qual exerce um efeito osmótico significativo, sendo portanto empregada na re-hidratação após a descongelação. Diversas observações confirmam o efeito estabilizante da adição de sacarose na solução de vitrificação. Na presença de sacarose, a estabilidade da membrana dos ovócitos foi sensivelmente aumentada após exposição prolongada à altas concentrações de EG (SZELL e SHELTON, 1986; TODOROV et al., 1993;

RAYOS et al., 1994). Rayos et al. (1994) demonstraram que a adição de 0,25M de sacarose ou trealose ao meio de congelação durante 20 a 40 minutos de equilíbrio resultou em maiores taxas de fertilização de ovócitos de camundongo. Otoi et al. (1995) adicionaram várias concentrações de sacarose à soluções contendo EG para a congelação lenta de ovócitos bovinos, observando que a adição de sacarose aumentou os índices de clivagem tanto de ovócitos imaturos como maturados *in vitro*.

O EG parece ter além de um menor efeito tóxico, uma rápida difusão no momento do equilíbrio dentro da célula, entre a zona pelúcida e a membrana celular. A adição de um açúcar (sacarose, glicose, frutose, sorbitol, trealose ou rafinose) à uma solução de vitrificação baseada em EG modifica essa solução. Aditivos com alto peso molecular, como os dissacarídeos como sacarose ou trealose não penetram a membrana celular e podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor requerida, bem como a toxicidade do EG, pela redução na concentração requerida para promover criopreservação bem sucedida (LIEBERMANN et al., 2002).

É difícil determinar se a curva lenta de congelação, com as possíveis injúrias causadas pela cristalização ou a vitrificação, com os possíveis danos tóxicos e osmóticos seria a técnica mais apropriada para criopreservação de ovócitos bovinos. Os primeiros êxitos em obtenção de blastocistos, bem como a primeira descendência (prole) foram conseguidos pelo método de congelação lenta (LIM et al., 1991; 1992), seguido por publicações reportando padrões de desenvolvimento similares e descendência após a vitrificação (HAMANO et al., 1992; HAMANO e KUWAYAMA, 1992).

Baudot e Boutron (1998) compararam a eficiência em promover uma vitrificação completa utilizando-se soluções crioprotetoras de dietilformamida e dimetilformamida em associação com outros crioprotetores e verificaram que estes compostos são comparáveis ao DMSO, mais eficientes do que o glicerol e etilenoglicol e menos eficientes do que o 1,2 propanodiol. Os autores sugerem ainda que estes componentes possam ser novos crioprotetores efetivos dependendo de sua toxicidade química e osmótica quando adicionados à solução de criopreservação. A dimetilformamida tem sido considerada um bom crioprotetor para sêmen de galo e para linfócitos humanos (BAUDOT e BOUTRON, 1998).

Vários autores concordam que o sucesso na vitrificação de ovócitos requer o uso de altas concentrações de agentes crioprotetores e ao mesmo tempo a minimização de seus efeitos tóxicos e osmóticos. Foi reportado que a concentração de 8M de EG é necessária para vitrificação de ovócitos, entretanto, a mesma concentração de EG é tóxica para embriões murinos em estágio de mórula (ALI e SHELTON, 1993; BRONSHTEYN e STEPPONKUS, 1995).

Hotamisligil et al. (1996) vitrificaram ovócitos murinos após a remoção das células do cumulus. Os ovócitos foram equilibrados em fluido de tuba humana modificado (HEPES - HTF) contendo 2M de EG por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo então transferidos para soluções com concentrações entre 2 e 8M de EG por diferentes intervalos de tempo. Após o aquecimento a remoção do EG foi realizada também em dois passos em solução HEPES - HTF contendo 1M e 0,5M de sacarose (10 minutos cada banho), sendo então lavados com meio Whittingham's à 37°C por 5 minutos antes de serem transferidos para o meio onde seria realizada a inseminação. Os resultados mostraram que, à temperatura ambiente, a adição e remoção do EG em dois passos e em concentrações abaixo de 6M não causam danos osmóticos ou tóxicos aos ovócitos murinos, desde que o tempo de equilíbrio no segundo passo da adição do crioprotetor seja menor que 5 minutos. Longos períodos de exposição à 4M ou concentrações maiores de EG causaram alterações irreversíveis da membrana plasmática. Os ovócitos que foram expostos à 6M de EG suplementado com 0,5M de sacarose toleraram bem ao procedimento de vitrificação e seu desenvolvimento potencial não diferiu do grupo controle.

Isachenko et al. (1998) vitrificaram ovócitos porcinos imaturos. Três experimentos foram conduzidos para investigar os efeitos: da exposição e remoção gradativa ou em um único passo do crioprotetor; da temperatura e da integridade do citoesqueleto no desenvolvimento da vesícula germinativa de ovócitos porcino para o estágio de MII. No experimento I, observou-se que a exposição gradual ao EG sem resfriamento, bem como sua diluição à 42°C tiveram um efeito positivo nos padrões de desenvolvimento após cultivo. No experimento II, também sem resfriamento, os complexos cumulus-ovócitos foram tratados com Citocalasina B à 42°C usando os protocolos de exposição

gradual e em um único passo ao EG. No experimento III, os complexos cumulus-ovócitos foram divididos em dois grupos tratados. No grupo 1 os ovócitos foram vitrificados após exposição gradual ao EG à 42°C e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado pela imersão em banho-Maria à 50°C durante 5 segundos e o crioprotetor foi removido pela exposição à uma série decrescente de solução contendo sacarose à 42°C. No grupo 2 os COCs foram vitrificados usando o mesmo procedimento, porém antecedido pelo tratamento com Citocalasina B. Após o aquecimento e rehidratação em série decrescente de sacarose, os COCs foram cultivados por 48 horas. Os resultados do cultivo (progressão para o estágio MII) sugerem que a remoção gradual do crioprotetor, a temperatura elevada e o pré-tratamento com a Citocalasina B tiveram um efeito positivo na vitrificação de ovócitos porcinos imaturos.

O primeiro caso reportado de sucesso na vitrificação de embriões de rato com 8 células foi feito por Rall e Fahy (1985). Em bovinos, Massip et al. (1986) obtiveram os primeiros bezerros de mórulas compactas e blastocistos iniciais.

Considerando-se que na vitrificação existe um risco considerável de toxicidade atribuída à alta concentração de crioprotetores utilizados, o estágio de desenvolvimento embrionário no momento da criopreservação tem demonstrado importância crítica para a sobrevivência do embrião após aquecimento. O EG tem mostrado não ser tóxico para embriões murinos e pode assim melhorar as taxas de sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* congelados e aquecidos. A alta taxa de penetração e baixa toxicidade desse crioprotetor permite a transferência direta após o aquecimento sem o procedimento de diluição. O EG tem sido utilizado com sucesso em concentração de 1,5 a 1,8M para a congelação lenta de embriões bovinos produzidos *in vivo* (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999).

Há indicações de que o sistema de cultura e a composição do meio podem afetar a qualidade do embrião. Vários estudos têm mostrado que a qualidade do ovócito é o maior fator que determina a produção de blastocisto, o ambiente de cultura *in vitro* ao qual os embriões são expostos após a fertilização é a chave determinante da qualidade do blastocisto. Está bem estabelecido que embriões produzidos *in vitro* diferem daqueles produzidos *in*

vivo em vários aspectos; um deles é a maior susceptibilidade às injúrias da criopreservação. A habilidade dos embriões produzidos *in vitro* em sobreviver à criopreservação depende de sua qualidade, a qual pode ser afetada pelas condições de cultura. Assim, a tolerância à criopreservação é usada como um indicador da qualidade do embrião (PEREIRA et al., 2005).

Embriões bovinos produzidos *in vitro* diferem daqueles produzidos *in vivo* em muitos aspectos importantes. Estas diferenças incluem citoplasma escuro, menor taxa de crescimento e maior sensibilidade térmica, reduzida expressão de artifícios de comunicação intercelular, bem como ultra-estrutura. Tais diferenças ocorrem devido à modificações na expressão gênica. Isto contribui por aumentar a sensibilidade às crioinjúrias exibidas pelos embriões produzidos *in vitro*. Com o advento do procedimento da vitrificação desses embriões, muitos dos efeitos detrimenais das injúrias podem ser evitados. O processo de maturação e fertilização *in vitro* não são os principais fatores que afetam a qualidade do blastocisto, mas sim o cultivo após a fertilização, a mais longa etapa do processo da produção *in vitro*. A viabilidade pós aquecimento dos embriões pode ser avaliada por vários métodos, mas o mais comum é a sobrevivência *in vitro* após um período de cultivo (RIZOS et al., 2001).

6. Vitrificação em Open Pulled Straw (OPS)

A vitrificação é uma alternativa para a criopreservação, a qual pode minimizar os danos pelo aumento nas taxas de congelação e aquecimento. A Open Pulled Straw (OPS) e o “cryoloop” têm sido utilizados para promover taxas de congelação e aquecimento muito rápidas. Foram comparadas as técnicas de OPS, “cryoloop” e congelação lenta convencional para a criopreservação de embriões equinos com EG, DMSO e sacarose como agentes crioprotetores, obtendo resultados similares entre as três técnicas (OBERSTEIN et al., 2001).

O método Open Pulled Straw (OPS) foi desenvolvido por Vajta et al. (1997a). Este método utiliza uma quantidade mínima de solução de vitrificação e reporta taxas de 25% de produção de blastocistos a partir de ovócitos maturados e fertilizados *in vitro* (CETIN e BASTAN, 2006).

A redução do volume das soluções, o contato direto entre a solução e o material resfriado ou aquecido, e a diminuição da espessura da parede da palheta (aproximadamente 0,07mm e 0,15mm para a palheta estendida e original, respectivamente) promovem uma curva de resfriamento ultra-rápida. As conseqüências desta curva foram altamente benéficas para a criopreservação de ovócitos e embriões. Os altos padrões de resfriamento e aquecimento resultaram em diminuição de danos causados pelo resfriamento, o que pode ser muito importante para criopreservação de estruturas ricas em lipídeos, como os ovócitos. Adicionalmente, o alto padrão de mudanças de temperatura permitiu o uso de uma concentração menor de crioprotetores o que, junto com o rápido envase e liberação das estruturas, minimizou as injúrias tóxicas e osmóticas. Além disso, o manejo e armazenamento das palhetas são simples, fáceis e não requerem equipamentos especiais (VAJTA et al., 1997a).

O método OPS tem sido aplicado para criopreservação de ovócitos bovinos maturados *in vitro* e embriões bovinos produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento (VAJTA et al., 1997a e 1997b; VAJTA et al., 1998a e 1998b). Os resultados são sumarizados seguindo quatro pontos:

a) Os padrões de re-expansão de embriões vitrificados no dia 6 (blastocistos iniciais e blastocistos), dia 7 (blastocistos expandidos) foram 90, 97 e 81%, respectivamente. Os padrões de eclosão dos embriões no dia 6 e dia 7, três dias após o aquecimento foram 70 e 94%, respectivamente. Estes valores foram os maiores reportados até o momento na literatura.

b) Quando embriões bovinos produzidos *in vitro* foram vitrificados com o método OPS no dia 1 e dia 2, seus desenvolvimentos para blastocistos foram inferiores comparados com os valores do grupo controle (32 e 50% e 51 e 66%, respectivamente). Porém, quando a vitrificação foi realizada no dia 3, dia 4 e dia 5, os padrões de blastocistos não foram diferentes do controle (61, 67 e 88% para embriões vitrificados, e 61, 77 e 83% para controle). Esses resultados podem ser considerados como um avanço significativo na criopreservação de embriões bovinos, porém nem a curva lenta de congelação e nem os métodos de vitrificação se mostraram adequados até o momento para obtenção de padrões desejáveis de sobrevivência de embriões bovinos

em estágio de pré-compactação produzidos tanto *in vivo* como *in vitro* (LEIBO et al., 1996).

c) Embriões vitrificados no dia 3 foram também utilizados com sucesso como doadores para transferência nuclear 24 horas após o aquecimento. Comparado com os embriões controle do dia 4, o número de blastômeros foi menor, mas os padrões de fusão e desenvolvimento não diferiram significativamente, e 27% dos embriões reconstruídos no grupo vitrificado se desenvolveram *in vitro* até blastocistos. O uso deste estágio de pré-compactação de embriões criopreservados como doadores de blastômeros facilitou a resolução de problemas logísticos em combinar a disponibilidade de doadores para transferência nuclear (VAJTA et al., 1998a).

d) Adicionalmente, o método de vitrificação OPS foi provado adequado para vitrificação de ovócitos bovinos. Os problemas associados com a remoção parcial uniforme das camadas de células do cumulus foram resolvidos pela pipetagem suave 6 horas após o início do período de maturação, quando as camadas externas começam a expandir, porém as 2 a 3 camadas internas estão ainda compactas e fixadas na superfície do ovócito. A curta exposição com relativamente baixa concentração de crioprotetores minimizam as injúrias tóxicas e osmóticas e a velocidade de resfriamento e aquecimento asseguram a vitrificação completa. O padrão médio de blastocistos em cinco repetições foi 25% (entre 21 e 29%), e 70% de blastocistos eclodidos. A viabilidade de ovócitos vitrificados pré-aquecidos foi provada pela transferência de 17 blastocistos (de qualidade excelente a ruim) para 14 receptoras sincronizadas (1 a 2 embriões por animal). Estes embriões foram obtidos de ovócitos vitrificados sendo vitrificados novamente no estágio de blastocistos. Três bezerras machos nasceram a termo, pesando 49, 58 e 60Kg (VAJTA et al., 1998a).

As citocalasinas têm um efeito reversível específico nos elementos do citoesqueleto, tornando-os mais flexíveis e menos susceptíveis aos efeitos dos lipídeos resfriados. Mezzalira et al. (2002) avaliaram a influência de diferentes concentrações de citocalasina B (7,5µg/ml e 45µg/ml) na sobrevivência e desenvolvimento de ovócitos bovinos maduros após a vitrificação em OPS. Independentemente da concentração utilizada, o tratamento com citocalasina B não exerceu efeito benéfico na vitrificação de ovócitos bovinos maduros.

Vieira et al. (2002) avaliaram a capacidade de desenvolvimento de ovócitos bovinos imaturos após a vitrificação com 20% EG + 20% DMSO + 0,5M sacarose, pelo método de OPS. O efeito do tratamento com citocalasina D antes da vitrificação também foi examinado. Não houve diferença na clivagem e produção de blastocistos entre o grupo vitrificado com ou sem citocalasina D (46,4% e 3,6% com e 49,0% e 6,1% sem citocalasina D), mas ambos foram inferiores ($p < 0,05$) ao grupo não vitrificado (controle) (85,1% e 45,9%). A citocalasina provavelmente aumenta a flexibilidade do citoesqueleto. Este efeito relaxante pode preservar a funcionalidade das junções tipo GAP entre o ovócito e as células da granulosa e permitir uma penetração rápida e mais uniforme dos crioprotetores. Esses efeitos podem ser importantes para aumentar a viabilidade após a criopreservação de ovócitos bovinos imaturos.

Quando submetidos à criopreservação, embriões bovinos produzidos *in vitro* são mais sensíveis às injúrias resultantes dos efeitos tóxicos e osmóticos diretos como também da formação de cristais de gelo. Alterações estruturais como menor número médio de células no interior da massa celular interna, formação de mais lipídeos intracelular e permeabilidade da zona pelúcida aumentada são provavelmente apenas alguns motivos que refletem inapropriadas condições de cultura *in vitro*. Fraturas da zona pelúcida na vitrificação é um fenômeno comum quando os embriões são rapidamente resfriados ou aquecidos em palhetas. No método OPS, isso raramente ocorre (LAZAR et al., 2000). Lazar et al. (2000) testaram a vitrificação em OPS para a criopreservação de blastocistos bovinos. Seus resultados mostram que 69,2% re-expandiram e 39,5% eclodiram. Após transferência de 18 embriões, obtiveram o nascimento de três bezerros (16,7%), o que demonstra a eficiência do método.

French et al. (2002) avaliaram a transferência de embriões bovinos clonados, utilizando embriões frescos e vitrificados em OPS. Os resultados não diferiram entre os grupos com relação à taxa de gestação 35-45 dias após a transferência (16,5% e 19,2% para os frescos e vitrificados, respectivamente) e nem com relação ao número de bezerros nascidos (dois bezerros nos dois grupos).

Hurt et al. (2000) vitrificaram ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* pelo método OPS e posteriormente analisaram a viabilidade destes

ovócitos utilizando o HOECHST 33342 e o grau de maturação nuclear utilizando orceína. A porcentagem de ovócitos que sobreviveram ao processo de vitrificação e alcançaram MII não diferiu entre os grupos. A maturação nuclear e citoplasmática obtida foi de 70%. Oberstein et al. (2001) também utilizaram Iodeto de Propídeo (PI) e HOECHST 33342 para avaliação da viabilidade celular.

Uma possibilidade para melhorar as taxas de resfriamento e aquecimento é prevenir a formação de vapor de nitrogênio líquido. Duas soluções para este problema foram publicadas. A primeira possibilidade é de se superesfriar o nitrogênio líquido; na temperatura de -196°C , o nitrogênio líquido está no ponto de ebulição. Qualquer coisa mais quente (como as palhetas), induz a ebulição intensa, e a nuvem de gás formada em torno do objeto diminui consideravelmente a taxa de resfriamento. No entanto, com a aplicação de vácuo sobre o nitrogênio líquido por um curto período de tempo, a temperatura deste pode ser reduzida para -205 a -210°C . Esta temperatura muito abaixo do ponto de ebulição minimiza a formação da nuvem de gás em torno da amostra e, em consequência, aumenta a taxa de resfriamento (ARAV et al., 2000). A segunda alternativa seria colocar os embriões e ovócitos em um prato de metal à -150°C (DINNYÉS et al., 2000). Segundo estes autores, ambos os métodos aumentam em muito a eficiência da vitrificação.

Os protocolos de congelação lenta utilizados para a criopreservação de embriões e ovócitos de diferentes espécies requer um equipamento caro. O uso de técnicas ultra-rápidas como a vitrificação pode ajudar a reduzir uma parte dos custos. A vitrificação não requer nenhum equipamento especial e pode ser facilmente adaptada à rotina (BARIL et al., 2001).

Baseado no rápido, simples, seguro e barato trabalho e os padrões de sobrevivência e desenvolvimento descritos, a técnica OPS é considerada também no presente estágio como um considerável avanço na criobiologia reprodutiva, como um alto potencial de impacto nas futuras pesquisas e aplicação comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos (VAJTA et al., 1997a).

