

LETÍCIA MARTINS FAGUNDES

**CONGELAÇÃO DE OVÓCITOS DESNUDADOS OU NÃO, MATUROS E
IMATUROS DE BOVINOS, UTILIZANDO O ETILENO GLICOL PELO
MÉTODO CONVENCIONAL**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

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

T

F156c
2002

Fagundes, Letícia Martins, 1975-

Congelação de ovócitos desnudados ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o etileno glicol pelo método convencional / Letícia Martins Fagundes. – Viçosa : UFV, 2002.
82p. : il.

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

1. Bovino - Oócito - Criopreservação. 2. Bovino - Oócito - Maturação. 3. Bovino - Fecundação *in vitro*. 4. Reprodução animal. 5. Biotecnologia animal. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 636.208262

CDD 20.ed. 636.208262

LETÍCIA MARTINS FAGUNDES

**CONGELAÇÃO DE OVÓCITOS DESNUDADOS OU NÃO, MATUROS E
IMATUROS DE BOVINOS, UTILIZANDO O ETILENO GLICOL PELO
MÉTODO CONVENCIONAL**

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

APROVADA: 12 de agosto de 2002

Prof. José Domingos Guimarães
(Conselheiro)

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Conselheiro)

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula

Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

A Deus,
Aos meus pais, Edson e Irdimar,
Aos meus irmãos, Aleksander e Nádia,
À minha avó Nair (*in memoriam*).

AGRADECIMENTO

A Deus, pela oportunidade de viver em Sua constante companhia, pela minha família e amigos, por me capacitar, fortalecer e possibilitar todas as conquistas em minha vida.

Aos meus pais, Edson e Irdimar, por apoiarem e acreditar, incansavelmente, em minha busca, por renunciarem a seus sonhos, em favor dos meus, por entenderem a distância, fazendo-se sempre presentes.

À minha irmã Nádia, pelo apoio, incentivo e paciência dispensada em vários dias “daqueles”.

Ao meu irmão Aleksander, por me ensinar a praticar a serenidade e o equilíbrio, e à sua esposa Simone, pela amizade e apoio.

À avó Nair (*in memoriam*) que, da maneira mais triste, ensinou-me a ser forte e superar os momentos difíceis.

À avó Ilka e a meus tios, tias, primos, primas e amigos pelo aconchego, orações e por serem junto aos meus pais e irmãos a presença de Deus em minha vida.

Ao Dr. Wanderlei Ferreira de Sá, Dr. Ademir Moraes de Carvalho e Luís Sérgio Camargo Campos, pesquisadores da EMBRAPA-CNPGL, pela oportunidade e pelo incentivo à iniciação na carreira científica.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), particularmente aos setores de Transporte e de Vigilância, por possibilitarem a viabilização deste trabalho.

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa, por ter-me orientado com paciência e dedicação, pela credibilidade, amizade e confiança.

À banca examinadora, especialmente aos meus conselheiros, pelas valiosas críticas e sugestões durante a realização deste trabalho.

Ao professor José Domingos, pelo apoio, atenção e incentivo.

Ao José Cândido (Seu Nenzinho), pelos ensinamentos de vida e por sua alegria contagiante.

Ao Kleber, ao Nilo e funcionários do matadouro de Ubá (CINDUCAR), pela colaboração na obtenção dos ovários.

Aos estagiários do Laboratório de Reprodução Animal, pelo auxílio e participação em cada etapa do trabalho, e aos colegas de mestrado, Aline, Daniel, Leonardo, Luciano, Luís Gustavo, Moacir, Trícia e Waldma, pela convivência agradável.

À Jeanne, Juliana, Marilú e Thiago pelo apoio, pelo carinho e incentivo, que me ajudaram a superar as dificuldades e obstáculos encontrados durante o experimento.

À Janete, Mariana, Mírian e Sílvia, pelo excelente convívio, pelo apoio, pela compreensão e amizade nos momentos tristes e alegres.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional e para a realização deste trabalho.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que ele estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sono uma ponte,
da procura um encontro.”

Fernando Sabino

BIOGRAFIA

LETÍCIA MARTINS FAGUNDES, filha de Edson de Souza Fagundes e Irdimar Pires Martins Fagundes, nasceu em 28 de novembro de 1975, em Conselheiro Pena - Minas Gerais.

Em março de 2000, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, em Juiz de Fora - Minas Gerais.

Em agosto de 2000, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Considerações sobre os ovócitos de mamíferos.....	4
2.2. Princípios de criopreservação.....	7
2.2.1. Métodos de criopreservação.....	7
2.2.2. Crioprotetores.....	11
2.3. Considerações sobre o estágio de maturação do ovócito e a presença das células do <i>cumulus oophorus</i> aderidas ao ovócito no momento da criopreservação.....	12
2.3.1. Importância do estágio de maturação do ovócito.....	12
2.3.2. Importância das células do <i>cumulus oophorus</i>	17
2.4. Alterações celulares decorrentes do processo de criopreservação.....	18
2.4.1. Efeitos da temperatura.....	18
2.4.2. Efeitos dos crioprotetores.....	22
2.5. Estratégias para reduzir as injúrias causadas pelo processo de criopreservação.....	25
2.6. Recuperação dos ovócitos após a descongelação e reidratação.....	28
2.7. Efeitos do processo de criopreservação sobre a morfologia dos ovócitos.....	29
2.8. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos.....	32
2.9. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a fecundação <i>in vitro</i>	33
2.10. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos.....	37
3.2. Tratamentos.....	38