OBJETIVOS

Uma vez que um dos principais desafios para a biotecnologia da reprodução tem sido desenvolver um método eficiente de criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*, várias técnicas têm sido testadas com este objetivo. Esse estudo teve como objetivo geral a comparação do uso de diferentes agentes crioprotetores (etilenoglicol - EG, dimetilsulfóxido - DMSO e dimetilformamida - DF) na vitrificação de ovócitos e embriões bovinos.

O Experimento 1 teve o objetivo de comparar a utilização do EG associado ao DMSO como agentes crioprotetores na exposição ou vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos do período de maturação *in vitro*.

O Experimento 2 teve o objetivo de comparar a utilização do EG associado à DF como agentes crioprotetores na exposição ou vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos do período de maturação *in vitro*.

O Experimento 3 teve o objetivo de comparar a utilização do DMSO associado à DF como agentes crioprotetores na exposição ou vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos do período de maturação *in vitro*.

O Experimento 4 teve o objetivo de comparar a utilização do EG associado ao DMSO como agentes crioprotetores, com adição ou não da Citocalasina B, na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

O Experimento 5 teve o objetivo de comparar a utilização do EG associado à DF como agentes crioprotetores, com adição ou não da Citocalasina B, na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

O Experimento 6 teve o objetivo de comparar a utilização do DMSO associado à DF como agentes crioprotetores, com adição ou não da Citocalasina B, na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

1. OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS

Foram utilizados ovários bovinos provenientes do Frigorífico Frigol, situado no município de Lençóis Paulista – SP, a 50km de distância do laboratório. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução fisiológica aquecida à 37°C, em recipiente térmico. Os ovócitos bovinos foram aspirados de folículos antrais com 2 a 8mm de diâmetro e mantidos no próprio fluido folicular, em tubos cônicos de 15mL aquecidos à 37°C, até o momento da seleção. Para classificação e seleção os ovócitos foram transferidos para placas de Petri contendo fluido folicular bovino previamente centrifugado e filtrado em filtro de 0,22µm e analisados sob microscópio estereoscópio (FIGURA 1A, 1B e 1C). Foram selecionados para o uso somente ovócitos que apresentavam três ou mais camadas compactas de células do cumulus, citoplasma homogêneo e aspecto esférico (FIGURA 1D). Ovócitos com cumulus expandido, desnudos ou com citoplasma muito claro e alterações de formato foram descartados.

Para que todos os experimentos fossem concluídos, foram realizadas 32 viagens ao frigorífico, com a obtenção de 2.031 ovários e 10.296 ovócitos, totalizando uma média de cinco ovócitos utilizados por ovário aspirado.

Os ovócitos selecionados foram distribuídos em seis experimentos.

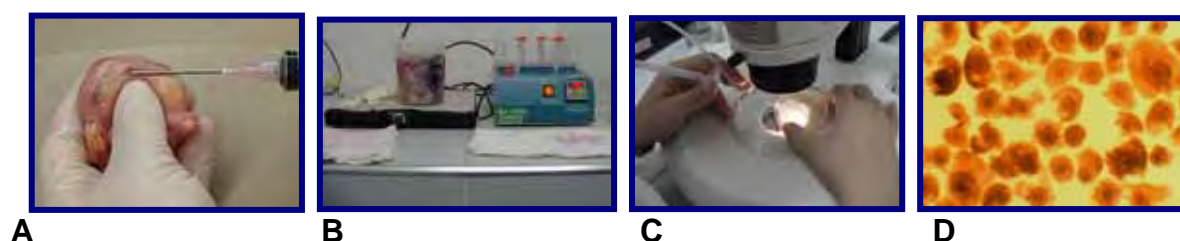


FIGURA 1: Seqüência de imagens da aspiração dos folículos. A) Aspiração folicular B) Manutenção dos ovócitos em fluido folicular aquecido C) Seleção dos ovócitos D) Ovócitos imaturos selecionados

2. DISTRIBUIÇÃO DOS OVÓCITOS ENTRE OS EXPERIMENTOS 1, 2 e 3 E SEUS GRUPOS

Os ovócitos selecionados foram distribuídos para os Experimentos 1, 2 e 3 e também para o grupo controle.

- **GC** (grupo controle; n=295) – composto por ovócitos maturados *in vitro* por 22 horas e submetidos aos processos convencionais de fertilização e cultivo *in vitro*. Tais ovócitos não foram submetidos à exposição ou vitrificação.

Foram realizadas 5 (cinco) repetições de cada grupo. Em cada rotina os ovócitos eram distribuídos entre os três experimentos, sempre em dois momentos, devido ao grande número de grupos a serem trabalhados. Por exemplo, em uma rotina era realizado o Experimento 1, 2 e 3 nos momentos 0 hora e 12 horas; em outra rotina realizado o Experimento 1, 2 e 3 nos momentos 6 horas e 22 horas e assim sucessivamente. E em todas as rotinas havia também um grupo controle.

2.1 EXPERIMENTO 1

Os momentos estudados no Experimento 1 foram: 0 hora (imediatamente após a colheita, imaturos), 6 horas de maturação, 12 horas de maturação e 22 horas de maturação (maturados). Nestes momentos os ovócitos foram distribuídos em grupos e somente submetidos à exposição às soluções de vitrificação ou vitrificados.

O delineamento experimental dos Experimentos 1, 2 e 3 está demonstrado na FIGURA 2.

2.1.1 Grupos do Experimento 1

Os ovócitos selecionados (n = 1.113) foram distribuídos em oito grupos, de acordo com o Quadro 1.

QUADRO 1: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 1.

	0 hora (n)	6 horas (n)	12 horas (n)	22 horas (n)
Vitrificados	1G0h (121)	1G6h (137)	1G12h (137)	1G22h (138)
Expostos	1G0hexp (148)	1G6hexp (139)	1G12hexp (149)	1G22hexp (144)

- **1G0h** (vitrificados imaturos a 0 hora; n=121) – composto por ovócitos que foram vitrificados imediatamente após a colheita. Foram aquecidos e após o período de equilíbrio transferidos para a placa de maturação e submetidos aos processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G0hexp** (expostos a 0 hora; n=148) – composto por ovócitos que foram somente expostos aos crioprotetores imediatamente após a colheita e a seguir foram transferidos para a placa de aquecimento e após o período de equilíbrio transferidos para a placa de maturação e submetidos aos processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G6h** (vitrificados às 6 horas de MIV; n=137) – composto por ovócitos que foram vitrificados após o período de 6 horas de maturação *in vitro*. Foram aquecidos e após o período de equilíbrio transferidos para a placa de maturação por mais 16 horas e foram submetidos aos processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G6hexp** (expostos às 6 horas de MIV; n=139) – composto por ovócitos que foram somente expostos aos crioprotetores após o período de 6 horas de maturação *in vitro*. Após a exposição os ovócitos foram transferidos para a placa de aquecimento e após o período de equilíbrio foram novamente transferidos para a placa de maturação, onde continuaram a MIV por mais 16 horas e foram submetidos aos processos de fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G12h** (vitrificados às 12 horas de MIV; n=137) – composto por ovócitos que foram vitrificados após o período de 12 horas de maturação *in vitro*. Após o aquecimento e período de equilíbrio os ovócitos foram transferidos novamente para a placa de maturação, onde continuaram a MIV por mais 10 horas e foram submetidos aos processos de fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G12hexp** (expostos às 12 horas de MIV; n=149) – composto por ovócitos que foram somente expostos aos crioprotetores após o período de 12 horas de maturação *in vitro*. Após a exposição os ovócitos foram transferidos para a placa de aquecimento e após o período de equilíbrio foram novamente transferidos para a placa de maturação, onde continuaram a MIV por mais 10 horas e foram submetidos aos processos de fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G22h** (vitrificados às 22 horas de MIV; n=138) – composto por ovócitos que foram vitrificados após o período de 22 horas de maturação *in vitro*. Após o aquecimento e período de equilíbrio os ovócitos foram submetidos aos processos de fertilização e cultivo *in vitro*.

- **1G22hexp** (expostos às 22 horas de MIV; n=144) – composto por ovócitos que foram somente expostos aos crioprotetores após o período de 20 horas de maturação *in vitro*. Após a exposição os ovócitos foram transferidos para a placa de aquecimento e após o período de equilíbrio foram submetidos aos processos de fertilização e cultivo *in vitro*.

2.1.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 1

Os ovócitos foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% EG % + 10% DMSO dissolvidos em HM por 30-45 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por 20% EG + 20% DMSO + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 25 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl EG + 100µl DMSO (30-45 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl EG + 200µl DMSO (25 segundos)

A solução de re-hidratação foi composta por meio de manutenção (HM) + 0,25M sacarose (Anexo C), onde os ovócitos permaneceram por 5 minutos e HM + 0,15M sacarose (Anexo D), por mais 5 minutos.

Placa com as soluções de re-hidratação:

- Poço 1: 800µl HM + 400µl SM
- Poço 2: 800µl HM + 400µl SM (5 minutos)
- Poço 3: 800µl HM + 200µl SM (5 minutos)
- Poço 4: 800µl HM

2.2 EXPERIMENTO 2

No Experimento 2 os ovócitos foram expostos ou vitrificados à 0 hora, 6 horas, 12 horas e 22 horas de maturação *in vitro*, como no Experimento 1.

2.2.1 Grupos do Experimento 2

Os ovócitos selecionados (n = 1.126) foram distribuídos em oito grupos, de acordo com o Quadro 2.

QUADRO 2: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 2.

	0 hora (n)	6 horas (n)	12 horas (n)	22 horas (n)
Vitrificados	2G0h (138)	2G6h (149)	2G12h (136)	2G22h (130)
Expostos	2G0hexp (141)	2G6hexp (137)	2G12hexp (148)	2G22hexp (147)

- **2G0h** (vitrificados imaturos à 0 hora; n=138)
- **2G0hexp** (expostos à 0 hora; n=141)
- **2G6h** (vitrificados às 6 horas de MIV; n=149)
- **2G6hexp** (expostos às 6 horas de MIV; n=137)
- **2G12h** (vitrificados às 12horas de MIV; n=136)
- **2G12hexp** (expostos às 12 horas de MIV; n=148)
- **2G22h** (vitrificados às 22 horas de MIV; n=130)
- **2G22hexp** (expostos às 22 horas de MIV; n=147)

2.2.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 2

Os ovócitos foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% EG % + 10% DF dissolvidos em HM por 30-45 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por 20% EG + 20% DF + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 25 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl EG + 100µl DF (30-45 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl EG + 200µl DF (25 segundos)

A solução de re-hidratação foi a mesma utilizada no Experimento 1 (Anexo C).

2.3 EXPERIMENTO 3

No Experimento 3 os ovócitos foram expostos ou vitrificados à 0 hora, 6 horas, 12 horas e 22 horas de maturação *in vitro*, como nos Experimentos 1 e 2.

2.3.1 Grupos do Experimento 3

Os ovócitos selecionados (n = 1.118) foram distribuídos em oito grupos, de acordo com o Quadro 3.

QUADRO 3: Distribuição dos ovócitos entre os grupos do Experimento 3.

	0 hora (n)	6 horas (n)	12 horas (n)	22 horas (n)
Vitrificados	3G0h (138)	3G6h (142)	3G12h (127)	3G22h (130)
Expostos	3G0hexp (149)	3G6hexp (137)	3G12hexp (148)	3G22hexp (147)

- **3G0h** (vitrificados imaturos à 0 hora; n=138)
- **3G0hexp** (expostos à 0 hora; n=149)
- **3G6h** (vitrificados às 6 horas de MIV; n=142)
- **3G6hexp** (expostos às 6 horas de MIV; n=137)
- **3G12h** (vitrificados às 12 horas de MIV; n=127)
- **3G12hexp** (expostos às 12 horas de MIV; n=148)
- **3G22h** (vitrificados às 22 horas de MIV; n=130)
- **3G22hexp** (expostos às 22 horas de MIV; n=147)

2.3.2 Soluções de exposição e/ou vitrificação e aquecimento do Experimento 3

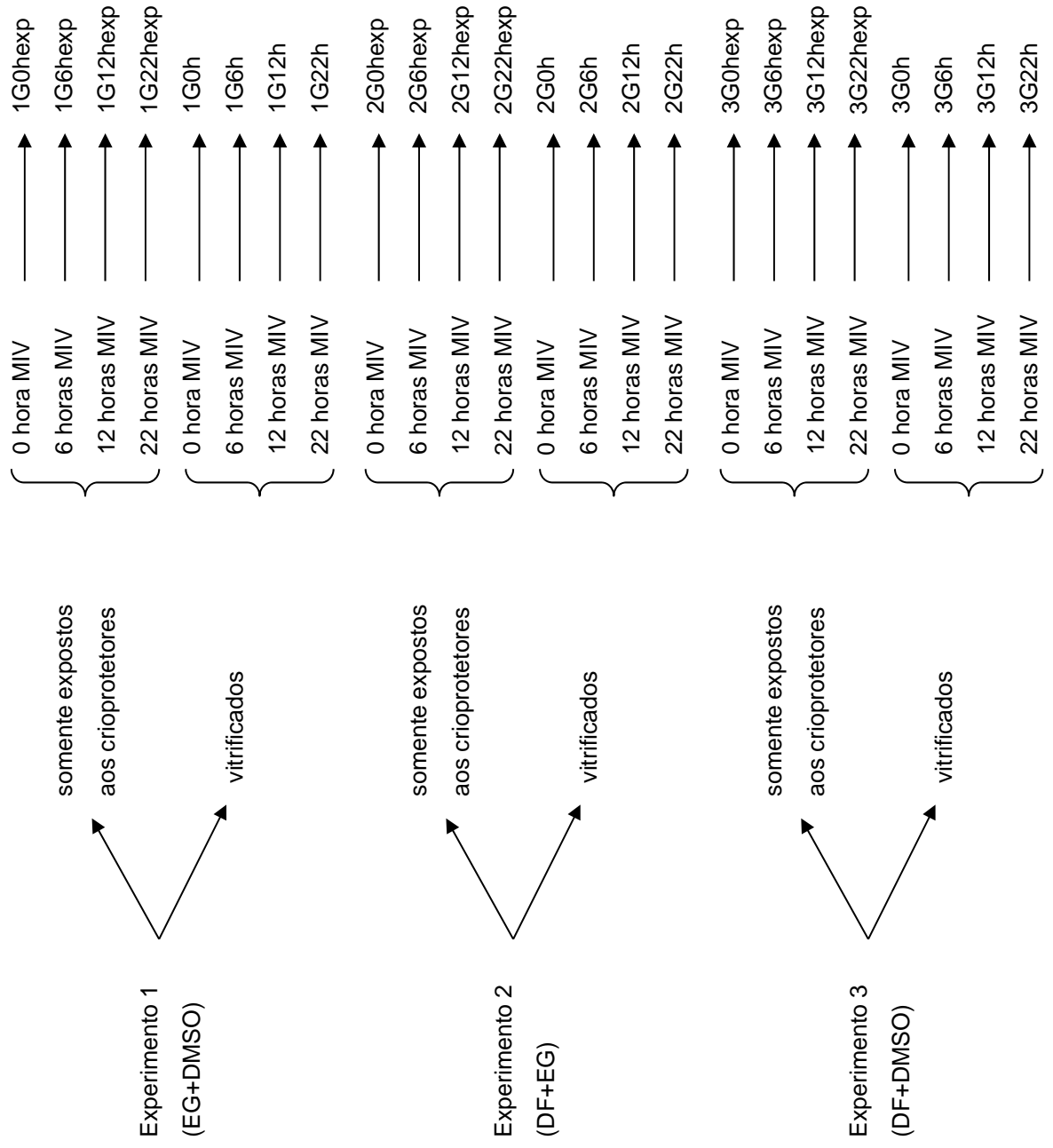
Os ovócitos foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% EG % + 10% DF dissolvidos em HM por 30-45 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por 20% DMSO + 20% DF + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 25 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl DMSO + 100µl DF (30-45 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl DMSO + 200µl DF (25 segundos)

A solução de re-hidratação foi a mesma utilizada no Experimento 1 (Anexo C).

FIGURA 2: Delineamento dos Experimentos 1, 2 e 3 (utilizando-se ovócitos)



3. DISTRIBUIÇÃO DOS EMBRIÕES ENTRE OS EXPERIMENTOS 4, 5 e 6 E SEUS GRUPOS

Os embriões produzidos *in vitro* foram selecionados no D7 de cultivo, em estágio de blastocisto ou blastocisto expandido, e distribuídos para os Experimentos 4, 5 e 6 e também para o grupo controle.

Foram realizadas 5 (cinco) repetições de cada grupo.

Para execução dos experimentos 4, 5 e 6 foram utilizados 666 embriões, dos quais 494 foram vitrificados utilizando-se a OPS e 172 foram utilizados como controle.

O delineamento experimental dos Experimentos 4, 5 e 6 está demonstrado na FIGURA 3.

Os embriões controle, que não foram submetidos à vitrificação, foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o Quadro 4.

QUADRO 4: Distribuição dos embriões entre os grupos controle (não vitrificados).

Sem Citocalasina B (n)	Com Citocalasina B (n)
GC s/citB (94)	GC c/citB (78)

- **GC s/CitB** (n=94) – os embriões continuaram no cultivo até o D9 para avaliação das taxas de re-expansão/eclosão. Sendo que 70 embriões permaneceram em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão/eclosão no D9 e 24 embriões foram analisados pelo teste de viabilidade celular.

- **GC c/CitB** (n=78) – os embriões permaneceram por 15 a 20 minutos em uma solução com 7,5µg/ml de citocalasina B. Após, foram colocados novamente no cultivo até o D9. Sendo que 57 embriões permaneceram em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão/eclosão no D9 e 21 embriões foram analisados pelo teste de viabilidade celular.

3.1 EXPERIMENTO 4

3.1.1 Grupos do Experimento 4

Foram utilizados 166 embriões, distribuídos em dois grupos, de acordo com o Quadro 5.

QUADRO 5: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 4.