3.3. Desidratação e congelamento dos ovócitos.....	41
3.4. Descongelamento, reidratação e recuperação dos ovócitos.....	42
3.5. Classificação e incidência de alterações morfológicas ocorridas nos ovócitos submetidos ao processo de criopreservação.....	43
3.6. Avaliação da citotoxicidade do etileno glicol.....	44
3.7. Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	44
3.8. Preparo do sêmen e fecundação <i>in vitro</i>	45
3.9. Cultivo dos zigotos e avaliação do desenvolvimento embrionário.....	46
3.10. Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Recuperação dos ovócitos após descongelamento e reidratação.....	47
4.2. Efeitos do processo de congelamento utilizando o EG pelo método convencional sobre a morfologia dos ovócitos.....	49
4.3. Efeitos do processo de congelamento utilizando o EG pelo método convencional sobre a maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos	56
4.4. Efeitos do processo de congelamento utilizando o EG pelo método convencional sobre a fecundação <i>in vitro</i>	65
4.5. Efeitos do processo de congelamento pelo método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário.....	68
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Números e percentagens de ovócitos congelados imaturos e maturados <i>in vitro</i> , com <i>cumulus oophorus</i> ou desnudados, recuperados após descongelação e reidratação.....	48
Tabela 2- Influência do estágio de maturação nuclear e presença de células do <i>cumulus oophorus</i> aderidas ao ovócito no momento da congelação sobre a viabilidade morfológica destes ovócitos após a descongelação e reidratação.....	50
Tabela 3- Frequência de cada anormalidade em relação ao total de anormalidades ocorridas em cada tratamento.....	55
Tabela 4- Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a maturação <i>in vitro</i> dos ovócitos com <i>cumulus oophorus</i> (T ₃) ou desnudados (T ₄).....	57
Tabela 5- Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a fecundação <i>in vitro</i>	66
Tabela 6- Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma dos tratamentos.....	39
Figura 2 - Representação esquemática do envasamento de ovócitos.....	41
Figura 3 - Ovócito desnudo fresco (T_2) em metáfase II (1000X).....	64
Figura 4 - COC congelado imaturo (T_3) em metáfase II (1000X).....	64
Figura 5 - COC congelado imaturo (T_3) apresentando cromatina condensada (CC) (1000X).....	64
Figura 6 - Ovócito desnudo congelado imaturo (T_4) apresentando cromatina condensada (CC) (1000X).....	64
Figura 7 - Ovócito desnudo congelado imaturo (T_4) sem configuração cromossômica (1000X).....	64
Figura 8 - Ovócito recém-selecionado, apresentando configuração cromossômica em prófase I (1000X).....	64

RESUMO

FAGUNDES, Letícia Martins, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2002. **“Congelação de ovócitos desnudados ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o etileno glicol pelo método convencional”**. Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Conselheiros: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

Este estudo objetivou avaliar os efeitos da criopreservação pelo método convencional em ovócitos imaturos e maturados *in vitro*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal - DVT-UFV, utilizando-se ovócitos provenientes de ovários de vacas abatidas em matadouro e distribuídos aleatoriamente em seis tratamentos. Tratamento 1 (T₁): ovócitos não congelados (frescos) providos de células do *cumulus oophorus* (COC), os quais foram imediatamente submetidos à MIV, FIV e CIV. Tratamento 2 (T₂): ovócitos não congelados (frescos) e desprovidos de células do *cumulus oophorus* (desnudados), os quais foram imediatamente submetidos ao MIV, FIV e CIV. Tratamento 3 (T₃): ovócitos imaturos, providos de células do *cumulus oophorus*, submetidos à criopreservação imediatamente após a seleção. Posteriormente, esses ovócitos foram descongelados e aqueles considerados normais foram submetidos à MIV, FIV e CIV. Tratamento 4 (T₄): ovócitos desnudados e submetidos à criopreservação. Posteriormente, foram descongelados e aqueles considerados normais foram submetidos à MIV, FIV e CIV. Tratamento 5 (T₅): ovócitos providos de células do *cumulus oophorus*, maturados *in vitro* e, em seguida, congelados. Posteriormente, foram descongelados e aqueles considerados normais foram submetidos ao recultivo

em meio de maturação por duas horas e, então, submetidos à FIV e CIV. Tratamento 6 (T₆): ovócitos desnudos, maturados *in vitro* e, posteriormente, submetidos a criopreservação. Após a descongelação, os considerados normais foram submetidos ao recultivo por duas horas seguido de FIV e CIV. A congelação dos ovócitos dos tratamentos 3, 4, 5 e 6 foi realizada em solução contendo 1,8 mol L⁻¹ de etileno glicol (EG) em Talp-Hepes (meio base) acrescido de 0,4% de BSA-V, utilizando-se o método convencional. Os ovócitos foram desidratados por imersão em três soluções (etapas), contendo concentrações crescentes do crioprotetor, (0,6; 1,2 e 1,8 mol L⁻¹ de EG) sendo o tempo de permanência máxima de cinco minutos em cada etapa, em temperatura ambiente. A descongelação foi realizada por imersão em banho-Maria a 30°C por 20 segundos. Posteriormente, os ovócitos foram reidratados em três etapas (0,9 mol L⁻¹ de EG + 0,3 mol L⁻¹ de sacarose; 0,3 mol L⁻¹ de sacarose, e sem EG e sem sacarose), com duração de seis minutos cada uma. Após a descongelação foram recuperados 92,6, 97,5, 96,6 e 93,2%, dos ovócitos dos tratamentos 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Em relação aos ovócitos recuperados, verificou-se uma taxa de citoplasma retraído de 3,3; 0,8; 0,3 e 6,2% e perda de conteúdo celular de 2,2; 13,1; 3,8 e 16,1%, também para os tratamentos 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Os ovócitos congelados imaturos apresentaram taxa de maturação de 9,2 e 5,8% (tratamentos 3 e 4, respectivamente), resultados estes bem inferiores aos obtidos para os ovócitos frescos, sendo 82,5 (T₁) e 75,4% (T₂). Foram encontradas taxas de fecundação de 56,2; 0,0; 38,7; 8,6; 63,6 e 16,7% e de clivagem de 36,3; 7,9; 0,4; 0,0; 0,0 e 0,0%, para os tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Somente os ovócitos não congelados e não desnudados (T₁) apresentaram desenvolvimento para mórulas e blastocistos (34,5%), após a fecundação. Estes resultados indicam que o protocolo de congelação adotado comprometeu a viabilidade do ovócito.

ABSTRACT

FAGUNDES, Letícia Martins, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2002.

Freezing of either naked and no-naked, matured and immature oocytes from cows, using the ethylene glycol by the conventional method. Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Committee members: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

This study aimed at the evaluation of the effects from cryopreservation on the *in vitro* matured and immature oocytes, using the conventional method. The experiment was carried out in the Animal Reproduction Laboratory - DVT-UFV, by using oocytes from cows' ovaries from slaughterhouse, which were distributed into six treatments. Treatment 1 (T₁): non-frozen oocytes (fresh ones) provided with the *cumulus oophorus* cells (COC) which were immediately submitted to the processes MIV, FIV and CIV. Treatment 2 (T₂): non-frozen oocytes (fresh ones), deprived unprovided of the *cumulus oophorus* cells (naked), which were immediately submitted to MIV, FIV and CIV. Treatment 3 (T₃): immature oocytes provided with the *cumulus oophorus* cells, which were submitted to cryopreservation just after selection. Later, they were thawed and those considered as normal ones were submitted to MIV, FIV and CIV. Treatment 4 (T₄): naked oocytes submitted to cryopreservation. Later, they were thawed and those considered as normal ones were submitted to MIV, FIV and CIV. Treatment 5 (T₅): oocytes provided with the *cumulus oophorus* cells, matured *in vitro*, and then they were frozen. Later, they

were thawed and those considered as normal ones were submitted to recultivation for 2 hours in a maturation medium, and then submitted to FIV and CIV. Treatment 6 (T₆): naked, *in vitro* matured oocytes which were submitted to cryopreservation. After thawing, those oocytes which were considered as normal ones were submitted to recultivation for 2 hours, and then to FIV and CIV. Those oocytes of the treatments 3, 4, 5 and 6 were frozen in a solution containing 1.8 mol L⁻¹ ethylene glycol (EG) in Talp-Hepes (base medium) added with 0.4% BSA-V by the conventional method. The oocytes were dehydrated by immersion into three solutions (phases) at increasing concentrations of the cryoprotector, (0.6; 1.2 and 1.8 mol L⁻¹ of EG) during a maximum permanence time of five minutes for each phase, at environmental temperature. Thawing was accomplished by immersion into water bath at 30°C for 20 seconds. Later, the oocytes were rehydrated at three stages, that is, 0.9 mol L⁻¹ EG + 0.3 mol L⁻¹ sucrose, 0.3 mol L⁻¹ sucrose, and without both EG and sucrose for six minutes each one. After thawing, the oocytes' recovery rates were 92.6, 97.5, 96.6 and 93.2% for the treatments 3, 4, 5 and 6, respectively. In relation to the recovered oocytes, the following were also found: a cytoplasm withdrawal rate of 3.3, 0.8, 0.3 and 6.2%, and a cellular content loss of 2.2, 13.1, 3.8 and 16.1%, also for treatments 3, 4, 5 and 6, respectively. The frozen immature oocytes presented a maturation rate of 9.2 and 5.8% (treatments 3 and 4, respectively); these results were much inferior to those obtained by the fresh oocytes, that is, 82.5 (T₁) and 75.4% (T₂). The fecundation rates were 56.2, 0.0, 38.7, 8.6, 63.6 and 16.7%, while the cleavage rates were 36.3, 7.9, 0.4, 0.0, 0.0, and 0.0% for treatments 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively. Only the unfrozen and no-naked oocytes (T₁) exhibited development of morula and blastocyst (34.5%), after fecundation. These results point out that the adopted freezing protocols affected the viability of the oocytes.