Sem Citocalasina B (n)	Com Citocalasina B (n)
4G s/citB (84)	4G c/citB (82)

- **4G s/cit B** (embriões vitrificados sem citocalasina B; n=84)– composto por embriões que foram vitrificados na mesma solução de vitrificação utilizada no Experimento 1. Sendo que 61 embriões foram aquecidos e colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão no D9 e 23 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

- **4G c/citB** (embriões vitrificados com citocalasina B; n=82) – composto por embriões que permaneceram por 15 a 20 minutos em uma solução com 7,5µg/ml de citocalasina B, sendo então vitrificados na solução de vitrificação utilizada no Experimento 1. Sendo que 57 embriões foram aquecidos e colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão o D9 e 25 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

3.1.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 4

Os embriões foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% EG % + 10% DMSO dissolvidos em HM por 60 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por

20% EG + 20% DMSO + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 20 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl EG + 100µl DMSO (60 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl EG + 200µl DMSO (20 segundos)

A solução de aquecimento foi composta por meio de manutenção (HM) + 0,25M sacarose (Anexo C), onde os ovócitos permaneceram por 5 minutos e HM + 0,15M sacarose, por mais 5 minutos.

3.2 EXPERIMENTO 5

3.2.1 Grupos do Experimento 5

Foram utilizados 168 embriões, distribuídos em dois grupos, de acordo com o Quadro 6.

QUADRO 6: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 5.

Sem Citocalasina B (n)	Com Citocalasina B (n)
5G s/citB (83)	5G c/citB (85)

- **5G s/cit B** (embriões vitrificados sem citocalasina B; n=83) – composto por embriões que foram vitrificados na mesma solução de vitrificação utilizada no Experimento 2. Sendo que 57 embriões foram aquecidos e colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão no D9 e 26 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

- **5G c/citB** (embriões vitrificados com citocalasina B; n=85) – composto por embriões que permaneceram por 15 a 20 minutos em uma solução com 7,5µg/ml de citocalasina B, sendo então vitrificados na solução de vitrificação utilizada no Experimento 2. Sendo que 61 embriões foram aquecidos e

colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão no D9 e 24 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

3.2.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 5

Os embriões foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% EG % + 10% DF dissolvidos em HM por 60 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por 20% EG + 20% DF + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 20 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl EG + 100µl DF (60 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl EG + 200µl DF (20 segundos)

A solução de aquecimento foi composta por meio de manutenção (HM) + 0,25M sacarose (Anexo C), onde os ovócitos permaneceram por 5 minutos e HM + 0,15M sacarose, por mais 5 minutos.

3.3 EXPERIMENTO 6

3.3.1 Grupos do Experimento 6

Foram utilizados 160 embriões, distribuídos em dois grupos, de acordo com o Quadro 7.

QUADRO 7: Distribuição dos embriões entre os grupos do Experimento 6.

Sem Citocalasina B (n)	Com Citocalasina B (n)
6G s/citB (77)	6G c/citB (83)

- **6G s/cit B** (embriões vitrificados sem citocalasina B; n=77) – composto por embriões que foram vitrificados na mesma solução de vitrificação utilizada no Experimento 3. Sendo que 54 embriões foram aquecidos e colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão no D9 e 23 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

- **6G c/citB** (embriões vitrificados com citocalasina B; n=83) – composto por embriões que permaneceram por 15 a 20 minutos em uma solução com 7,5µg/ml de citocalasina B, sendo então vitrificados na solução de vitrificação utilizada no Experimento 3. Sendo que 64 embriões foram aquecidos e colocados novamente em cultivo para ser avaliada a taxa de re-expansão no D9 e 19 embriões foram mantidos vitrificados para posteriormente serem aquecidos e serem analisados pelo teste de viabilidade celular.

3.3.2 Soluções de vitrificação e aquecimento do Experimento 6

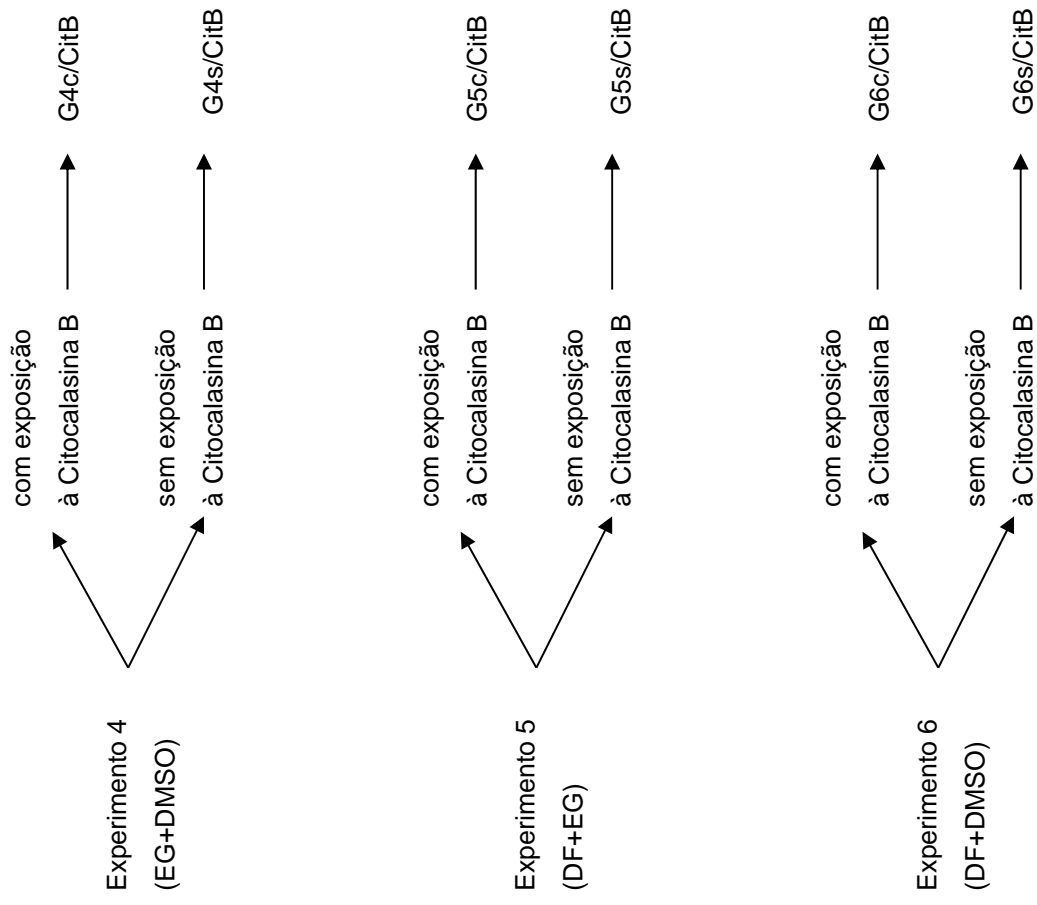
Os embriões foram equilibrados por 5 minutos no meio de manutenção HM (Anexo A) e incubados à 39°C em 10% DMSO % + 10% DF dissolvidos em HM por 60 segundos, sendo então transferidos para uma solução composta por 20% DMSO + 20% DF + 0,5M sacarose (SM – Anexo B) dissolvidos em HM por 20 segundos e imediatamente envasados.

Placa com soluções de crioprotetores:

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl DF + 100µl DMSO (60 segundos)
- Poço 4: 600µl SM + 200µl DF + 200µl DMSO (20 segundos)

A solução de aquecimento foi composta por meio de manutenção (HM) + 0,25M sacarose (Anexo C), onde os ovócitos permaneceram por 5 minutos e HM + 0,15M sacarose, por mais 5 minutos.

FIGURA 3: Delineamento dos Experimentos 4, 5 e 6 (utilizando-se embriões).



4. ENVASE E AQUECIMENTO DOS OVÓCITOS DOS EXPERIMENTOS 1, 2 e 3

4.1 Envase dos ovócitos para vitrificação

O envase dos ovócitos a serem vitrificados foi realizado em OPS. As OPS foram adquiridas prontas para o uso. Após a utilização as palhetas foram mantidas em álcool 70% durante 24 horas e centrifugadas para saída do excedente de líquido, sendo então armazenadas em container plástico limpo e tampado, estando preparadas para serem re-utilizadas. As palhetas somente foram descartadas quando foram observadas alterações como rachaduras.

Aproximadamente 2µl de meio de vitrificação contendo 1 a 3 ovócitos foram aspirados por capilaridade para o interior da parte esticada da palheta. A palheta aberta foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido (FIGURA 4).

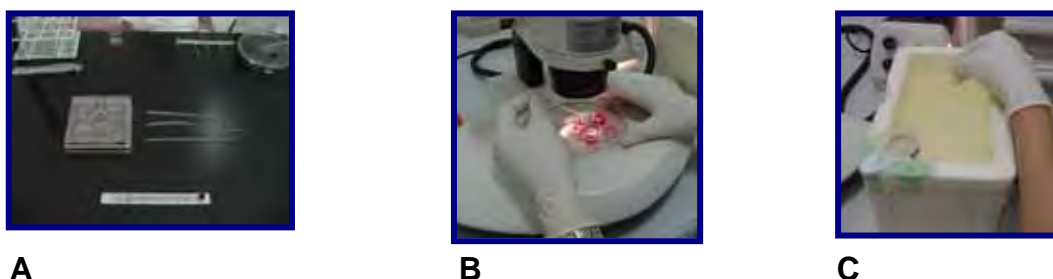


FIGURA 4: Seqüência de imagens da vitrificação em OPS. A) Placa com solução de vitrificação e palhetas OPS B) Envase dos ovócitos C) Imersão da OPS em nitrogênio líquido

4.2 Aquecimento dos ovócitos vitrificados

Imediatamente após a retirada do nitrogênio líquido as palhetas esticadas tinham sua extremidade mais fina submergida em solução de aquecimento à 37°C. Quando o meio de vitrificação começava a descongelar a extremidade mais larga da palheta era fechada com auxílio do dedo indicador e

os ovócitos eram expelidos para o meio contendo sacarose à 0,25M, sendo transferidos imediatamente para outro poço com a mesma solução de sacarose na qual permaneciam durante cinco minutos. Em alguns casos o conteúdo da OPS não foi expelido do interior da palheta, sendo necessária a utilização de uma pipetagem suave na extremidade de maior diâmetro da palheta, empurrando o conteúdo através da extremidade mais fina. Os ovócitos foram então transferidos para uma solução de sacarose menos concentrada (0,15M) por mais cinco minutos. Após o equilíbrio os ovócitos eram lavados em H-TCM 199 + 10% SFB (HM).

Os ovócitos pertencentes aos grupos G0h, G6h e G12h eram destinados à maturação *in vitro* de acordo com metodologia descrita posteriormente.

Após o período de maturação parte destes ovócitos, bem como daqueles do grupo GC e os aquecidos do grupo G22h foram corados para avaliação do estágio de maturação nuclear e da distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias e outra parte foi destinada à fertilização e cultivo *in vitro*.

5. MATURAÇÃO *in vitro*

Os ovócitos dos grupos GC, G6h, G6hexp, G12h, G12hexp, G22h e G22hexp foram submetidos ao processo de MIV imediatamente após a colheita. Conforme elucidado anteriormente, os ovócitos de cada grupo (com exceção do grupo GC) foram retirados da MIV, expostos ou vitrificados e aquecidos, retornando para a MIV, nos períodos já descritos. Os ovócitos do grupo G0h foram vitrificados, imediatamente aquecidos e submetidos à MIV por 22-24 horas. Os ovócitos do grupo G0hexp foram somente expostos aos crioprotetores antes de serem submetidos à MIV também por 22-24 horas.

Para a maturação *in vitro* os ovócitos de todos os grupos e experimentos foram cultivados em placas com quatro poços (Nunc[®], Dinamarca). Cada poço foi preenchido com 400µl de meio de maturação e neste foram colocados 20 a 25 ovócitos. Os ovócitos foram lavados por, no mínimo, três vezes no meio de maturação antes serem transferidos para os poços da placa (FIGURA 5).

Os ovócitos foram cultivados em meio de maturação composto por TCM 199 com sal de Earle e L-glutamina suplementado com 10% SFB, 2,2 mg/ml piruvato de sódio, 1mg/ml estradiol 17 β (E₂ – Sigma, EUA, # E 2758), 50 μ g/ml hCG (Profasi[®], Serono, Brasil, 5.000UI), 5 μ g/ml FSH (Foltropin-V[®], Vetrepharm, Canadá), e 75 μ g/ml gentamicina (Anexo E).

Os ovócitos de todos os grupos foram maturados por um período total de 22-24 horas a uma temperatura de 38,5°C em estufa com 5% de CO₂ em ar.



FIGURA 5: Seqüência de imagens da maturação *in vitro*. A) Placa de MIV B) Ovócito imaturo imediatamente após a colheita C) Ovócito após 22 horas de MIV

6. FERTILIZAÇÃO *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* uma palheta de sêmen bovino de um único touro, sendo todas as palhetas de uma única partida. As palhetas foram descongeladas em banho Maria à 39°C durante 20 segundos. O método de seleção espermática utilizado foi o procedimento de “swim-up”.

O conteúdo da palheta foi transferido para um eppendorf. Em três tubos de 15ml foram depositados 1ml de meio HTF + BSA + cafeína + gentamicina (Anexo F) e 100 μ l do sêmen. Os tubos foram incubados por 60 minutos em estufa a 38,5°C com 5% CO₂ em ar. Após o período de incubação ocorreu a migração dos espermatozóides viáveis para o topo da coluna de fluido. A seguir 800 μ l do sobrenadante de cada tubo era colocado em um só tubo e centrifugado por 10 minutos a 1.200rpm. O pellet formado era utilizado para a FIV após o ajuste da concentração para 1x10⁶ espermatozóides/ml.

Os ovócitos de todos os grupos foram lavados três vezes em meio de fertilização antes de serem transferidos para gotas de 90µl de meio FIV (Anexo G) cobertas com óleo mineral, em placas de Petri, incubadas previamente por, no mínimo, uma hora em estufa com 5% de CO₂ em ar. Em cada gota contendo 10 ovócitos foi adicionado 10µl da suspensão espermática.

As placas de fertilização foram incubadas a 38,5°C em estufa com 5% de CO₂ em ar por 18 horas, após as quais os possíveis zigotos foram transferidos para as gotas de cultivo.

D0 (Dia Zero) foi denominado o dia da realização da FIV.

7. CULTIVO *in vitro*

7.1 Preparação das placas de co-cultivo

As placas utilizadas para o cultivo dos embriões foram as mesmas utilizadas na maturação *in vitro*. Após a transferência dos ovócitos das placas de MIV para as placas de FIV, o conteúdo de cada poço foi retirado e este preenchido com meio de cultivo; a seguir o conteúdo foi novamente retirado e finalmente 400µl de meio de cultivo foi depositado em cada poço e coberto com 300µl de óleo mineral.

O meio de cultivo utilizado foi composto por Human Tubal Fluid (HTF[®], Irvine) e Basal Medium Eagle (BME[®]): HTF:BME (1:1) acrescido de 6% BSA (Sigma, EUA) e 75µg/ml gentamicina, sendo acrescido de 10% SFB (Anexo H) no D3.

Desta forma as células da granulosa aderidas ao fundo da placa de MIV permaneceram na placa de CIV.

A preparação das placas foi realizada imediatamente após a retirada dos ovócitos da maturação *in vitro*, sendo incubadas por aproximadamente 12 horas em estufa com 5% de CO₂ em ar, até o momento em que os embriões foram finalmente transferidos para as placas de cultivo.

7.2 Cultivo *in vitro* dos embriões

Decorridas as 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados com o movimento suave de uma pipeta.

Grupos de aproximadamente 25 zigotos foram lavados três vezes em meio de cultivo, para retirada das células da granulosa (desnudamento), bem como de espermatozoides mortos. Os zigotos envoltos ainda por algumas camadas de células da granulosa foram então transferidos para os poços das placas sendo cultivados por 7 dias a uma temperatura de 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Foi avaliado o índice de clivagem após 72 horas da fertilização (D3), momento no qual foi também adicionado o SFB, e o índice de produção de blastocisto no D7 de cultivo.

8. AVALIAÇÃO DA MATURIDADE NUCLEAR DOS OVÓCITOS

Foram utilizados 116 ovócitos controle com o objetivo de se avaliar o estágio de maturação nuclear no momento da realização do procedimento de exposição aos crioprotetores e/ou vitrificação nos seguintes momentos:

0h (n=29)

6h (n=32)

12h (n=25)

22h (n=30)

As células da granulosa foram retiradas em meio H-TCM199 acrescido de 10% SFB e 300UI/ml de hialuronidase (tipo V) (Hyaluronidase – H6254, Sigma, St Louis, EUA) com auxílio de uma pipeta de vidro de ponta fina. Os ovócitos desnudos foram incubados em DPBS acrescido de 1% BSA e posteriormente transferidos para gotas colocadas sobre lâmina histológica contendo uma solução de 90% de glicerol em DPBS com 100µg/ml Hoechst 33342. A preparação foi coberta com lamínula e incubada por 5 minutos. Os

ovócitos corados foram examinados em microscópio invertido equipado com luz fluorescente (filtro ultra-violeta, 350 e 461nm) (FIGURA 6).

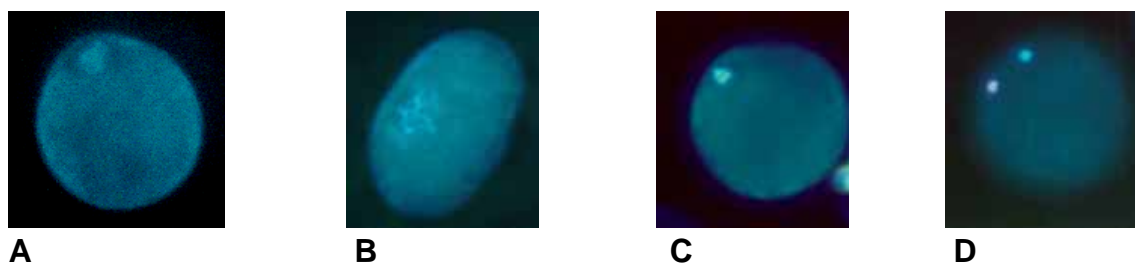


FIGURA 6: Avaliação do estágio de maturação ovocitária. A) GV B) GVBD C) Metáfase I D) Metáfase II

Da mesma forma, foram analisados os estágios de maturação nuclear dos grupos de ovócitos vitrificados à 0 hora nos Experimentos 1, 2 e 3, após o aquecimento e período de MIV de 22 horas.

1G0h (n=40)

2G0h (n=24)

3G0h (n=29)

O estágio de maturação nuclear dos ovócitos pertencentes aos grupos submetidos à vitrificação às 22 horas de MIV também foi analisado pela mesma metodologia descrita acima.

1G22h (n=53)

2G22h (n=54)

3G22h (n=46)

9. AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS E MITOCÔNDRIAS DOS OVÓCITOS

O número de ovócitos utilizados e sua distribuição entre os momentos analisados com relação à distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias estão demonstrados nos Quadros 8 e 9, respectivamente.

Quadro 8. Número e distribuição dos ovócitos destinados a coloração para análise da distribuição das mitocôndrias.

	0 hora	6 horas	12 horas	22 horas
Controle	41	41	40	38
1G0h	31	-	-	-
1G0h + MIV	-	-	-	29
1G22h	-	-	-	42
2G0h	29	-	-	-
2G0h + MIV	-	-	-	31
2G22h	-	-	-	39
3G0h	28	-	-	-
3G0h + MIV	-	-	-	32
3G22h	-	-	-	39

Quadro 9. Número e distribuição dos ovócitos destinados a coloração para análise da distribuição dos grânulos corticais.

	0 hora	6 horas	12 horas	22 horas
Controle	38	39	42	41
1G0h	29	-	-	-
1G0h + MIV	-	-	-	31
1G22h	-	-	-	40
2G0h	32	-	-	-
2G0h + MIV	-	-	-	28
2G22h	-	-	-	41
3G0h	33	-	-	-
3G0h + MIV	-	-	-	27
3G22H	-	-	-	39

As células da granulosa dos ovócitos foram retiradas em meio H-TCM199 acrescido de 10% SFB e 300UI/ml de hialuronidase (tipo V) (Hyaluronidase – H6254, Sigma, St Louis, EUA) com auxílio de uma pipeta de vidro de ponta fina. Os ovócitos desnudos foram incubados em DPBS acrescido de 1% BSA e posteriormente transferidos para gotas de solução de DPBS acrescido de 0,5% de protease (Pronase – P5147 Sigma, St Louis, EUA) para remoção da zona pelúcida. Após um período de 2 a 5 minutos na solução de protease, os ovócitos, já desprovidos de zona pelúcida, foram incubados em solução de paraformaldeído a 3% por um período de no mínimo 2 horas, após as quais foram transferidos para solução de bloqueio (Anexo I) durante mais 15 minutos. Após os ovócitos foram permeabilizados em solução de 0,1% de Triton-X100 em DPBS durante 5 minutos. Neste ponto, os ovócitos foram distribuídos em dois grupos: metade foi corada com rodamina 123 para observação do padrão de distribuição das mitocôndrias e metade foi corada com FITC conjugada à lecitina PNA para avaliação da distribuição dos grânulos corticais. Para coloração com rodamina os ovócitos foram incubados em gotas contendo 1mg/ml de Rodamina 123 em DPBS, durante 30 minutos e montados entre lâmina e lamínula. Para a coloração com FITC-PNA, os ovócitos foram incubados em gotas contendo 0,1mg/ml do corante durante 15 minutos. As preparações foram examinadas em microscópio invertido equipado com luz fluorescente (filtro azul, excitação - 450 a 490nm). Como tanto as mitocôndrias como os grânulos corticais se coram em verde as análises foram realizadas em dois grupos distintos de ovócitos.

10. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE EMBRIONÁRIA DOS EXPERIMENTOS 4, 5 e 6

Os embriões produzidos e selecionados para serem utilizados nos Experimentos 4, 5 e 6 foram distribuídos conforme demonstra o Quadro 10.

Quadro 10: Distribuição dos embriões entre todos os grupos dos Experimentos 4, 5 e 6, com o número total de embriões que foram vitrificados, aquecidos e recolocados em cultivo para avaliação das taxas de re-expansão e aquecidos para avaliação da viabilidade celular.

Embriões	Vitrificados (n)	Retorno ao cultivo (n)	Avaliação viabilidade celular (n)
GC s/citB	-	70	24
GC c/citB	-	57	21
G4 s/citB	84	61	23
G4 c/citB	82	57	25
G5 s/citB	83	57	26
G5 c/citB	85	61	24
G6 s/citB	77	54	23
G6 c/citB	83	64	19

Os embriões foram incubados em DPBS acrescido de 1% BSA e 125µg/ml de Iodeto de Propídeo e posteriormente foram transferidos para gotas colocadas sobre lâmina histológica contendo uma solução de 90% de glicerol em DPBS com 100µg/ml de Hoechst 33342. A preparação foi coberta com lamínula e incubada durante cinco minutos.

Os embriões corados foram examinados em microscópio invertido equipado com luz fluorescente para a determinação de células vivas e mortas. As células que apresentaram coloração vermelha intensa foram consideradas inviáveis.

11. AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE RE-EXPANSÃO APÓS O AQUECIMENTO DOS EMBRIÕES DOS EXPERIMENTOS 4, 5 e 6

As taxas de re-expansão dos embriões do grupo controle e dos grupos de embriões vitrificados e aquecidos foram avaliadas no D9 de cultivo.

Os embriões do grupo GC s/CitB permaneceram na placa de cultivo até o D9, sem serem submetidos a qualquer tratamento. Os embriões do grupo GC

c/CitB foram retirados da placa de cultivo no D7, expostos à citocalasina B e imediatamente transferidos à placa de cultivo, permanecendo nesta até o D9.

Os embriões dos Experimentos 4, 5 e 6 foram retirados da placa de cultivo, vitrificados, cada um conforme o protocolo de seu grupo, imediatamente aquecidos e novamente transferidos para as placas de cultivo, onde também permaneceram até o D9.

Foi avaliado o desenvolvimento embrionário observando-se os embriões que foram capazes de continuar a se expandir.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos percentuais de viabilidade ovocitária e embrionária e percentuais segundo estágio de maturação nuclear e grupo de ovócitos foi utilizado o Teste de Goodmann. Para a comparação das taxas de clivagem e produção de blastocistos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis. Para a análise estatística das taxas de re-expansão e taxas de viabilidade dos embriões dos Experimentos 4, 5 e 6 foi utilizado o Teste de Tukey para comparações múltiplas (CURI e MORAES, 1981; FISHER e BELLE, 1993).

Foi considerado o nível de significância $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. EXPERIMENTOS 1, 2 e 3

1.1 Avaliação da maturidade nuclear dos ovócitos

Através da análise da morfologia nuclear dos ovócitos do grupo controle nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas foram obtidos os resultados descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Estágio de maturação nuclear de ovócitos controle, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas de maturação *in vitro*.

GC	0 hora (n=29)	6 horas (n=32)	12 horas (n=25)	22 horas (n=30)
GV	44,8% (13)	0% (0)	0% (0)	0% (0)
GVBD	41,4% (12)	15,6% (05)	0% (0)	10% (03)
MI	10,3% (03)	84,4% (27)	92,0% (23)	26,7% (08)
MII	0% (0)	0% (0)	0% (0)	63,3% (19)
Degenerados	3,5% (01)	0% (0)	8,0% (02)	0% (0)

Os resultados obtidos através da análise da morfologia nuclear dos ovócitos pertencentes aos grupos 1G0h (EG+DMSO), 2G0h (DF+EG) e 3G0h (DF+DMSO), após aquecimento e maturação por 22 horas estão demonstrados na Tabela 2 e dos ovócitos pertencentes aos grupos 1G22h (EG+DMSO), 2G22h (DF+EG) e 3G22h (DF+DMSO) na Tabela 3.

Tabela 2 - Estágio de maturação nuclear de ovócitos pertencentes aos grupos 1G0h, 2G0h e 3G0h, após aquecimento e período de maturação *in vitro* de 22 horas.

GC	1G0h (n=40)	2G0h (n=24)	3G0h (n=29)
GV	20% (08)	25,0% (06)	6,9% (02)
GVBD	12,5% (05)	12,5% (03)	6,9% (02)
MI	45,0% (18)	8,3% (02)	0% (0)
MII	5,0% (02)	0% (0)	0% (0)
Degenerados	17,5% (07)	54,2% (13)	86,2% (25)

Tabela 3 - Estágio de maturação nuclear de ovócitos pertencentes aos grupos 1G22h, 2G22h e 3G22h, após aquecimento.

GC	1G22h (n=53)	2G22h (n=54)	3G22h (n=46)
GV	0% (0)	0% (0)	0% (0)
GVBD	0% (0)	0% (0)	0% (0)
MI	16,9% (09)	20,4% (11)	21,7% (10)
MII	77,4% (41)	72,2% (39)	73,9% (34)
Degenerados	5,7% (03)	7,4% (04)	4,4% (02)

1.2 Avaliação da distribuição dos grânulos corticais e mitocôndrias dos ovócitos

A análise da distribuição das mitocôndrias nos ovócitos do grupo controle, através da coloração com rodamina 123, mostrou que nos ovócitos imaturos, assim como nos ovócitos maturados *in vitro* durante 6 e 12 horas, estas se apresentavam com distribuição homogênea por todo o citoplasma (FIGURA 7A). Por outro lado, nos ovócitos maturados *in vitro* por 22 horas, observou-se uma maior concentração destas organelas na região central do ovócito (FIGURA 7B).

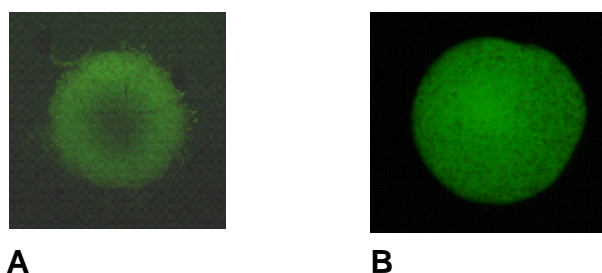


FIGURA 7: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos controle, não submetidos à vitrificação. A) Ovócitos imaturos B) Ovócitos após 22 horas de MIV

Nos ovócitos submetidos à vitrificação logo após a colheita (imaturos), observou-se, após o aquecimento, uma distribuição heterogênea das mitocôndrias, as quais apareceram em grumos, com áreas do citoplasma desprovidas da presença destas organelas (FIGURA 8). Não observou-se

modificação no padrão de distribuição das mitocôndrias quando estes ovócitos foram submetidos a 22 horas de maturação *in vitro*. Da mesma forma não foram observadas diferenças quando utilizou-se a associação de EG+DMSO (1G0h), EG+DF (2G0h) ou DMSO+DF (3G0h).

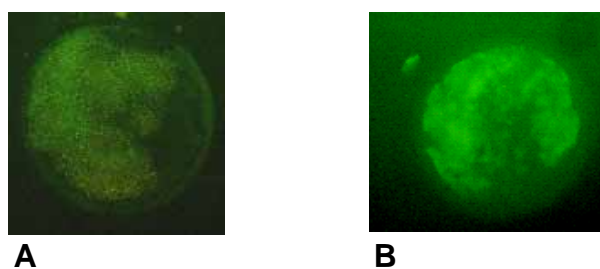


FIGURA 8: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos imaturos submetidos à vitrificação. A) Ovócitos logo após o aquecimento B) Ovócitos aquecidos e submetidos à 22 horas de MIV

Nos ovócitos submetidos a vitrificação após 22 horas de maturação *in vitro* foi observada uma distribuição heterogênea das mitocôndrias, porém não tão acentuada quanto aquela vista nos ovócitos imaturos. Ainda pode ser observado a formação de grumos, mas estes apareceram em menor quantidade e somente em algumas áreas do citoplasma (FIGURA 9). Novamente não foram observadas diferenças entre os grupos.

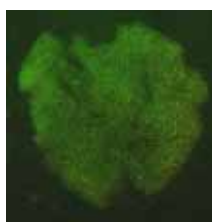


FIGURA 9: Distribuição das mitocôndrias em ovócitos submetidos à vitrificação após 22 horas de MIV

Com relação à análise da distribuição dos grânulos corticais dos ovócitos do grupo controle, estes se apresentaram distribuídos por todo o citoplasma nos ovócitos imaturos, bem como naqueles que sofreram maturação *in vitro* por

6 ou 12 horas (FIGURA 10A). Nos ovócitos maturados *in vitro* por 22 horas ocorreu migração adequada dos grânulos corticais para a periferia dos ovócitos (FIGURA 10B) em 65,8% dos ovócitos examinados (27/41).

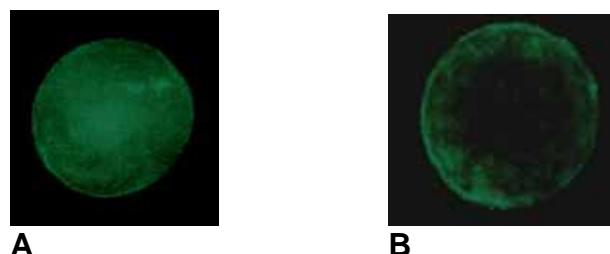


FIGURA 10: Distribuição dos grânulos corticais em ovócitos não submetidos à vitrificação. A) Ovócitos imaturos B) Ovócitos após 22 horas de MIV.

Nos ovócitos vitrificados imaturos (1G0h, 2G0h e 3G0h) observou-se uma diminuição na marcação destas estruturas. Além disso, quando estes ovócitos foram submetidos ao processo de maturação *in vitro*, não observou-se migração dos grânulos corticais para a periferia do ooplasma. Semelhantemente, nos ovócitos vitrificados após a maturação *in vitro* (1G22h, 2G22h e 3G22h), também observou-se diminuição da marcação dos grânulos corticais. Mais uma vez não foram observadas diferenças entre os grupos.

1.3 Taxas de clivagem

As taxas de clivagem observadas nos grupos estudados dos Experimentos 1, 2 e 3 estão demonstradas no Anexo J e as médias e desvio padrão das 5 repetições de cada grupo dos Experimentos 1, 2 e 3 encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

As médias e desvio padrão das taxas de clivagem dos Experimentos 1, 2 e 3 nos momentos 0 e 6 horas estão demonstradas na Tabela 7 e nos momentos 12 e 22 horas na Tabela 8.

Tabela 4 – Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 1, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	79,4 ^a	15,2
1G0h	0,0 ^f	0,0
1G0hexp	37,1 ^d	2,9
1G6h	0,0 ^f	0,0
1G6hexp	51,1 ^{cd}	2,8
1G12h	7,3 ^e	2,5
1G12hexp	59,1 ^{bc}	5,6
1G22h	4,2 ^{ef}	2,8
1G22hexp	71,1 ^{ab}	3,2

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 2, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	79,4 ^a	15,2
2G0h	0,0 ^d	0,0
2G0hexp	33,0 ^c	6,0
2G6h	0,0 ^d	0,0
2G6hexp	52,5 ^b	4,3
2G12h	0,0 ^d	0,0
2G12hexp	61,5 ^b	3,7
2G22h	0,0 ^d	0,0
2G22hexp	62,5 ^b	8,6

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 6 – Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos do Experimento 3, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	79,4 ^a	15,2
3G0h	0,0 ^d	0,0
3Ghexp	36,2 ^c	2,6
3G6h	0,0 ^d	0,0
3G6hexp	49,8 ^c	4,0
3G12h	0,0 ^d	0,0
3G12hexp	58,8 ^{bc}	6,3
3G22h	0,0 ^d	0,0
3G22hexp	68,6 ^{ab}	6,1

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Médias e desvios padrões referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos expostos ou vitrificados imaturos dos Experimentos 1, 2 e 3

Experimento	Média (desvio padrão)			
	0 hora vitrificados	0 hora expostos	6 horas vitrificados	6 horas expostos
Experimento 1	0,0 ^c (0,0)	37,1 ^{ab} (2,9)	0,0 ^c (0,0)	51,1 ^a (2,8)
Experimento 2	0,0 ^c (0,0)	33,0 ^b (6,0)	0,0 ^c (0,0)	52,5 ^a (4,3)
Experimento 3	0,0 ^c (0,0)	32,2 ^b (2,6)	0,0 ^c (0,0)	49,8 ^a (4,0)

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 8 – Média e desvio padrão referentes à porcentagem de clivagem segundo grupos expostos ou vitrificados maturados dos Experimentos 1, 2 e 3

Experimento	Média (desvio padrão)			
	12 horas vitrificados	12 horas expostos	22 horas vitrificados	22 horas expostos
Experimento 1	7,3 ^b (2,5)	59,1 ^a (5,6)	4,2 ^{bc} (2,8)	71,1 ^a (3,2)
Experimento 2	0,0 ^c (0,0)	61,5 ^a (3,7)	0,0 ^c (0,0)	62,5 ^a (8,6)
Experimento 3	0,0 ^c (0,0)	58,8 ^a (6,3)	0,0 ^c (0,0)	68,6 ^a (6,1)

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

1.4 Taxas de produção de blastocistos

As taxas de produção de blastocistos nos Experimentos 1, 2 e 3 estão demonstrados no Anexo K e as médias e desvio padrão das 5 repetições de cada grupo dos Experimentos 1, 2 e 3 encontram-se nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

As médias e desvio padrão das taxas de produção de blastocistos dos Experimentos 1, 2 e 3 nos momentos 0 e 6 horas estão demonstradas na Tabela 12 e nos momentos 12 e 22 horas na Tabela 13.

Tabela 9 – Médias e desvios-padrões referentes à percentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 1, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	39,5 ^a	4,7
1G0h	0,0 ^c	0,0
1G0hexp	10,9 ^b	5,6
1G6h	0,0 ^c	0,0
1G6hexp	9,8 ^b	5,0
1G12h	0,0 ^c	0,0
1G12hexp	14,7 ^b	7,6
1G22h	0,0 ^c	0,0
1G22hexp	19,1 ^b	3,4

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 10 – Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 2, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	39,5 ^a	4,7
2G0h	0,0 ^c	0,0
2G0hexp	9,4 ^b	4,3
2G6h	0,0 ^c	0,0
2G6hexp	10,5 ^b	4,1
2G12h	0,0 ^c	0,0
2G12hexp	12,8 ^b	4,3
2G22h	0,0 ^c	0,0
2G22hexp	18,8 ^b	3,5

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Médias e desvios-padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupo do Experimento 3, nos momentos 0, 6, 12 e 22 horas.