1. INTRODUÇÃO

A busca por animais geneticamente superiores, com alta eficiência reprodutiva e alta produtividade, leva ao desenvolvimento de várias pesquisas com gametas, usando-se avançadas biotecnologias. Quanto ao gameta masculino, o domínio da tecnologia de congelamento de sêmen viabilizou a inseminação artificial, o que proporcionou rápido aprimoramento genético das espécies domésticas destinadas à produção, especialmente em rebanhos bovinos. Entretanto, métodos reprodutivos tais como a fecundação *in vitro* (FIV), a transferência de embrião, a transgenia e clonagem têm impacto limitado devido à falta de ovócitos fertilizáveis.

O sucesso da FIV requer o aproveitamento adequado de gametas femininos. Devido ao tempo limitado, durante o qual o ovócito permanece viável, a técnica de conservação de ovócitos pode proporcionar grande facilidade para o uso deste gameta em pesquisas, bem como em aplicações comerciais.

Atualmente, a criopreservação de ovócitos é a técnica mais promissora para estocagem de células germinativas femininas (ARAV et al., 1996), pois, aliada à criopreservação de embriões torna-se uma ferramenta útil à interrupção e controle dos ciclos reprodutivos, uma vez que detém o processo biológico e submete a célula a um estado de animação suspensa (RALL, 1992).

ZERON et al. (1999) argumentam que a eficiência da aspiração de ovócitos *in vivo*, por meio de ultra-sonografia transvaginal em vacas de elevado valor genético, poderia ser substancialmente aumentada, se os ovócitos fossem adequadamente criopreservados. Assim, o aumento do número de descendentes, por animal, pode contribuir para melhor exploração e comercialização de material de linhagens geneticamente superiores, além de superar o problema de assincronia entre doadora e receptora. A criopreservação do ovócito permite o estabelecimento de um banco de ovócitos destinado a preservar os recursos genéticos de espécies em risco de extinção (LIM et al., 1999; LEDDA et al. 2001). A disponibilidade de ovócitos bovinos viáveis após serem criopreservados permitiria maior flexibilidade em experimentos que necessitem do uso simultâneo de grande número de ovócitos (SONGSASEN et al., 2002) aumentando a viabilidade de materiais para pesquisa básica (OTOI et al., 1997) e para os procedimentos da FIV (SAUNDERS & PARKS, 1999; ARAV et al., 1996).

Entretanto, os resultados obtidos a partir da criopreservação de ovócitos são, geralmente, insatisfatórios quanto à quantidade e qualidade de embriões viáveis, obtidos após a descongelação e fecundação *in vitro*. Contribui, para este insucesso, a falta de compreensão tanto sobre as características físicas, químicas e biológicas dos ovócitos quanto sobre os efeitos nocivos causados pelo crioprotetor.

Vários esforços têm sido empregados na tentativa de obter ovócitos de boa qualidade para atender à demanda e proporcionar a realização adequada dos procedimentos anteriormente citados. Num esforço para contornar os danos causados aos ovócitos, durante a criopreservação, os pesquisadores vêm estudando a melhor maneira de congelar esta célula, considerando as características morfológicas e biofísicas que podem influenciar sua congelabilidade e viabilidade após a descongelação. Entretanto, torna-se evidente que características específicas dos ovócitos de algumas espécies e, ou diferentes

estádios do ciclo celular deste gameta (imaturo e maturado) possuem algum fator diferencial, que dificulta a sua criopreservação.

O objetivo deste trabalho foi verificar, por meio da avaliação dos efeitos da criopreservação utilizando o etileno glicol (EG) pelo método convencional, se o estágio do ciclo celular (imaturo ou maturado) de ovócitos bovinos e a presença ou não de células do *cumulus oophorus* aderidas aos ovócitos interferem na congelabilidade e subsequente maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de ovócitos e na clivagem e desenvolvimento embrionário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma combinação de fatores – métodos de congelação e descongelação, tipo e concentração do crioprotetor, estágio do ciclo celular e a presença ou não de células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito – determinam o sucesso da criopreservação do gameta feminino. Assim, noções básicas sobre cada um destes fatores contribuem para a obtenção de resultados satisfatórios.

2.1. Considerações sobre os ovócitos de mamíferos

Logo após o nascimento, os ovócitos de mamíferos estão no estágio de dictióteno da prófase I e nele permanecem por um período de repouso até a ocorrência da maturação, que consiste na progressão do ciclo celular meiótico de prófase I para metáfase II e extrusão do primeiro corpúsculo polar induzida por hormônio. A suspensão em meiose é, comumente, explicada em termos de ativação e inativação de proteínas de controle do ciclo celular, particularmente p34^{cdc2}. Os ovócitos necessitam da ativação de p34^{cdc2} para entrar em metáfase meiótica e da inativação de p34^{cdc2} para prosseguir para a anáfase no próximo ciclo celular; portanto, a detenção em metáfase II é devida à transcrição de *c-mos* no ovócito maduro (CHA & CHIAN, 1998).