Grupo	Média	DP
GC	39,5 ^a	4,7
3G0h	0,0 ^c	0,0
3G0hexp	8,7 ^{bc}	6,6
3G6h	0,0 ^c	0,0
3G6hexp	11,4 ^b	5,5
3G12h	0,0 ^c	0,0
3G12hexp	14,2 ^b	5,5
3G22h	0,0 ^c	0,0
3G22hexp	20,9 ^b	2,1

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Médias e desvios padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupos expostos ou vitrificados imaturos dos Experimentos 1, 2 e 3

Experimento	Média (desvio padrão)			
	0 hora vitrificados	0 hora expostos	6 horas vitrificados	6 horas expostos
Experimento 1	0,0 ^b (0,0)	10,9 ^a (5,6)	0,0 ^b (0,0)	9,8 ^a (5,0)
Experimento 2	0,0 ^b (0,0)	9,4 ^a (4,3)	0,0 ^b (0,0)	10,5 ^a (4,1)
Experimento 3	0,0 ^b (0,0)	8,7 ^a (6,6)	0,0 ^b (0,0)	11,4 ^a (5,5)

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 13 – Médias e desvios padrões referentes à porcentagem de blastocistos segundo grupos expostos ou vitrificados maturados dos Experimentos 1, 2 e 3

Experimento	Média (desvio padrão)			
	12 horas vitrificados	12 horas expostos	22 horas vitrificados	22 horas expostos
Experimento 1	0,0 ^b (0,0)	14,7 ^a (7,6)	0,0 ^b (2,8)	19,1 ^a (3,4)
Experimento 2	0,0 ^b (0,0)	12,8 ^a (4,3)	0,0 ^b (0,0)	18,8 ^a (3,5)
Experimento 3	0,0 ^b (0,0)	14,2 ^a (5,5)	0,0 ^b (0,0)	20,9 ^a (2,1)

^{a, b} Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

2. EXPERIMENTOS 4, 5 e 6

2.1 Avaliação da viabilidade embrionária nos Experimentos 4, 5 e 6

Os embriões de todos os grupos dos Experimentos 4, 5 e 6 (G4 c/CitB, G4 s/CitB, G5 c/CitB, G5 s/CitB, G6 c/CitB e G6 s/CitB, GC c/CitB e GC s/CitB) foram analisados e os resultados da viabilidade dos embriões de todos os grupos estudados estão demonstrados na Tabela 14. A FIGURA 11 demonstra um embrião e suas células viáveis.

Tabela 14 - Porcentagem de células viáveis dos embriões analisados de todos os grupos estudados nos Experimentos 4, 5 e 6.

GRUPO	CÉLULAS VIÁVEIS (%)
GC c/CitB	747/759 (98,4) ^a
GC s/CitB	1756/1796 (97,8) ^a
G4 c/CitB	623/1750 (35,6) ^c
G4 s/CitB	296/1183 (25,1) ^e
G5 c/CitB	567/1816 (31,2) ^d
G5 s/CitB	627/1284 (48,8) ^b
G6 c/CitB	370/979 (37,8) ^c
G6 s/CitB	341/861 (39,6) ^b

^{a, b} Grupos seguidos de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

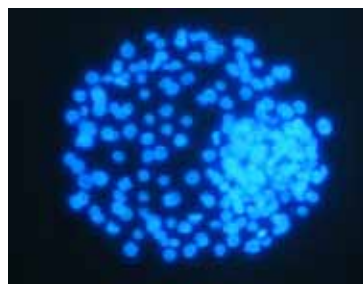


FIGURA 11: Células viáveis de um blastocisto com núcleos corados pelo HOECHST 33342, avaliado sob microscopia de epifluorescência.

2.2 Avaliação das taxas de re-expansão nos Experimentos 4, 5 e 6

As taxas de re-expansão do GC c/ CitB foram de 29,8% (17/57); do GC s/ CitB foram de 54,3% (38/70); do G5 s/ CitB 10,5% (6/57); do G6 s/ CitB 7,4%^d (4/54), como pode ser verificado na Tabela 15. No restante dos grupos não ocorreu re-expansão de nenhum blastocisto.

Tabela 15 - Taxas de re-expansão dos embriões, segundo cada grupo testado nos Experimentos 4, 5 e 6.

GRUPO	TAXA DE RE-EXPANSÃO (%)
GC c/CitB	17/57 (29,8%) ^a
GC s/CitB	38/70 (54,3%) ^a
G4 c/CitB	0/57 (0%) ^d
G4 s/CitB	0/61 (0%) ^d
G5 c/CitB	0/61 (0%) ^d
G5 s/CitB	6/57 (10,5%) ^b
G6 c/CitB	0/64 (0%) ^d
G6 s/CitB	4/54 (7,4%) ^c

^{a, b} Grupos seguidos de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

O interesse na criopreservação de ovócitos e de embriões vem aumentando devido ao rápido desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida como maturação ovocitária, fertilização e cultivo *in vitro* de embriões. Contudo, o sucesso da criopreservação de ovócitos para utilização na produção *in vitro* de embriões, assim como a congelação de embriões oriundos das técnicas de produção *in vitro* é bastante limitado, comprometendo a ampla difusão destas tecnologias (CETIN e BASTAN, 2006).

Um dos principais problemas com relação à sobrevivência de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* é a alta sensibilidade destes aos efeitos deletérios da baixa temperatura e concentração de crioprotetores. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de reduzir as injúrias causadas pelo resfriamento através do aumento da curva de resfriamento e aquecimento, de forma que as células fiquem o menor tempo possível expostas às condições lesivas de temperatura (VAJTA et al., 1997). Uma opção para que os danos da cristalização sejam evitados, tornando o processo de criopreservação mais prático e rápido e minimizando os custos, seria pelo uso de protocolos de vitrificação. O benefício da vitrificação é a não formação de cristais de gelo através do aumento na velocidade da condução da temperatura, o que permite um significativo aumento nas taxas de resfriamento (LIEBERMANN et al., 2002).

Existem muitas variáveis no processo de vitrificação que podem influenciar as taxas de sobrevivência das células; incluindo 1) o tipo e a concentração do crioprotetor, 2) a temperatura de exposição à solução de vitrificação, 3) a duração da exposição ao crioprotetor antes da imersão no nitrogênio líquido, 4) o tipo de artefato utilizado para a vitrificação (o qual influencia a taxa de resfriamento) e 5) a qualidade bem como o estágio de desenvolvimento das células testadas (LIEBERMANN et al., 2002).

Martino et al. (1996b) mostraram que através do uso de altas taxas de resfriamento, ovócitos bovinos são capazes, após a vitrificação, de se desenvolver até o estágio de blastocisto. Com a introdução das OPS (*Open Pulled Straws*) em 1997, o sucesso da vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* também foi reportado (VAJTA et al., 1997a). Ambos os

métodos citados preconizam a redução do volume da solução crioprotetora contendo o ovócito ou embrião levando à curvas de resfriamento extremamente rápidas.

O primeiro passo em qualquer protocolo de criopreservação é a exposição das células aos agentes crioprotetores. Este procedimento pode resultar em extremas flutuações no volume celular, causando danos ou tornando as células mais susceptíveis durante a subsequente congelação.

Martino et al. (1996b) sugeriram que o estresse osmótico produzido pelos agentes crioprotetores tem efeito deletério na sobrevivência de ovócitos bovinos imaturos após a criopreservação. No presente trabalho, ovócitos bovinos foram expostos a diferentes associações de agentes crioprotetores em distintos estágios de maturação com o intuito de se verificar a influência da ação das soluções crioprotetoras e o estágio de maturação no momento da vitrificação.

A análise do estágio de maturação nuclear nos ovócitos controle deste experimento mostrou que a simples retirada dos ovócitos do ambiente folicular imediatamente após a colheita (0 hora) foi o suficiente para induzir a quebra da vesícula germinativa em 41,4% dos ovócitos examinados. O máximo de configuração nuclear em Metáfase I foi obtido após 12 horas de MIV e após 22 horas de MIV 63,3% dos ovócitos atingiram Metáfase II. Este valor se encontra abaixo do citado na literatura por outros autores. Xu et al. (1986) encontraram 95% dos ovócitos em GV à zero hora, 92% em GVBD às 12 horas e 79% em MII às 24 horas de MIV. Magnusson (2002) encontrou à zero hora 43% dos ovócitos em GV, 38% em GVBD, 17% em MI e 0,9% em MII; após 12 horas de MIV, encontrou 67,4% em MI, e após 18 horas, 88,16% em MII. Os resultados observados no presente trabalho podem estar relacionados a um atraso no processo de maturação devido às condições em que os experimentos foram realizados. Segundo Diez et al. (2005), desde que o ovócito é retirado do ambiente folicular, ele espontaneamente reassume a meiose, fato que foi também observado neste trabalho. Esse processo envolvendo a quebra da vesícula germinativa é independente de estímulo de gonadotrofinas sendo tipicamente caracterizado pela condensação gradual da cromatina e desaparecimento de um núcleo compacto e membrana nuclear.

Quando os ovócitos foram vitrificados imaturos (à 0 hora) com núcleo em estágio de GV ou GVBD e submetidos à MIV após o aquecimento observou-se um aumento significativo da porcentagem de ovócitos nos quais não foi possível a identificação da cromatina, sendo, portanto, classificados como degenerados. Essa alteração foi particularmente evidente nos grupos onde foram utilizadas as associações DF+EG (Experimento 2) e DF+DMSO (Experimento 3) indicando um efeito deletério da dimetilformamida sobre a configuração nuclear dos ovócitos vitrificados em estágio de GV e GVBD. Este efeito parece ter impedido nestes ovócitos a organização da placa metafásica I e primeira divisão meiótica. Vincent et al. (1988), ao estudarem ovócitos de coelha submetidos à congelação, observaram que a exposição tanto ao DMSO como ao 1,2 propanodiol levou ao aparecimento de microtúbulos no citoplasma e ao desarranjo do fuso meiótico. Estes microtúbulos citoplasmáticos permaneceram presentes após a congelação, descongelação e remoção do crioprotetor. O mesmo tipo de alteração foi também observado por Renard e Prulière (1988), que constataram que este efeito é reversível, mas a organização normal dos microtúbulos só reaparece muitas horas após a remoção dos crioprotetores. Alterações do sistema de microtúbulos foram observadas também por Albarracín et al. (2005) ao estudarem ovócitos vitrificados.

Neste trabalho, analisando-se os resultados de configuração nuclear dos ovócitos submetidos à vitrificação após 22 horas de MIV, não foi observada diferença daqueles encontrados nos ovócitos não vitrificados após 22 horas de MIV (grupo controle). Isso indica que, ao contrário do observado em ovócitos imaturos, todas as combinações de crioprotetores utilizadas foram eficientes em manter a integridade da placa metafásica dos ovócitos submetidos à vitrificação.

Um número limitado de estudos tem focado os efeitos de baixas temperaturas sobre a ultra-estrutura dos ovócitos e pouco é conhecido sobre as modificações ultra-estruturais que podem ocorrer nos ovócitos bovinos. Diez et al. (2005) mostraram que a criopreservação induz à mudanças ultra-estruturais. No presente trabalho, quando foi analisado o efeito da vitrificação sobre a distribuição das mitocôndrias e dos grânulos corticais notou-se que nos ovócitos controle (não vitrificados) ocorreram modificações de distribuição mais

periférica das mitocôndrias nos ovócitos imaturos, para um agrupamento centralizado nos ovócitos maduros. Por outro lado os grânulos corticais migraram de uma posição central em grumos nos ovócitos imaturos, para um alinhamento ao longo da membrana vitelínica na periferia do ovócito maduro. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Hyttel et al. (1989) ao observarem ovócitos bovinos e por Landim-Alvarenga (2002) em seu estudo com ovócitos eqüinos.

Nos ovócitos submetidos à vitrificação observou-se que as mitocôndrias se encontravam distribuídas em grumos no citoplasma. Esta característica foi mais evidente nos ovócitos vitrificados imaturos, nos quais após a MIV não houve alteração no padrão de distribuição destas organelas. Estes resultados, associados à observação da provável fragmentação nuclear descrita anteriormente indicam que nos ovócitos vitrificados imaturos ocorreu desagregação de componentes do citoesqueleto celular. Este efeito parece ser mais acentuado e irreversível nos ovócitos submetidos à ação da DF.

Existem evidências de que solventes orgânicos, como os crioprotetores, influenciam a dinâmica do citoesqueleto. De acordo com Gekko & Timasheff (1981), o glicerol e o DMSO além de poderem induzir a montagem de microtúbulos *in vitro*, parecem estabilizar os filamentos de actina. A actina desempenha papel importante em eventos cruciais da fecundação e início da clivagem embrionária como: a rotação do fuso meiótico na segunda anáfase, formação do segundo corpúsculo polar, migração nuclear e citocinese. Além disso, a organização da actina regula as propriedades estruturais do citoplasma e a deformidade da superfície celular. Esse efeito dinâmico baseia-se na ação de diversas proteínas ligantes que modulam a organização da actina em termos de comprimento ou associação dos filamentos, e no equilíbrio da polimerização da actina globular em filamentos. Este equilíbrio, como demonstrado *in vitro*, depende de condições como temperatura, pH e de forças iônicas (VINCENT et al., 1990) e sua alteração leva à distribuição errática das organelas celulares.

A diminuição da marcação dos grânulos corticais observada em todos os grupos de ovócitos vitrificados pode também estar relacionada à falhas na sua distribuição e/ou a liberação precoce destas estruturas. De fato, de acordo com Fuku et al. (1995a) uma rarefação e distribuição errática dos grânulos corticais

ocorre em ovócitos bovinos vitrificados como consequência da exposição às substâncias crioprotetoras. Devido à associação dos componentes do citoesqueleto com outras estruturas, é possível que sua destruição leve a danos em outros componentes celulares como a liberação precoce das enzimas dos grânulos corticais. Estas mudanças podem impedir a fertilização levando à diminuição nas taxas de clivagem após a inseminação (ALBARRACÍN et al., 2005).

Os resultados da análise de distribuição de organelas, bem como da qualidade da conformação nuclear foram confirmados pelos Experimentos 1, 2 e 3 onde a exposição dos ovócitos imaturos aos agentes crioprotetores resultou em perda substancial de sua viabilidade, avaliada pelas taxas de clivagem. De acordo com os resultados obtidos com ovócitos imaturos, a exposição aos crioprotetores, independente de sua combinação, levou à taxas de clivagem significativamente inferiores quando comparado ao grupo controle (GC 79,4% > 1G0hexp 37,1% = 1G6hexp 51,1%; GC 79,4% > 2G6hexp 52,5% > 2G0hexp 33,0%; GC 79,4% > 3G0hexp 49,8% = 3G6hexp 49,8%). Estes dados corroboram com os resultados de Parks e Ruffing (1992), Otoi et al. (1995) e Parks et al. (1997) que também observaram maior sensibilidade de ovócitos imaturos aos efeitos dos agentes crioprotetores e ao processo de vitrificação. Men et al. (2002) também afirmaram que o estágio de maturação dos ovócitos tem grande impacto na competência de desenvolvimento dos ovócitos após a criopreservação. De acordo com estes autores ovócitos em GV parecem ser mais sensíveis à criopreservação do que ovócitos em MII. A razão para a maior sensibilidade natural dos ovócitos bovinos nesse estágio para a criopreservação é ainda desconhecida (MEN et al., 2002).

No presente trabalho pode ser observado um acréscimo gradativo nos índices de clivagem à medida que os ovócitos foram somente expostos aos crioprotetores nos momentos 0 até 22 horas. Desta forma, a exposição dos ovócitos maduros à mistura de crioprotetores contendo DMSO não levou à diferenças na taxa de clivagem em relação ao grupo GC (79,4%) (1G22hexp 71,1% e 3G22hexp 68,6%). Existem evidências na literatura de que a permeabilidade da membrana plasmática de ovócitos bovinos se altera durante o processo de maturação. Agca et al. (1998) investigaram a permeabilidade da membrana plasmática à água e aos crioprotetores em ovócitos bovinos

maduros e imaturos, constatando que ovócitos maduros são mais permeáveis ao DMSO. Apesar de ovócitos em GVBD serem mais resistentes ao resfriamento do que aqueles em GV e MII, quando ocorre criopreservação, os ovócitos em GVBD demonstram uma sensibilidade maior às baixas temperaturas quando comparados com aqueles em MII (MEN et al., 2002).

De acordo com os resultados de Martino et al. (1996b) e Rho et al. (2002), ovócitos expostos aos crioprotetores sem posterior resfriamento mostraram redução no desenvolvimento, sugerindo que o choque osmótico desempenha importante papel nos procedimentos de criopreservação, o que pode ser também observado no presente trabalho, pois a combinação de DF+EG se mostrou deletéria mesmo para ovócitos maduros, resultando em taxa de clivagem significativamente inferiores aos demais grupos (2G22hexp 62,5%).

Após a progressão meiótica e extrusão do primeiro corpúsculo polar, o ovócito pára em MII e reassume sua atividade na fertilização. Nos ovócitos mamíferos ocorrem também mudanças no citoplasma, conhecidas como maturação citoplasmática, e o sucesso na fertilização depende dessas alterações. O sucesso na maturação citoplasmática é muito mais difícil que a maturação nuclear em um sistema *in vitro* e a maturação citoplasmática inadequada pode comprometer seriamente a viabilidade do ovócito. Com relação aos grupos de ovócitos submetidos à vitrificação no Experimento 1, os ovócitos vitrificados às 12 horas de maturação *in vitro* (1G12h=7,3%) produziram maiores taxas de clivagem que aqueles vitrificados com 22 horas (1G22h=4,2%). Esse resultado parece indicar que a melhor fase para criopreservação dos ovócitos seria aquela na qual já ocorreu o re-início da meiose mas a maturação citoplasmática ainda não se completou. Men et al. (2002) citaram que os protocolos de maturação *in vitro* causam grande impacto na maturação do núcleo e do citoplasma, especialmente na maturação citoplasmática e conseqüentemente, na competência para o desenvolvimento dos ovócitos. Desta forma a habilidade do ovócito já maduro em sobreviver ao processo de vitrificação estaria diretamente ligada ao sucesso do protocolo de MIV. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os de Hochi et al. (1997) que vitrificaram ovócitos às 0, 6, 12 e 24 horas de maturação e

notaram que aqueles maturados por 12 horas se encontravam no melhor estágio para vitrificação.

Quando comparadas as taxas de produção de blastocistos entre os grupos do Experimento 1 foi verificado que não houve diferença entre os grupos de ovócitos somente expostos aos crioprotetores (1G0hexp 10,9% = 1G6hexp 9,8% = 1G12hexp 14,7% = 1G22hexp 19,1%), porém essas taxas foram inferiores às obtidas no grupo controle (GC=39,5%) e superiores às dos grupos submetidos à vitrificação, nos quais não houve produção de blastocisto (1G0h = 1G6h = 1G12h = 1G22h = 0%). Através destes resultados pode ser observado que em todos os grupos analisados no Experimento 1 não houve eficiência na ação dos agentes crioprotetores sobre os ovócitos no procedimento de vitrificação e somente a exposição dos ovócitos aos mesmos já foi capaz de causar efeitos deletérios, pois apesar de ter ocorrido produção de blastocistos nos grupos de ovócitos apenas expostos, em todos os momentos estudados as taxas foram significativamente menores que no grupo controle. Entretanto, a combinação de crioprotetores utilizada no Experimento 1 (EG+DMSO) foi a única que resultou em clivagem após a vitrificação de ovócitos maturados por 12 e 22 horas indicando que das combinações testadas esta foi a mais eficiente.

Ao se comparar os grupos do Experimento 2, nos quais foi utilizada a associação de DF+EG como agentes crioprotetores, pode-se verificar que a DF aparentemente causou efeitos deletérios aos ovócitos pois mesmo no grupo de ovócitos maduros apenas expostos (2G22hexp=62,5%) as taxas de clivagem foram significativamente inferiores às taxas do grupo controle (GC=79,4%). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de ovócitos expostos aos crioprotetores às 6, 12 e 22 horas de maturação *in vitro* (2G6hexp 52,5% = 2G12hexp 61,5% = 2G22hexp 62,5%), porém, estes resultados foram inferiores aos obtidos no grupo controle (GC=79,4%) e superiores aos do grupo 2G0hexp (33%), demonstrando efeito benéfico da realização da maturação *in vitro* antes da exposição dos ovócitos aos crioprotetores, pois os ovócitos imaturos (2G0hexp) produziram taxas de clivagem inferiores após a exposição aos agentes crioprotetores.

As taxas de produção de blastocistos dos grupos de ovócitos expostos aos crioprotetores foram semelhantes (2G0hexp 9,4% = 2G6hexp 10,5% =

2G12hexp 12,8% = 2G22hexp 18,8%), porém inferiores ao grupo controle (GC=39,5%) e superiores aos grupos de ovócitos submetidos à vitrificação (2G0h = 2G6h = 2G12h = 2G22h = 0%). Estes resultados comprovam o que Albarracín et al. (2005) informaram ao citar que a vitrificação de ovócitos bovinos em estágio de MII pelo método de OPS produz mudanças biológicas nos ovócitos após o aquecimento, refletido na subsequente fertilização e desenvolvimento embrionário; alterações estas mais pronunciadas no Experimento 2 do que no Experimento 1, devido aos agentes crioprotetores utilizados. A combinação dos agentes crioprotetores DF+EG e DF+DMSO, nas condições utilizadas com relação à concentração e período de exposição não promoveram criopreservação adequada aos ovócitos em nenhum estágio de maturação.

A exposição dos ovócitos à associação dos crioprotetores DF+DMSO no Experimento 3 resultou em taxas de clivagem semelhantes entre os grupos controle e expostos às 22 horas de maturação *in vitro* (GC 79,4% = 3G22hexp 68,6%), porém as taxas foram inferiores quando os ovócitos foram expostos em momentos de menor período de maturação *in vitro* (3G12hexp 58,8% = 3G6hexp 49,8% = 3G0hexp 36,2%), o que indica que houve uma depreciação na qualidade dos ovócitos expostos aos agentes crioprotetores, principalmente quando imaturos.

Nos grupos de ovócitos vitrificados no Experimento 3, a mistura não se mostrou capaz de proteger os mesmos contra os danos causados pela vitrificação, pois não ocorreu clivagem em nenhum grupo (3G0h = 3G6h = 3G12h = 3G22h = 0%). Fuku et al. (1995b) também vitrificaram ovócitos bovinos em estágio de GV e após maturação *in vitro* testando DMSO + acetamida + propanodiol como agentes crioprotetores. Os resultados obtidos por eles também foram severos, pois somente 3% dos ovócitos maturados desenvolveram até o estágio de 8 células, mas nenhum formou blastocisto; nenhum dos ovócitos vitrificados em GV clivou, enquanto 66,7% (78/117) do controle desenvolveu em estágio de 2 células e 19,2% (15/78) atingiu o estágio de blastocisto. Estes autores concluíram que a vitrificação induziu profundas modificações ultra-estruturais em microvilos, mitocôndria, formação da vesícula e o ooplasma dos ovócitos em GV, enquanto essas estruturas foram geralmente um pouco melhor preservadas em ovócitos maturados *in vitro*.

Alterações da zona pelúcida dos ovócitos maturados *in vitro* decorrentes da vitrificação foram associadas com menor quantidade de grânulos corticais no ooplasma, resultante de uma liberação prematura dos mesmos.

Ainda no Experimento 3, aqueles ovócitos pertencentes aos grupos submetidos à apenas exposição aos agentes crioprotetores também tiveram sua qualidade afetada negativamente, pois resultaram em taxas de produção de blastocistos significativamente inferiores às dos ovócitos controle em todos os momentos de exposição, mesmo às 22 horas de maturação *in vitro*, onde as taxas de clivagem não haviam diferido do grupo controle (3G0hexp 8,7% < 3G6hexp 11,4% = 3G12hexp 14,2% = 3G22hexp 20,9% < GC 39,5%). Embora não exista diferença estatística significativa entre os momentos de exposição aos crioprotetores, as taxas de produção de blastocistos obtidas no grupo de ovócitos expostos imediatamente após a colheita (3G0hexp=8,7%) foram numericamente inferiores e semelhantes àquelas obtidas nos grupos de ovócitos vitrificados (3G0h = 3G6h = 3G12h = 3G22h = 0%).

Quando comparadas as taxas de clivagem entre os grupos de ovócitos expostos aos crioprotetores nos momentos 12 e 22 horas de maturação *in vitro* nos Experimentos 1, 2 e 3, nota-se que não houve diferença significativa entre os grupos (1G12hexp 59,1% = 2G12hexp 61,5% = 3G12hexp 58,8% = 1G22hexp 71,1% = 2G22hexp 62,5% = 3G22hexp 68,6%). No entanto, após a vitrificação somente os ovócitos do Experimento 1 clivaram, tanto os pertencentes ao grupo vitrificado às 12 horas como às 22 horas de maturação *in vitro* (1G12h 7,3% = 1G22h 4,2%), o que pode demonstrar que a mistura EG+DMSO proporcionou maior eficiência na proteção dos ovócitos contra as crioinjúrias causadas pela vitrificação do que as demais associações de crioprotetores testadas.

Nos ovócitos expostos aos agentes crioprotetores às 6 horas de maturação *in vitro* não houve diferença entre os resultados nas taxas de clivagem de todos os grupos nos Experimentos 1, 2 e 3 (1G6hexp 51,1% = 2G6hexp 52,5% = 3G6hexp 49,8%). Da mesma forma, nos ovócitos imaturos (0 hora) não houve diferença no efeito deletério causado pelos agentes crioprotetores (1G0hexp 37,1% = 2G0hexp 33% = 3G0hexp 32,2%). Contudo, somente o grupo imaturo exposto ao EG+DMSO apresentou resultado semelhante aquele obtido nos ovócitos expostos à mesma associação de

crioprotetores após 6 horas de maturação *in vitro* (1G0hexp 37,1% = 1G6hexp 51,1%).

Por outro lado, comparando-se as taxas de produção de blastocistos dos grupos de ovócitos expostos aos crioprotetores à 0 e 6 horas de maturação *in vitro*, não observou-se diferença entre eles (1G0hexp 10,9% = 2G0hexp 9,4% = 3G0hexp 8,7% = 1G6hexp 9,8% = 2G6hexp 10,5% = 3G6hexp 11,4%), sendo que essas taxas foram numericamente semelhantes àquelas obtidas nos momentos 12 e 22 horas de maturação *in vitro* (1G12hexp 14,7% = 2G12hexp 12,8% = 3G12hexp 14,2% = 1G22hexp 19,1% = 2G22h 18,8% = 3G22h 20,9%).

De acordo com Fahy (1986), nenhuma técnica de criopreservação garante 100% de sobrevivência celular após o aquecimento. Durante a criopreservação os ovócitos são submetidos à severas condições contrárias às fisiológicas e isto resulta em várias injúrias citológicas. De fato, no presente estudo nota-se que não houve sucesso após a vitrificação em nenhum experimento, com a utilização das diferentes associações de agentes crioprotetores na tentativa de criopreservação de ovócitos em todos os momentos estudados. Todos os grupos de ovócitos submetidos à vitrificação nos Experimentos 1, 2 e 3 não foram capazes de se desenvolverem até blastocistos (0% em todos os grupos). Embora a exposição aos crioprotetores por si só tenha levado a um efeito deletério sobre os ovócitos, este foi agravado pelo processo de vitrificação. Lim et al. (1992) concluíram que após a criopreservação, os ovócitos apresentam competência de desenvolvimento comprometido. Isto pode ser primeiramente explicado pelo dano nuclear, incluindo desorganização do fuso e perda de parte dos microtúbulos, como também outras alterações ultra-estruturais vistas em ovócitos vitrificados.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se verificar as alterações provocadas pelos agentes crioprotetores e pela vitrificação aos ovócitos. Através do conhecimento de tais alterações podem ser cada vez mais compreendidas as razões pelas quais a vitrificação ainda não alcançou resultados tão bem sucedidos. De acordo com Men et al. (2002) a taxa de clivagem significativamente inferior após inseminação *in vitro* em ovócitos criopreservados pode ser devido à falha na fertilização e conseqüentemente competência de desenvolvimento dos ovócitos. Ainda segundo esses autores a

criopreservação pode causar liberação prematura dos grânulos corticais e a zona pelúcida é modificada, podendo bloquear a entrada do espermatozóide para o interior dos ovócitos. No presente trabalho, a diminuição da marcação dos grânulos corticais observada em ovócitos criopreservados indica uma possível liberação prematura destas organelas, o que poderia, pelo menos em parte, ser responsável pela menor taxa de clivagem observada em todos os grupos, em relação ao controle.

No trabalho de Albarracín et al. (2005) as taxas de clivagem e de blastocistos também foram significativamente inferiores nos ovócitos vitrificados que no grupo controle. Os autores verificaram alterações nos microtúbulos e cromossomo nos ovócitos vitrificados observando configurações normais de fuso e cromossomo em 51,3% dos ovócitos expostos aos crioprotetores e 40% dos ovócitos vitrificados, diferenciando significativamente dos 87,8% dos ovócitos controle. Tanto a exposição como a vitrificação aumentam as porcentagens de ovócitos com fusos anormais. Estes resultados não foram confirmados no presente estudo, pois quando ovócitos maduros submetidos à vitrificação foram aquecidos para exame da configuração nuclear, não foi observada diferença entre aquela observada em grupos de ovócitos frescos submetidos à MIV. Albarracín et al. (2005) também descreveram alterações nos filamentos de actina dos ovócitos vitrificados, pois na maioria dos ovócitos não tratados (90,9% a 96,5% dos ovócitos), a actina mostrou-se compacta e homogênea, permanecendo na periferia do oolema. A exposição aos crioprotetores ou à vitrificação aumentou as porcentagens de ovócitos com actina anormal. Esta alteração dos filamentos pode ser a responsável pelas modificações na distribuição das mitocôndrias observada no presente trabalho, em todos os grupos estudados.

Outro aspecto a ser considerado como um dos possíveis criodanos provocados pela vitrificação seria a destruição das junções tipo GAP entre as células do cumulus e o ovócito que usualmente ocorre quando ovócitos são criopreservados. No presente estudo foi observado que após a vitrificação e aquecimento dos ovócitos em todos os grupos, as células do cumulus se desprendiam com muita facilidade e grande parte dos ovócitos se encontrava desnuda após esse procedimento.

No experimento de Cetin e Bastan (2006), foi testada a ação crioprotetora do EG, do DMSO e da associação EG+DMSO. Foi observado que durante a diluição do crioprotetor e após a diluição, no aquecimento, ocorreu desprendimento das células do cumulus dos ovócitos do grupo do DMSO, fato que não ocorreu no grupo do EG e nem no grupo do EG+DMSO. Contudo, no Experimento 1 deste trabalho este fato foi observado nos ovócitos após o aquecimento dos mesmos. Nos Experimentos 2 e 3 esse desprendimento foi ainda mais significativo.

Miyake et al. (1993) mostraram que ovócitos vitrificados precisam estar envolvidos pelas células do cumulus. Porém, Vajta (1999) mostrou que as camadas de células do cumulus e glicoproteínas acumuladas podem reduzir a velocidade de penetração dos crioprotetores no equilíbrio. A remoção parcial das células do cumulus é muito difícil de ser realizada uniformemente e as diferenças podem causar penetração desigual de crioprotetor. Dhali et al. (2000) reportaram que a presença de massa do cumulus compacta pode reduzir as taxas de passagem de EG ou DMSO para o interior dos ovócitos.

Hurt et al. (2000) reportaram que a vitrificação com EG levaria à expansão das células do cumulus provavelmente por danificar as junções tipo GAP entre o cumulus e os ovócitos e também, distribuição irregular de grânulos corticais foi noticiada em ovócitos expostos a crioprotetores. Nesse trabalho, os autores concluíram que ovócitos bovinos imaturos podem ser congelados pela técnica de vitrificação em palhetas. Porém, o crioprotetor utilizado pode alterar o sucesso da maturação e quando analisaram as taxas de maturação o crioprotetor que se mostrou mais vantajoso foi o EG.

De acordo com os resultados obtidos por Siqueira-Pyles (2002) em um estudo prévio, foi possível afirmar que a vitrificação atua negativamente sobre a viabilidade, taxas de clivagem e produção de blastocistos originados de ovócitos submetidos ao processo, tanto nos ovócitos vitrificados imaturos como naqueles submetidos à maturação *in vitro* antes da realização do procedimento da vitrificação. Através da análise dos resultados do presente estudo, pode-se afirmar que este efeito negativo da vitrificação sobre os ovócitos se repetiu, o que indica que as associações e/ou concentrações de agentes crioprotetores testadas não foram eficientes em proteger os ovócitos contra os criodanos provocados pela vitrificação.

Através do procedimento de vitrificação realizado no presente trabalho, sugere-se que ovócitos maturados estejam no estágio apropriado para o progresso na pesquisa em vitrificação de ovócitos. Este trabalho contribuiu para identificar fatores envolvidos na degeneração do ovócito após a vitrificação como degeneração de organelas citoplasmáticas, falta de comunicação entre as células do cumulus e o ovócito ou alterações no padrão de migração dos grânulos corticais.

O armazenamento e transporte em nitrogênio líquido de embriões produzidos tanto *in vivo* como *in vitro* tem se tornado essencial para a maximização do seu uso em larga escala (DINNYES et al., 2006).

O citoesqueleto, uma complexa rede de microfilamentos de actina e microtúbulos formados pela polimerização de tubulina, tem um importante papel na fisiologia das células embrionárias, através da manutenção da sua estrutura, formato, força mecânica e da regulação da divisão celular e movimentos. No entanto, a criopreservação tem um efeito deletério para o citoesqueleto e, por conseguinte, na sobrevivência dos embriões. Enquanto os crioprotetores tendem a despolimerizar os microtúbulos e microfilamentos, o resfriamento pode causar a ruptura total do citoesqueleto (DINNYES et al., 2006). Portanto, existe a necessidade de estabilização do citoesqueleto antes da criopreservação. Send assim, nos Experimentos 4, 5 e 6 deste trabalho, a Citocalasina B foi testada como um agente despolimerizador de microfilamentos, antes do procedimento de vitrificação. As citocalasinas inibem a polimerização de microfilamentos, o que torna a membrana celular elástica e, dessa forma, acredita-se que ela mantenha a integridade estrutural das membranas e das organelas citoplasmáticas. Após a descongelação e a re-hidratação os embriões são mantidos em um meio livre de citocalasina, dessa forma os microfilamentos se repolimerizam e um citoesqueleto estável se regenera (DINNYES et al., 2006).

Quando analisados os resultados dos Experimentos 4, 5 e 6, nos quais embriões bovinos foram criopreservados, não observou-se efeito da adição da Citocalasina B na viabilidade celular de embriões não vitrificados (GC c/CitB 98,4% = GC s/CitB 97,8%). No entanto, em todos os grupos de embriões vitrificados houve um decréscimo significativo da viabilidade celular após a vitrificação.

As taxas de re-expansão dos grupos G4 s/CitB (0%), G4 c/CitB (0%), G5 c/CitB (0%), G6 s/CitB (7,4%) e G6 c/CitB (0%) não diferiram estatisticamente entre si e foram estatisticamente inferiores às dos grupos GC s/CitB (54,3%) e GC c/CitB (29,8%). As taxas de re-expansão dos embriões do grupo G5 s/CitB (10,5%) embora diferentes às dos grupos GC s/CitB e GC c/CitB foram positivas, o que pode demonstrar que a associação destes agentes crioprotetores (DF+EG) causou efeito benéfico ao embrião no processo de vitrificação. Estes resultados do grupo G5 s/CitB mostram que a exposição dos embriões bovinos à Citocalasina B aparentemente diminuiu as taxas de re-expansão quando comparado aos embriões vitrificados com a mesma solução de vitrificação, porém não expostos à essa substância.

De acordo com Donnay et al. (1998), a produção *in vitro* de embriões bovinos difere daqueles produzidos *in vivo* em muitos aspectos: por exemplo, capacidade de desenvolvimento *in vitro*, morfologia, resistência à congelação e sobrevivência após a transferência. O aprimoramento da criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* é um importante objetivo e dados recentes indicam que a congelação rápida, ao contrário da lenta, pode ser benéfica para sua sobrevivência.

Dinnyes et al. (2006) relataram que a sobrevivência de embriões após a criopreservação é fortemente influenciada pela idade, estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, sendo esta última normalmente avaliada pelas características morfológicas dos mesmos.

Ao se criopreservar embriões bovinos, Seidel Jr (2006) afirmou que ocorrem variações com relação à criotolerância associadas ao indivíduo, raça, espécie, tipo celular e fatores como nutrição e estação do ano. O autor relata que a maioria dos componentes da membrana celular são fosfolipídeos, colesterol, outros lipídeos e proteínas e que, com exceção das proteínas, esses componentes podem ser manipulados favoravelmente com uma variedade de passos incluindo nutrição e manipulação da dieta das doadoras e composição do meio de cultura, os quais podem alterar a congelabilidade das células. No presente trabalho tais aspectos não puderam ser verificados por se tratar de embriões provenientes de ovócitos de vacas de abatedouro, onde essas informações eram desconhecidas.