Ambos estádios do ciclo celular do ovócito, imaturos e maturados, apresentam características singulares que refletem sua organização nuclear e citoplasmática. Em ovócito detido em dictióteno da prófase I, denominado estádio de vesícula germinal (VG), ou seja, imaturo, os cromossomos estão localizados dentro do núcleo e ligados à sua membrana (FABBRI et al., 1998). Os microtúbulos parecem ser restritos ao fuso meiótico, apresentando pouca evidência quanto à concentração de material pericentriolar (AMAN & PARKS, 1994), enquanto os poucos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) são encontrados perinuclearmente (SUZUKI et al., 1996). Em bovinos, as organelas estão posicionadas periféricamente, mas nas fases iniciais de maturação migram para o centro do citoplasma, indicando modulação espacial do metabolismo (HYTTEL et al., 1989).

Com o início da maturação e à medida que ocorre a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina, os centros organizadores de microtúbulos citoplasmáticos são recrutados do citoplasma, combinam com o material pericentriolar nuclear (MPC) e polimerizam microtúbulos em direção aos cromossomos condensados (VAN der ELST et al., 1992). O FSH promove a condensação cromossômica e formação dos pronúcleos, juntamente com a emissão do primeiro corpúsculo polar, sendo seu efeito mediado pela ação do estrógeno (WASSARMAN, 1988 citado por VIZCARRA, 2000). Durante a maturação do ovócito, o citoesqueleto controla determinados eventos importantes para a fecundação e subsequente desenvolvimento normal (HUNTER et al., 1991). Os microtúbulos definem a distribuição dos cromossomos e os microfilamentos controlam os movimentos citoplasmáticos (SATHANANTHAN et al., 1988). Alguns microtúbulos atravessam a extensão do fuso meiótico de pólo a pólo, enquanto outros estendem dos fusos dos pólos aos cromossomos que, então, encontram-se concentrados em um discreto feixe na placa metafásica.

Durante a maturação citoplasmática, ocorrem mudanças tais como a síntese de proteínas reguladoras, recolocação de organelas citoplasmáticas e alterações nos sistemas de transporte de membrana dos ovócitos (MOOR et al.,

1998). Embora a maturação do núcleo e do citoplasma possam ocorrer como processos independentes, a competência do desenvolvimento é conferida somente quando os dois processos estão intimamente sincronizados, sendo que os efeitos das aberrações citoplasmáticas são raramente expressas em estágios iniciais de clivagem de desenvolvimento, embora sendo mais freqüentemente associadas com blastulação e estádios pré-implantação (MOOR et al., 1998). Outro fator diferencial é a membrana plasmática. Segundo ARAV et al. (1996), os ovócitos maturados *in vitro* podem apresentar, em sua membrana plasmática, uma composição diferente de fosfolipídios ou uma maior concentração de colesterol.

As células do *cumulus oophorus* constituem uma subpopulação das células da granulosa, respondem a gonadotropinas e secretam várias substâncias que controlam a maturação nuclear e citoplasmática (CHA & CHIAN, 1998), e têm com função de promover a nutrição dos ovócitos durante seu crescimento, participar da formação da zona pelúcida e, após o surgimento de LH, sintetizar uma matriz composta por proteínas e ácido hialurônico a qual é importante no transporte do ovócito através da tuba uterina, bem como no encontro deste com o espermatozóide (BEDFORD & KIM, 1993). Segundo GUERRA e PETERS (1990), a intercomunicação entre ovócitos, células do *cumulus oophorus* e as células da granulosa ocorre através de locais de continuidade física, denominados junções “gap”, sendo que tais comunicações celulares participam do desenvolvimento do ovócito. Diferentemente do processo *in vivo*, em muitas espécies, a permanência de células do *cumulus oophorus* é benéfica à fecundação *in vitro*, seja para promover a capacitação espermática, seja para prevenir a poliespermia (VAJTA, 2000).

2.2. Princípios de criopreservação

2.2.1. Métodos de criopreservação

O primeiro protocolo efetivo de criopreservação de células de mamíferos foi estabelecido há mais de 60 anos e, desde então, considerável progresso tem sido obtido (SHAW et al., 2000).

A criopreservação com estocagem a temperaturas muito baixas, em nitrogênio líquido, é desejável por razões biológicas e comerciais (SHAW et al., 2000), considerando-se que o princípio do resfriamento consiste em diminuir a taxa metabólica e permitir a estocagem e transporte do ovócito (ZERON et al., 1999). Entretanto, a maioria das células não sobrevive, quando exposta a essas temperaturas, a menos que sejam colocadas em soluções que as protejam, além de serem resfriadas e aquecidas mediante taxas específicas (SHAW et al., 2000).

A criopreservação envolve inúmeras variáveis. Os protocolos de criopreservação são classificados como lentos ou rápidos, de acordo com a taxa de resfriamento, o tipo e a concentração dos crioprotetores usados. Entretanto, o princípio básico de todos os protocolos é o mesmo, ou seja, ambos visam proteger as células dos efeitos da congelação, da formação de gelo intracelular, da desidratação e dos efeitos tóxicos provenientes de altas e baixas temperaturas. Para prevenir a formação de gelo intracelular, ou minimizar os danos do mesmo na célula, todos os protocolos de criopreservação comumente usados para ovócitos e tecido ovariano têm como objetivo básico a desidratação (SHAW et al., 2000).