Men et al. (2005) afirmaram que o soro fetal bovino contém fatores do crescimento, vitaminas, peptídeos e muitas outras moléculas desconhecidas. A suplementação do meio de cultivo com soro num determinado estágio embrionário (geralmente no estágio de desenvolvimento embrionário tardio) parece estimular a divisão celular embrionária e acelerar o desenvolvimento. Os autores citam ainda que a presença de soro durante o cultivo de embriões bovinos tem mostrado ser deletério na habilidade do embrião sobreviver à criopreservação. Embriões produzidos com suplementação de soro têm um acúmulo intracelular de lipídeos anormal comparado com aqueles produzidos *in vivo* ou em sistema livre de soro. Os embriões produzidos em sistema livre de soro têm menos acúmulo de lipídeos intracelulares e melhor sobrevivência quando eles são submetidos à criopreservação. Segundo Seidel Jr. (2006), diferentes condições de cultura podem resultar em embriões com diferentes propriedades. A cultura na ausência de soro resulta em menor acúmulo de lipídeos nos embriões. O sucesso na criopreservação de embriões parece estar altamente relacionado com o conteúdo lipídico, mas o mecanismo específico é desconhecido e pode estar indiretamente relacionado aos lipídeos citoplasmáticos. Os embriões com menos lipídeos, produzidos sem soro no meio, são criopreservados com mais sucesso do que aqueles produzidos na presença de soro. Nesse trabalho, o meio de cultura foi acrescido de soro fetal bovino a partir do D3, e, talvez essa seja uma das razões para o baixo sucesso obtido nas taxas de re-expansão após o aquecimento dos embriões vitrificados.

Há na literatura outras citações de que embriões produzidos *in vitro* são diferentes na sua morfologia quando comparados com embriões produzidos *in vivo*; por exemplo, eles tendem a conter mais vacúolos e tem complexos juncionais mais curtos e em menor quantidade (SHAMSUDDIN et al, 1992), a compactação é menos pronunciada em embriões produzidos *in vitro* (VAN SOOM et al., 1992), e o disco embrionário é geralmente menor (IWASAKI et al., 1990). Embriões gerados em diferentes sistemas de cultivo podem responder de modos diversos a diferentes métodos de criopreservação. Um estudo recente sugere que a presença de soro é prejudicial para a eclosão de embriões bovinos após a descongelação (MUCCI et al., 2006).

A presença de soro no meio pode afetar a velocidade de desenvolvimento do embrião e reduzir a tolerância à congelação de

blastocistos (RIZOS et al., 2003). Porém, Men et al. (2005) ao vitrificarem em OPS embriões de porca produzidos *in vitro* compararam aqueles cultivados em sistema com ou livre de soro. Os resultados obtidos foram contrários à literatura, pois após o aquecimento os blastocistos produzidos na presença de soro tiveram habilidade aumentada em sobreviver à criopreservação e também apresentaram um maior número de células viáveis quando comparados com os blastocistos produzidos em sistema livre de soro. Isso sugere que particularidades inter-específicas na composição das estruturas embrionárias levam à respostas diferentes nos processos de criopreservação.

Nagashima et al. (1994) relataram a técnica de remoção de lipídeos dos embriões, a qual envolve a polarização dos lipídeos embrionários por centrifugação e a remoção dos lipídeos polarizados com uma pipeta de sucção. Foi relatado que mais de 60% dos embriões em estágios iniciais (uma célula ou 2-4 células) que sofreram a remoção de lipídeos sobreviveram ao resfriamento à 4°C, enquanto sem a remoção nenhum dos embriões sobreviveu. Além disso, o desenvolvimento de embriões congelados que sofreram a remoção de lipídeos até o estágio de blastocisto foi semelhante ao desenvolvimento de zigotos controle que não sofreram congelação. Em outro estudo, nenhum dos embriões controle sobreviveu ao método de congelação convencional, todavia, após a remoção de lipídeos 55,6-90,6% de embriões suínos no estágio de 2-4 ou 4-8 células sobreviveu à congelação, e 30,6-64,1% deles se desenvolveu até blastocisto. Estes resultados provaram claramente que a sensibilidade de embriões suínos à congelação está relacionada à concentração de lipídeos intracelulares, e que os embriões suínos podem ser criopreservados, com a remoção de lipídeos citoplasmáticos, mesmo por um método tradicional de congelação lenta.

Sabendo-se que os embriões passam por eventos críticos durante o seu desenvolvimento como fertilização, clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação e formação do blastocisto sob condições de cultivo *in vitro* há necessidade de que ocorram progressos nos sistemas de cultivo que permitam facilitar a mitose dos embriões cultivados *in vitro* viabilizando a produção de embriões de melhor qualidade.

Sommerfeld e Niemann (1999) afirmaram que embriões produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento e de diferentes qualidades

morfológicas exibem variáveis taxas de sobrevivência pós-vitrificação. Os pesquisadores reportam ainda que há controvérsias sobre o estágio embrionário ideal para que se realize a vitrificação, restando a dúvida entre mórulas compactas ou blastocistos em D7 e D8 com relação às maiores taxas de sobrevivência celular após o aquecimento do embrião. Em seu estudo foi demonstrado que os blastocistos em D7 são o melhor estágio de desenvolvimento para congelação controlada. No presente trabalho, não foi comparado o estágio de desenvolvimento, sendo que todos os embriões vitrificados se encontravam no D7 em estágio de blastocisto ou blastocisto expandido. Pugh et al. (1998) também afirmaram que a sobrevivência à criopreservação é significativamente afetada pelo estágio embrionário, porém seus resultados demonstraram maior sobrevivência de blastocistos eclodidos que de blastocistos ou de mórulas compactas. Alguns pesquisadores relataram que embriões no dia 7 toleram os tratamentos de criopreservação melhor do que embriões nos dias 6 ou 8 (HASLER et al., 1997; MARKKULA et al., 2001), enquanto outros relataram que a idade do embrião à vitrificação não tem efeito na sobrevivência do mesmo (MARTINEZ et al., 1998).

Embora os embriões vitrificados com a associação dos crioprotetores DF+EG no Experimento 5, sem exposição prévia à solução de citocalasina B tenham apresentado taxas de re-expansão diferentes dos grupos controle, expostos ou não à citocalasina B, 10,5% dos embriões sobreviveram à vitrificação e se re-expandiram em cultura. Da mesma forma, no Experimento 6, onde os embriões foram vitrificados em DF+DMSO e não expostos à citocalasina B, observou-se um decréscimo na taxa de re-expansão em comparação ao controle e ao G5 s/CitB, mas ainda observou-se re-expansão de 7,4% dos embriões. Estes resultados indicam que, ao contrário do observado para ovócitos, o crioprotetor DF apresenta um efeito benéfico na criopreservação de embriões, devendo ser melhor explorado. Baudot e Boutron (1998) compararam a eficiência em promover uma vitrificação completa utilizando-se soluções crioprotetoras de dietilformamida e dimetilformamida em associação com outros crioprotetores e verificaram que estes compostos são comparáveis ao DMSO, mais eficientes do que o glicerol e etilenoglicol e menos eficientes do que o 1,2 propanodiol. Os autores sugerem ainda que estes componentes possam ser novos crioprotetores efetivos.

Todos os dados de re-expansão dos grupos de embriões submetidos à vitrificação dos Experimentos 4, 5 e 6 foram inferiores aos publicados por Donnay et al. (1998), onde as taxas de sobrevivência *in vitro* dos blastocistos bovinos produzidos *in vitro* após vitrificação reportadas foram de 67% de re-expansão e 53% de eclosão, por Kuwayama et al. (1992) com 87% de re-expansão, por Dinnyes et al. (1995) com 81%, Mahmoudzadeh et al. (1995) com 69 a 89% e Vajta et al. (1995) com 84%, onde todos utilizaram diferentes métodos para a produção dos embriões e para a vitrificação, todos estes sem adição de soro. Os embriões produzidos em sistemas contendo soro fetal bovino possuem uma alta concentração de lipídeos, o que pode influenciar negativamente a resistência destes aos processos de criopreservação. Mais uma vez ressaltamos que o uso de soro no sistema de produção utilizado no presente trabalho pode ter exercido um efeito deletério sobre os resultados obtidos.

Experimentos com transferência são necessários para acessar a sobrevivência embrionária, especialmente para embriões bovinos produzidos *in vitro*.

CONCLUSÕES

O estágio de maturação nuclear e citoplasmática dos ovócitos no momento da vitrificação exerce influência na tolerância ovocitária à criopreservação, sendo que os ovócitos maturados (vitrificados após 12 e 22 horas de MIV) têm maior capacidade de suportar tal procedimento do que aqueles imaturos (vitrificados com 0 ou 6 horas de MIV), em todos os grupos estudados.

A exposição dos ovócitos às diferentes associações de crioprotetores testadas, às 12 e 22 horas de MIV é deletéria. O efeito negativo é ainda mais notável nos ovócitos expostos à 0 e 6 horas de MIV.

Apesar dos efeitos deletérios da ação dos crioprotetores e da vitrificação sobre os ovócitos, nas condições deste experimento a associação de EG+DMSO é a mais eficiente para vitrificação de ovócitos.

A Citocalasina B não demonstra efeito deletério sobre a viabilidade celular dos embriões. Porém, com relação às taxas de re-expansão, a sua adição é deletéria aos embriões de todos os grupos estudados, inclusive aos dos grupos controle.

Embora as associações de crioprotetores utilizadas não tenham sido eficientes em proteger os embriões dos danos causados pela vitrificação, nas condições do presente estudo as associações contendo DF foram as que apresentaram melhor resultado na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

- AGCA, Y.; LU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, E.S.; CRITSER J.K. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev.*, v.49, p.408-415, 1998.
- AHKONG, Q.F.; FISHER, D.; TAMPION, W.; LUCY, J.A. Mechanisms of cell fusion. *Nature*, v.253, p.194-195, 1975.
- ALBARRACÍN, J.L.; MORATÓ, R.; ROJAS, C.; MOGAS, T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.890-901, 2005.
- AL-HASANI, S.; DIEDRICH, K. Oocyte storage. In: GRUDZINKAS J.G.; YOVICH, J.L. (Eds.). *Gametes: the oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.376-395.
- ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.99, p.471-477, 1993.
- ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2., 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm, 2000. p.1729.
- AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol. of Reprod.*, v.50, p.103-110, 1994.¹
- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.53, p.258, 2000.
- ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochem. Biophys. Acta*, v.782, p.121-128, 1983.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.
 BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- BARIL, G.; TRALDI, A-L.; COGNIÉ, Y.; LEBOEUF, B.; CBECKERS, J.F.; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, v.56, p.299-305, 2001.
- BAUDOT A.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. *Cryobiology*, v.37, p.187-199, 1998.
- BRONSHTEYN, V.L.; STEPONKUS, P.L. Nucleation and growth of ice crystals in concentrated solutions of ethylene glycol. *Cryobiology*, v.32, p.1-22, 1995.
- CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. *Anim. Reprod. Sci.*, v.92, p.29-36, 2006.
- CHOI, T.; AOKI, F.; MORI, M. Activation of P34 cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycle in mouse oocytes and embryos. *Developmental*, v.113, p.789-795, 1991.
- CRAN, D.G. Cortical granules distribution during oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, suppl. 38, p.49-62, 1989.
- CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Programming the oocyte for fertilization. In: BAVISTER, B.D.; CUMMINS, J; ROLDAN E.R.S. (Eds.). *Fertilization in mammals*. Norwell: Sereno Symposia, 1990. p.241-251.
- CURI, P.R.; MORAES, R.V. Associação, homogeneidade e contrastes entre proporções em tabelas contendo distribuições multinomiais. *Ciênc. Cult.*, v.33, p.712-722, 1981.
- DHALI, A.; MANIK, R.S.; DAS, S.K.; SINGLA, S.K.; PLATA, P. Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethyleneglicol concentration and exposure time. *Anim. Reprod. Sci.*, v.63, p.159-165, 2000.
- DE BRUIJNE, A.W.; Van STEVENICK, J. Cytolysis of yeast cells, caused by dimethylsulfoxide. *Antonie van Leeuwenhoek* 35 (Suppl.: Yeast Symposium), 15-16, 1969.
- DEDIEU, T.; GALL, L.; CROZET, N. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol. Reprod. Dev.*, v.45, p.351-358, 1996.
- DIDION, B.A.; POMP, D.; MARTIN, M.J.; HOMANICS, G.E.; MARKERT, C.L. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.*, v.68, p.2803-2810, 1990.

- DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.; TAMARGO, C.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*, v.64, p.317-333, 2005.
- DINNYES, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; SOLT, L.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. In vitro survival of in vitro produced (IVP) bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*, v.43, p.197, 1995.
- DINNYÉS, A.; DAI, S.; JIANG, S.; YANG, X. Somatic cell nuclear transfer with vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology*, v.53, p.215, 2000.
- DINNYES, A., MENG, O., POLGAR, Z., BOONKSOL, D., SOMFAI, T. Criopreservação de embriões mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*. Supl. 1, p.171-190, 2006.
- DONNAY, I.; AUQUIER, PH.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLD, P.; MASSIP, A. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.*, v.52, p.93-104, 1998.
- DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v.57, p.285-302, 2002.
- DURANTHON, V.; RENARD, J.P. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, v.55, p.1277-1289, 2001.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*, v.23, p.1-13, 1986.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotetant toxicity and cryoprotetant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v.27, p.247-268, 1990.
- FISCHER, L.D.; BELLE, G.V. *Biostatistics: a methodology for the Health Sciences*. New York: Wiley-Interscience.1993. 991p.
- FRENCH, A.J.; HALL, V.J.; KORFIATS, N.A.; RUDDOCK, N.T.; VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O. Viability of cloned bovine embryos following OPS vitrification. In: ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO

TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguassu. *Proceedings...* Foz do Iguassu, 2002. p.413.

FUKU, E.; LUI J.; DOWNEY, B.R. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol. Reprod. Devel.*, v.40, p.177-185, 1995a.

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

FUKUI, Y.; LEE, E.S.; ARAKI, N. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on developmental to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.2752-2758, 1995.

FULKA, Jr. J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.*, v.4, p.41-49, 1998.

GEKKO, K.; TIMASHEFF, S.N. Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, v.20, p.4667-4676, 1981.

GOUDET, G.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; GERARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol. Reprod.*, v.57, p.232-245, 1997.

HALL, S.M.; EVANS, J.; HAWORTH, S.G. Influence of cold preservation on the cytoskeleton of cultured pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, v.9, p.106-114, 1993.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.60, p.247-252, 1980.

HAMANO, S.; KUWAYAMA, M. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation by vitrification and in vitro fertilization. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 1992, The Hague. *Proceedings... The Hague*, 1992. p.1421-1423.

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.*, v.126, p.242-252, 1988.

HASLER, J.F., HURTGEN, P.J., JIN, Z.Q., STOKES, J.E. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, v.46, p.563-579, 1997.

- HOCHI, S.; KOZAWA, M.; FUJIMOTO, T.; HONDO, E.; YAMADA, J.; OGURI, N. In vitro maturation and transmission electron microscope observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology*, v.33, p.300-310, 1996.
- HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. *Cryobiology*, v.41, p.69-73, 2001.
- HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.*, v.55, p.161-168, 1996.
- HURTT, A.E.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SEIDEL, JR. 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.
- HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v. 38, p. 35-47, 1989.
- IM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectant, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v.47, p.881-891, 1997.
- ISACHENKO, V.; SOLER, C.; ISACHENKO, E. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*, v.36, p.250-253, 1998.
- IWASAKI, S., YOSIBA, N., USHIJIMA, H., WATANABE, S., NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J.Reprod. Fertil.*, v.90, p.279-284, 1990.
- JELINKOVA, L.; KUBELBA, M.; MOTLIK, J.; GUERRIER, P. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbit oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.37, p.210-215, 1994.
- JOHNSON, M.H.; PICKERING, S.J. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development*, v.100, p.313-324, 1987.
- JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. *Cryobiology*, v.21, p.192-199, 1984.

- KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.67-75, 1996.
- KENNEDY JR., G.L. Biological effects of acetamide, formamide, and their monomethyl and dimethyl derivatives. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, v.9, p.129-182, 1986.
- KUWAYAMA, M.; HAMANO, S.; NAGAI, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, v.96, p.187-193, 1992.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C. Efeito da maturação nuclear, ultra-estrutura e fertilização xenogênica de ovócitos eqüinos maturados *in vitro*. 2002. 180 f. Tese de Livre docência junto a Disciplina de Obstetrícia Veterinária do Departamento de Reprodução animal e Radiologia Veterinária da F.M.V.Z. – UNESP, Botucatu, 2002.
- LAZAR, L.; SPAK, J.; DÁVID, V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straws method. *Theriogenology*, v.54, p.571-578, 2000.
- LEE, M.; NURSE, P. Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells. *Trends Genet.*, v.10, p.287-290, 1988.
- LeGAL, F.; GASQUI, P.; RENARD, J. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model. *Cryobiology*, v.31, p.154-170, 1994.
- LEIBO, S.B. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: CIBA FOUNDATION. *The freezing of mamalian embryos*. Amsterdam, 1977. p.69-96. (Symposium, 52).
- LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; PLLARD, J.W. Stage-dependent sensivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.*, v.42, p.45-53, 1996.
- LEHN-JENSEN, H. Deep freezing of cattle embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10. 1984, Illinois. *Proceedings...* Illinois, 1984. p.1-12.
- LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1671-1680, 2002.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following IVM and fertilization. *Theriogenology*, v.35, p.1225-1235, 1991.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes after cryopreservation by vitrification and in vitro fertilization. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague, 1992. p.1421-1423.

LONG, C.R.; DAMIANI, P.; PINTO-CORREIA, C.; MacLEAN, R.A.; DUBY, R.T.; ROBL, J.M. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.*, v.102, p.361-369, 1994.

MAGNUSSOM, V. *Criopreservação de ovócitos bovinos pela vitrificação*. 2002. 43p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MAHMOUDZADEH, A.R.; SAN SOOM, A.; BOLLS, P.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J. Reprod. Fertil.*, v.103, p.33-39, 1995.

MARKKULA, M., RATY, M., JAUHAINEN, L., PARANKO, J., RAULA, J., MAKAREVICH, A. Ratio of proliferating cell nuclear antigen-positive nuclei to total cell number is higher in day 7 than in day 8 vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v.65, p.52-59, 2001.

MARTINEZ, A.G., MATOS, D.G.D., FURNUS, D.C., BROGLIATTI, G.M. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.50, p.757-767, 1998.

MARTINO, A.; POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.*, v.45, p.503-512, 1996a.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, v.54, p.1059-1069, 1996b.

- MASSIP, A.; Van Der ZWALMAN, B.; SCHEFFEN, F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Lett.*, v.7, p.270-273, 1986.
- MASUI, Y.; MARKERT, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, v.177, p.129-146, 1971.
- MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, v.55, p.911-922, 2001.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v.199, p.939-949, 1970.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 9. 1980, Madrid. *Proceedings...* Madrid, 1980. p.99-114.
- McGANN, L.E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. *Cryobiology*, v.15, p.382-390, 1978.
- McGAUGHEY, R.W.; RACOWSKY, C.; RIDER, V.; BALDWIN, K.; DeMARAIS, WEBSTER, S.D. Ultrastructural correlates of meiotic maturation in mammalian oocytes. *J. Electron. Microsc. Tech.*, v.16, p.257-280, 1990.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes caused by cryopreservation. In: ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguassu. *Proceedings...* Foz do Iguassu, 2002. p.471.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J.; RUTLEDGE, J.J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology*, v.47, p.73-81, 2003.
- MEN, H.; AGCA, Y.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology*, v.64, p.1340-1349, 2005.
- MERYMAN, H.T. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, v.3, p.341-363, 1974.

MERYMAN, H.R.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M.S.J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, v.14, p.287-302, 1977.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; BARBIERI, D.P.; MACHADO, M.F.; THALER, NETO, A.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. In: ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguassu. *Proceedings...* Foz do Iguassu, 2002. p.472.

MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, S.E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethyleneglicol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, v.40, p.121-124, 1993.

MOTLIK, A.W.; KUBELKA, M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.27, p.366-375, 1990.

MUCCI, N., ALLER, J., KAISER, G.G., HOZBOR, F., CABODEVILA, J., ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v.65, p.1551-1562, 2006.

MURRAY, A.W. The cell cycle as a cdc2 cycle. *Nature*, v.342, p.14-15, 1989.

MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. Domineos and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, v.246, p.614-621, 1989.

NAGASHIMA, H., KASHIWAZAKI, N., ASHMAN R.J., GRUPEN, C.G., SEAMARK, R.F., NOTTLE, M.B. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.*, v. 51, p.618-622, 1994.

NAITO, K.; TOYODA, Y. Fluctuation of histone H1 kinase activity during meiotic maturation in porcine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, v.93, p.467-473, 1991.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, v.344, p.503-508, 1990.

OBERSTEIN, N.; O'DONOVAN, M.K.; BRUEMMER, J.E.; SEIDEL JR., G.E.; CARNEVALE, E.M. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, v.55, p.607-613, 2001.

- O'NEIL, L.; PAYNTER, S.; FULLER, B.; SHAW, R. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology*, v.34, p.295-301, 1997.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. *Cryobiology*, v.32, p.455-460, 1995.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Criopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, v.14, p.127-149, 1996.
- PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1131-1141, 2005.
- PARKS, J.E.; RUFFING, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.59-73, 1992.
- PARKS, S.E.; SON, W.Y.; LEE, S.H.; KO, J.J.; CHA, K.Y. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.*, 68, p.920-926, 1997.
- PICKETT, B.W. *Principles of cryopreservation. Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings*. Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986. p.4.
- PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.W.; VAN DEMARK, N.L.; LODGE, J.R.; FREEMAN, W.H. (Eds.). *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. 2. ed. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1978. p.231-248.
- PUGH, P.A., ANKERSMIT, A.E.L., MCGOWAN, L.T., TERVIT, H.R. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, v.50, p.495-506, 1998.
- RALL, W.F.; FAHY, G.M. Vitrification: a new approach to embryo cryopreservation. *Theriogenology*, v.23, p.320, 1985.
- RAMMLER, D.H. The effect of DMSO on several enzymes systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.141, p.291-299, 1967.
- RAYOS, A.A.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with saccharose or trehalose. *J. Reprod. Fertil.*, v.100, p.123-129, 1994.

- REBOULLEAU, C.P.; SHAPIRO, H.S. Chemical inducers of differentiation cause conformational changes in the chromatin and desoxyribo-nucleic acid of murine erythroleukemia cells. *Biochemistry*, v.22, p.4512-4517, 1983.
- RENARD, J.P.; PRULIERE, G. Effects of organics solvents on the cytoskeleton of mammalian oocytes and embryos: implications for the cryopreservation of cells. *Cryobiology*, v.25, p.583-584, 1988.
- RHO, G.J.; KIM, S.; YOO, J.G.; BALASUBRAMANIAN, S.; LEE, H.J.; CHOE, S.Y. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.64, p.464-470, 2002.
- RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, v.56, p.1-16, 2001.
- RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., PEREZ-GARNELO, S., FUENTE, J.D.L., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development. Cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, v.68, p. 236-243, 2003.
- ROBINSON, J.; ENGELBORGHIS, Y. Tubulin polymerization in dimethyl sulfoxide. *J. Biol. Chem.*, v.257, p. 5367-5371, 1982.
- SAUNDERS, K.M.; PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rates of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.61, p.178-187, 1999.
- SEIDEL JR., G.E. *Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings.* Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986. p.6.
- SEIDEL JR., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.228-235, 2006.
- SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., GUSTAFFSON, H., GUSTARI, S., BARTOLOME, J., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vivo* produced bovine embryos. International Congress on Animal Reproduction, v.3, p.1333-1335, 1992.
- SHAW, J.M.; KULESHOVA, L.L.; MacFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing Ficoll, PVP, or dextran. *Cryobiology*, v.35, p.219-229, 1997.

- SIQUEIRA-PYLES, E.S.C. Vitriificação de ovócitos bovinos: efeito do método e do estágio de maturação sobre o desenvolvimento embrionário. 2002. 99p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.
- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, v.38, p.95-105, 1999.
- STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Frozen and alive. *Sci. Am.*,v.263, p.62-67, 1990.
- SZELL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.78, p.699-703, 1986.
- TAIEB, F.; THIBIER, C.; JESSUS, C. On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, v.48, p.396-411, 1997.
- THIBAUT, C.; GERARD, M.; MENEZO, Y. Acquisition par l'oocyte de lapine et de veau du facteur de decondensation do noyal do spermatozoide fecondant (MPPGH). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, v.15, p.705-714, 1975.
- TODOROV, I.; BERNARD, A.G.; McGRATH, J.J.; FULLER, B.J.; SHAW, R.W. Studies on 2,3 butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: use of sacrose to avoid damage during exposure or removal. *Cryo-Lett.*, v.14, p.37-42, 1993.
- VAJTA, G. Oocyte and embryo vitrification. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.*, p.45-48, 2000.
- VAJTA, G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo Transfer Newslett.*, v.15, p.12-18, 1997a.
- VAJTA, G. *Bovine in vitro embryo production, biopsy and cryopreservation* Copenhagen, Denmark, 1997. 77p. Tese (PhD in Reproduction) - Royal Veterinary and Agricultural University. 1997b.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified in vitro produced bovine blastocysts. *Vet. Rec.*, v.137, p.672, 1995.
- VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Lett.*, v.18, p.191-195, 1997a.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to

reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.53-58, 1997b.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Devel.*, v.51, p.53-58, 1998a.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. *Theriogenology*, v.49, p.176, 1998b.

VAN DER ELST, J.; VAN DEN ABBEEL, R.J.; WISSE, E.; VAN STEIRTEGHEM, A. Effect of 1,2 propanediol and dimethylsulfoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum. Reprod.*, v.3, p.960-967, 1988.

VAN SOOM, A., VAN VLAENDEREN, I., MAHMOUDZADEH, A.R., DELUYKER, H., KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, v. 38, p.905-919, 1992.

VIEIRA, A.D.; RUBIN, M.I.B.; LEHMKUHL, R.C.; BARBIERI, D.P.; MEZZALIRA, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes treated with cytochalasin D and vitrified in OPS. In: ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 10, 2002, Foz do Iguassu. *Proceedings...* Foz do Iguassu, 2002. p.488.

VINCENT, C.; HEYMAN, Y.; GARNIER, V.; RENARD, J.P. Cryopreservation of ovulated rabbit oocytes: cryoprotectant effect on microfilament and microtubule organization. In vivo survival after freezing. *Cryobiology*, v.25, p.563, 1988.

VINCENT, C.; PRULIERE, G.; PAJOT-AUGY, E. Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology*, v.27, p.9-23, 1990.

VOGELSANG, M.M.; KRAEMER, D.C.; POTTER, G.D.; STOTT, G.C. Fine structure of the follicular oocyte of the horse. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.35, p.157-167, 1987.

WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W.B.; YANG, X. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.56, p.253-259, 1997.

XU, K.P.; GREVE, T.; SMITH, S.; HYTTEL, P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.27, p.505-519, 1986.

ANEXOS**ANEXO A – HM – Meio de manutenção.**

MEIO DE MANUTENÇÃO (HM)	10ml
H-TCM 199	8,0ml
SFB	2,0ml

ANEXO B – SM – Solução de sacarose a 0,5M.

Sacarose dissolvida em TCM199 e suplementada com 20% SFB.

Nosso procedimento na rotina: 17,115g de sacarose, 40ml TCM199, aquecido a 40-45°C e misturado com barra magnética em um agitador, completar para 50ml com TCM199. Desprezar 10ml e adicionar 10ml de SFB e filtrar.

ANEXO C – HM + 0,25M sacarose.

SOLUÇÃO HM + 0,25M SACAROSE	1200µl
HM	800µl
SM	400µl

ANEXO D – HM + 0,15M sacarose.

SOLUÇÃO HM + 0,15M SACAROSE	1000µl
HM	800µl
SM	200µl

ANEXO E – Meio de maturação *in vitro* (MIV).

MEIO DE MATURAÇÃO (MIV)	10ml
TCM 199 Bicarbonato	9,0ml
SFB	1,0ml
Piruvato Stock (0,110g piruvato/10ml salina)	20µl
FSH (1 frasco Folltropin®500UI/31ml TCM 199)	10µl
LH (0,005g Profasi® 5000UI/ml TCM 199)	100µl
Filtragem	
Estradiol (0,010g estradiol/1ml etanol)	1µl/ml
Gentamicina (0,150g gentamicina/10ml H ₂ O)	50µl

ANEXO F – “Swim up”

“SWIM UP”	10ml
HTF	10ml
BSA livre de ácidos graxos	0,05g
Cafeína	0,005g
Filtragem	
Gentamicina (0,150g gentamicina/10ml H ₂ O)	50µl

ANEXO G – Meio de fertilização *in vitro* (FIV).

MEIO FIV	10ml
HTF	10ml
BSA livre de ácidos graxos	0,05g
Cafeína	0,005g
Heparina Stock (1mg heparina/1ml HTF)	100µl
PHE	440µl
Gentamicina (0,150g gentamicina/10ml H ₂ O)	50µl

Solução a: 0,003g Penicilamina (2µM)/10ml salina

Solução b: 0,0011g Hipotaurina (1µM)/10ml salina

Solução c: 0,0018g Epinefrina (0,25 μ M)/40ml solução d

Solução d: 0,165g Na Lactato 60%/0,050g Metabissulfeto Na/50ml H₂O

PHE:	Solução a	2,5ml
	Solução b	2,5ml
	Solução c	2,0ml
	Salina 0,9%	4,0ml

ANEXO H – Meio de cultivo *in vitro* (CIV).

MEIO DE CULTIVO (CIV)	10ml
HTF	9,0ml
SFB	1,0ml
Myo Inositol	0,010g
Filtragem	
Gentamicina (0,150g gentamicina/10ml H ₂ O)	50 μ l

ANEXO I – Solução de Bloqueio.

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO	100μl
PBS	100 μ l
BSA (1mg/mL)	0,1g
Glicina (100mM)	0,7507g
Azida de sódio (0,2%)	0,2g
SFB (20%)	20ml

Anexo J: Taxas de clivagem de todos os grupos estudados nos Experimentos 1, 2 e 3, em 5 repetições.

GRUPO	REPETIÇÕES (%)					TOTAL
	1	2	3	4	5	
GC	36/50 (72)	48/60 (80)	52/60 (86,7)	48/62 (77,4)	51/63 (81)	235/295 (79,7)
1G0h	0/24 (0)	0/24 (0)	0/24 (0)	0/24 (0)	0/25 (0)	0/121 (0)
2G0h	0/28 (0)	0/27 (0)	0/28 (0)	0/27 (0)	0/28 (0)	0/138 (0)
3G0h	0/28 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)	0/27 (0)	0/27 (0)	0/138 (0)
1G6h	0/27 (0)	0/30 (0)	0/27 (0)	0/27 (0)	0/26 (0)	0/137 (0)
2G6h	0/28 (0)	0/29 (0)	0/27 (0)	0/29 (0)	0/28 (0)	0/141 (0)
3G6h	0/28 (0)	0/28 (0)	0/29 (0)	0/29 (0)	0/28 (0)	0/142 (0)
1G12h	2/30 (6,7)	3/28 (10,7)	2/26 (7,7)	2/27 (7,4)	1/26 (3,8)	10/137 (7,3)
2G12h	0/28 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/136 (0)
3G12h	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/127 (0)
1G22h	2/30 (6,7)	1/30 (3,3)	0/26 (0)	1/23 (4,3)	2/29 (6,9)	6/138 (4,3)
2G22h	0/26 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/130 (0)
3G22h	0/24 (0)	0/24 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0/130 (0)
1G0hexp	11/30 (36,7)	10/30 (33,3)	12/30 (40)	10/28 (35,7)	12/30 (40)	55/148 (37,2)
2G0hexp	8/30 (26,7)	9/30 (30)	12/29 (41,4)	9/30 (30)	11/30 (36,7)	49/149 (32,9)
3G0hexp	11/30 (36,7)	10/29 (34,5)	11/30 (36,7)	10/30 (33,3)	12/30 (40)	86/149 (57,7)
1G6hexp	10/19 (52,6)	15/30 (50)	13/30 (43,3)	16/30 (53,3)	15/30 (50)	69/139 (49,7)
2G6hexp	10/20 (50)	15/28 (53,6)	15/29 (51,7)	16/30 (53,3)	14/30 (46,7)	70/137 (51,1)
3G6hexp	10/19 (52,6)	17/30 (56,7)	14/30 (46,7)	17/30 (56,7)	14/28 (50)	72/137 (52,6)
1G12hexp	19/30 (63,3)	18/30 (60)	16/30 (53,3)	19/29 (65,5)	16/30 (53,3)	88/149 (51,1)
2G12hexp	20/30 (66,7)	17/28 (60,7)	18/30 (60)	19/30 (63,3)	17/30 (56,7)	91/148 (61,5)
3G12hexp	19/29 (65,5)	15/30 (50)	18/30 (60)	16/29 (55,2)	19/30 (63,3)	87/148 (58,8)
1G22hexp	14/19 (73,7)	22/30 (73,3)	20/28 (71,4)	21/32 (65,6)	25/35 (71,4)	102/144 (70,8)
2G22hexp	10/20 (50)	20/30 (66,7)	22/30 (73,3)	20/32 (62,5)	21/35 (60)	93/147 (63,3)
3G22hexp	16/21 (76,2)	18/30 (60)	20/29 (69)	23/32 (71,9)	23/35 (65,7)	100/147 (68)

Anexo K: Taxas de produção de blastocistos de todos os grupos estudados nos Experimentos 1, 2 e 3, em 5 repetições.

GRUPO	REPETIÇÕES (%)					TOTAL
	1	2	3	4	5	
GC	21/50 (42)	27/60 (45)	25/60 (41,7)	25/62 (40,3)	25/63 (39,7)	123/295 (42,1)
1G0h	0/24 (0)	0/24 (0)	0/24 (0)	0/24 (0)	0/25 (0)	0/121 (0)
2G0h	0/28 (0)	0/27 (0)	0/28 (0)	0/27 (0)	0/28 (0)	0/138 (0)
3G0h	0/28 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)	0/27 (0)	0/27 (0)	0/138 (0)
1G6h	0/27 (0)	0/30 (0)	0/27 (0)	0/27 (0)	0/26 (0)	0/137 (0)
2G6h	0/28 (0)	0/29 (0)	0/27 (0)	0/29 (0)	0/28 (0)	0/141 (0)
3G6h	0/28 (0)	0/28 (0)	0/29 (0)	0/29 (0)	0/28 (0)	0/142 (0)
1G12h	0/30 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0/27 (0)	0/26 (0)	0/137 (0)
2G12h	0/28 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/136 (0)
3G12h	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/26 (0)	0/26 (0)	0/127 (0)
1G22h	0/30 (0)	0/30 (0)	0/26 (0)	0/23 (0)	0/29 (0)	0/138 (0)
2G22h	0/26 (0)	0/26 (0)	0/28 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/130 (0)
3G22h	0/24 (0)	0/24 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)	0/26 (0)	0/130 (0)
1G0hexp	4/30 (13,3)	5/30 (16,7)	2/30 (6,7)	4/28 (14,3)	1/30 (3,3)	16/148 (10,8)
2G0hexp	3/30 (10)	2/30 (6,7)	2/29 (6,7)	5/30 (16,7)	2/30 (6,7)	14/149 (9,4)
3G0hexp	0/30 (0)	4/29 (13,8)	4/30 (13,3)	4/30 (13,3)	1/30 (3,3)	13/149 (8,7)
1G6hexp	2/19 (10,5)	6/30 (20)	2/30 (6,7)	4/30 (13,3)	2/30 (6,7)	16/139 (11,5)
2G6hexp	1/20 (5)	2/28 (7,1)	2/29 (6,9)	4/30 (13,3)	5/30 (16,7)	14/137 (10,2)
3G6hexp	1/19 (5,3)	5/30 (16,7)	3/30 (10)	3/30 (10)	3/28 (10,7)	15/137 (10,9)
1G12hexp	5/30 (16,7)	2/30 (6,7)	7/30 (23,3)	2/29 (6,9)	6/30 (20)	22/149 (14,8)
2G12hexp	2/30 (6,7)	3/28 (10,7)	5/30 (16,7)	4/30 (13,3)	5/30 (16,7)	19/148 (12,8)
3G12hexp	2/29 (6,9)	5/30 (16,7)	5/30 (20)	5/29 (17,2)	3/30 (10)	21/148 (14,2)
1G22hexp	4/19 (21,1)	5/30 (16,7)	6/28 (21,4)	7/32 (21,9)	5/35 (14,3)	27/144 (18,8)
2G22hexp	3/20 (15)	7/30 (23,3)	6/30 (20)	5/32 (15,6)	7/35 (20)	28/147 (19)
3G22hexp	4/21 (19)	7/30 (23,3)	6/29 (20,7)	6/32 (18,8)	8/35 (22,9)	31/147 (21,1)