Na congelação rápida ou muito rápida, as células são desidratadas usando-se soluções que contêm alta concentração de solutos (crioprotetores e açúcares), de maneira que a água saia rapidamente da célula, com o intuito de reduzir a formação de gelo intracelular ou minimizar os danos do mesmo nas células. Entretanto, isto aumenta os danos tóxico e osmótico. O princípio deste protocolo é reduzir o estresse térmico do ovócito e, conseqüentemente, diminuir

o dano celular, mediante rápida queda de temperatura, durante a transição de fase (LEDDA et al., 2001).

O princípio da congelação lenta (também denominada convencional) é induzir a formação de gelo extracelular, aumentando a concentração do soluto. Em resposta, a água é retirada da célula, evitando-se, assim, a formação de gelo intracelular (STACHECKI et al., 1998a). Durante o resfriamento, o gelo forma-se inicialmente na solução extracelular, resultando em concentração aumentada de soluto no líquido residual e saída de água intracelular (ACKER et al., 1999). Diante disto, é necessário usar um agente crioprotetor permeável na solução de congelação, a fim de interagir e substituir parcialmente as moléculas de água, de modo que o ponto de congelação da solução seja diminuído, durante o resfriamento, tão logo a água seja transformada em gelo e a concentração de crioprotetor aumentada. Segundo STACHECKI et al. (1998a) e LEDDA et al. (2001), o resfriamento na congelação convencional deve ser suficientemente lento para permitir a desidratação e evitar a congelação intracelular, mas suficientemente rápido para evitar os efeitos tóxicos dos crioprotetores. Entretanto, em muitos tipos celulares, a sobrevivência é drasticamente reduzida, antes que a congelação seja iniciada.

Destarte, o sucesso do resfriamento lento (convencional) depende da obtenção de um balanço ótimo (equilíbrio) entre a taxa à qual a água sai da célula e a taxa à qual ela é convertida em gelo. O crioprotetor pode ser adicionado em etapas sucessivas, ou em etapa única, sendo os procedimentos realizados em diferentes temperaturas (SHAW et al., 2000). Entretanto, por razões práticas, geralmente ocorre à temperatura ambiente, por 20 minutos (ALLER et al., 1996). Esses pesquisadores relatam que, no processo de congelação convencional, o resfriamento deve ocorrer em três etapas de velocidades diferentes: resfriamento inicial, resfriamento lento e resfriamento rápido.

O resfriamento inicial é iniciado, geralmente, a partir da temperatura ambiente até -7°C com queda de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Uma vez alcançada a temperatura, aguarda-se entre cinco a 10 minutos para estabilizar o sistema (ALLER et al.,

1996). Após este período, induz-se artificialmente a cristalização (“seeding”) da solução, para evitar o super-resfriamento excessivo da estrutura celular que está sendo utilizada. A alteração da temperatura, consequente à liberação de calor de fusão e alteração na osmolaridade, requer um período de cinco a 10 minutos para equilibrar a temperatura e o volume celular (NIEMANN, 1991).

O resfriamento lento ocorre de -7°C a -35°C , sendo a velocidade de resfriamento mais apropriada entre 0,3 e $0,6^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (ALLER et al., 1996). Segundo OTOI et al. (1994), as taxas de resfriamento menores que $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ não afetam a capacidade de ovócitos congelados em se desenvolverem após a inseminação.

Entre -5°C e -15°C , o gelo forma-se no meio externo, mas o conteúdo celular permanece não congelado e super-resfriado, presumivelmente por que a membrana plasmática bloqueia o crescimento de cristais de gelo dentro do citoplasma (LUNARDINI, 1981 citado por VISKANTA et al., 1997). Devido ao potencial químico maior ao da água na solução extracelular parcialmente congelada, a água super resfriada sai osmoticamente da célula e congela externamente. Os eventos subseqüentes na célula dependem da taxa de resfriamento. Se a célula é resfriada muito rapidamente, a água intracelular não é perdida suficientemente rápida para manter o equilíbrio; a célula torna-se super resfriada, e eventualmente ocorre formação intracelular de gelo (MAZUR, 1990), que é associado a danos na membrana plasmática e geralmente presume-se ser letal à célula (OTOI et al., 1994). Se o resfriamento é realizado muito lentamente, ocorre severa retração do citoplasma (devido a desidratação) e as células ficam expostas por longo período a eletrólitos altamente concentrados (devido à precipitação da água líquida como o gelo) antes que o ponto eutético seja alcançado (MAZUR, 1990). A forma de acondicionamento da solução também pode alterar a velocidade de redução da temperatura, sendo que, no caso de congelação convencional comumente é usada palheta de inseminação de 0,25 mL, na qual a solução contendo os ovócitos é alocada em coluna intermediária (NIEMANN, 1991).

Segundo ALLER et al. (1996), o equilíbrio de líquidos e solutos modificados, anteriormente, pela entrada do crioprotetor, deve ser restabelecido após a descongelação, de maneira que o crioprotetor seja retirado lenta e progressivamente das células e esta reidrate de forma simultânea. Geralmente, acrescentam-se de 0,2 a 1,25 mol L⁻¹ de sacarose à solução de reidratação.

A congelação convencional é uma tentativa para manter o equilíbrio entre várias causas de danos, usando-se uma baixa concentração de crioprotetor e controlando a formação de gelo (VAJTA, 2000). Segundo LEDDA et al. (2001), a criopreservação de ovócitos utilizando o método convencional fornece bons resultados para aquelas espécies nas quais os ovócitos são menos sensíveis à congelação (camundonga, cadela, coelha e mulheres), enquanto resultados insatisfatórios têm sido registrados para outras espécies (porca e vaca). O maior problema, durante a congelação convencional, é o longo tempo de exposição ao crioprotetor. Em contraste aos avanços alcançados em estudos com embriões bovinos, há escassez de dados sobre ovócitos bovinos congelados utilizando o método convencional, sendo baixa a taxa de desenvolvimento desses ovócitos (OTOI et al., 1996; SUZUKI et al., 1996).

Segundo VAJTA (2000), danos por resfriamento são comparativamente menores na vitrificação, visto que as amostras passam rapidamente pelos intervalos mais críticos de temperatura, mas lesões estruturais podem ocorrer em ambos. Contudo, para prevenir a formação de gelo, a vitrificação requer aumento extremo da concentração de crioprotetor. A congelação convencional requer equipamento apropriado, enquanto a vitrificação pode ser realizada em uma caixa de isopor. A duração do trabalho é de, aproximadamente, duas horas para a congelação convencional e, normalmente, dois a três minutos para a vitrificação. A congelação convencional foi introduzida no início da década de setenta, enquanto a vitrificação teve início dez anos mais tarde, mas, rapidamente, alcançou quase a mesma eficiência que a congelação convencional. Entretanto, o autor considera que o emprego da vitrificação, apesar das vantagens amplamente conhecidas, tem sido restrito a estudos experimentais,

sendo que, no comércio de transferência de embrião, tem sido usada a congelação lenta (convencional).

2.2.2. Crioprotetores

A solução de congelação é constituída de uma solução base à qual é adicionado um suplemento protéico que, geralmente, é albumina soro bovina fração V (BSA V) ou BSA livre de ácidos graxos (BSA LAG) em concentrações de 0,3 a 0,4%, e de agentes crioprotetores em concentrações variando de um a quatro mol L⁻¹, adicionados em única etapa ou etapas sucessivas. Esta solução é, geralmente, preparada e realizada à temperatura ambiente (ALLER et al., 1996).

As substâncias crioprotetoras foram agrupadas em três categorias. Em uma categoria estão as substâncias de baixo peso molecular (< 100 M) e penetrantes, como álcoois etileno glicol (EG), glicerol, 1,2 propanodiol, metanol e outros. Os açúcares galactose, glicose, trealose e sacarose constituem a categoria de substâncias crioprotetoras de baixo peso molecular e não-penetrantes. As substâncias de peso molecular superior a 50.000 daltons e não-penetrantes, como os polímeros polivinilpirrolidona, álcool polivinil, hialuronato de sódio e outros, constituem a última categoria (PALASZ et al., 1993).

Os crioprotetores de baixo peso molecular removem grande parte da água intracelular, antes da congelação, evitando, assim, a formação de cristais de gelo e protegendo as organelas celulares dos efeitos deletérios da criopreservação. Segundo MIYAKE et al. (1993), o EG tem sido o crioprotetor preferido para congelação utilizando o método convencional e para vitrificação, devido ao seu baixo peso molecular permitindo rápida penetração. O EG possui propriedades polar e apolar e atua reduzindo a tensão de superfície da água. É uma substância de característica hidrofóbica, apesar de solúvel em água (ARAKAWA et al., 1990).

A sacarose é uma substância estabilizadora de membrana e minimiza os efeitos de elevadas concentrações de EG (OTOI et al., 1995).

Quanto à exposição dos ovócitos à solução de congelação e descongelação, deve-se considerar, além da concentração dos crioprotetores, a duração do tempo de exposição que depende primariamente da permeabilidade deste crioprotetor sobre a membrana plasmática dos ovócitos (DHALI et al., 2000). De fato, AGCA et al. (1997) verificaram que a permeabilidade de ovócitos bovinos é maior para água e crioprotetor após a maturação *in vitro* em relação aos ovócitos imaturos em VG, sendo que a permeabilidade de ovócitos bovinos é também maior para dimetilsulfóxido (DMSO) do que para EG.

2.3. Considerações sobre o estágio de maturação do ovócito e a presença de células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito no momento da criopreservação

2.3.1. Importância do estágio de maturação do ovócito

O estágio de desenvolvimento, no momento da criopreservação, tem se mostrado como um fator crítico para a sobrevivência após a descongelação (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999; LE GAL & MASSIP, 1999). Considerando o método convencional de congelação, as estruturas celulares de vários estádios de desenvolvimento e de diferentes espécies respondem, variavelmente, ao protocolo empregado. Segundo PARKS e RUFFING (1992), além de ser uma célula extraordinariamente grande, o ovócito tem uma característica única de desenvolver-se do estágio de vesícula germinal à metáfase II (MII). VAJTA (2000), MARTINO et al. (1996) e CAMARGO (1995) declaram que ovócitos de mamíferos parecem ser mais sensíveis a criopreservação do que zigotos ou embriões. CAMARGO (1995) atribuiu a baixa capacidade de desenvolvimento dos ovócitos bovinos criopreservados a certas condições de resfriamento e exposição aos crioprotetores, induzindo à instabilidade dos fusos meióticos. Deste modo, ocorreria uma segregação

anormal dos cromossomos, quando a meiose é reiniciada após fecundação. Em geral, o ovócito sofre danos, quando submetidos à congelação, devido ao fato de ser uma única célula de grande diâmetro e apresentar alta relação volume/superfície (ASADA & FUKUI, 2000), características que, associadas à penetração desigual do crioprotetor, podem resultar em danos em uma parte do ovócito, e crioproteção insuficiente em outra. Adicionalmente, os ovócitos não têm sido efetivamente criopreservados devido à sensibilidade às baixas temperaturas, apresentada pela membrana citoplasmática, microtúbulos, citoesqueleto, zona pelúcida e cromossomos (LEDDA et al., 2001; ZERON et al., 1999).

O processo de criopreservação do ovócito, em determinado estágio do ciclo celular, associa um meio adequado, resfriamento, concentração específica do crioprotetor e o período de tempo no qual o ovócito estará exposto a estas variáveis. Sabe-se que a permeabilidade muda com o estado de maturidade do ovócito. Em bovinos, ovócitos maturados *in vitro* têm maior condutividade hidráulica (L_p) do que os imaturos, maturados *in vivo* ou ovócitos fertilizados *in vitro* (RUFFING et al., 1993).

PARK et al. (1997) especulam que os efeitos deletérios da criopreservação podem afetar os cromossomos, a estrutura do fuso e de organelas citoplasmáticas, baseando-se na baixa capacidade para fertilização e de desenvolvimento desses ovócitos. Segundo esses autores, espera-se que os ovócitos congelados em estágio de vesícula germinal sejam mais estáveis do que aqueles congelados em MII, pois, no primeiro caso, é possível evitar a ocorrência de injúrias microtubulares, durante a criopreservação, pelo fato de não estarem ainda formados. Corroborando com esses autores, LEDDA et al. (2001) argumentam que, devido ao estágio mais indiferenciado e pequeno volume, os ovócitos imaturos encontrados em folículos primordiais são mais tolerantes à congelação do que os ovócitos maturados. Entretanto, PARK et al. (1997) relatam que as perturbações citoplasmáticas e nucleares induzidas em ovócitos em vesícula germinal (imaturos), consequentes do processo de congelação, podem ser

irreversíveis durante o cultivo pós-descongelamento, afetando, adversamente, o desenvolvimento pós-fertilização, com alta incidência de anormalidades cromossômicas e de fuso. Adicionalmente, ZERON et al. (1999) ressaltam que o principal local de danos por congelamento está na membrana celular, sendo que a membrana do ovócito em vesícula germinal é mais sensível à congelamento do que a do estágio de MII.

Os ovócitos são células extraordinariamente grandes. No ovócito em estágio de vesícula germinal (VG), a cromatina está em um estado mais condensado e os poucos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) são encontrados perinuclearmente (SUZUKI et al., 1996).

Uma vez que a desorganização, após resfriamento e criopreservação de ovócitos maduros, pode causar não disjunção de cromossomos e aumentar as taxas de poliploidia, atenção tem sido dada a ovócitos meioticamente imaturos (BAKA et al., 1995). Em ovócitos imaturos, os microtúbulos parecem ser restritos ao fuso meiótico, e existe pouca evidência para a concentração de material pericentriolar (AMAN & PARKS, 1994). Caso haja possibilidade para que os ovócitos em VG sejam também criopreservados com sucesso, o protocolo de MIV-FIV poderia ser mais bem administrado e os recursos genéticos de várias espécies ou linhagens poderiam ser preservados mais eficientemente (OTOI et al., 1995). Entretanto, VAJTA (2000) argumenta que, após a fecundação, os ovócitos criopreservados imaturos (em estágio de vesícula germinativa), normalmente apresentam taxas de desenvolvimento embrionário menores do que as obtidas para os maduros. Apesar disto, OTOI et al. (1995) concluíram que ovócitos bovinos imaturos podem ser adequadamente criopreservados se utilizar um processo de desidratação que associe sacarose e EG.

KUBOTA et al. (1998) testaram o potencial de desenvolvimento de ovócitos congelados, cujo núcleo foi substituído pelo núcleo de um ovócito fresco e vice-versa. O reduzido desenvolvimento de ovócitos reconstruídos sugere que tanto o núcleo do ovócito quanto o citoplasma podem sofrer danos após a congelamento. Esses pesquisadores concluíram que a criopreservação de

ovócito em VG compromete a habilidade do citoplasma em suportar posterior desenvolvimento, após a transferência nuclear.

Uma das principais limitações para o sucesso do programa de criopreservação de ovócito em MII é que a baixa temperatura causa danos no segundo fuso meiótico. Por esta razão, a congelação de ovócitos imaturos tem sido considerada uma alternativa para a criopreservação de gametas femininos. O ovócito imaturo está detido na fase de dictióteno da prófase I e, caracteristicamente, os cromossomos estão localizados dentro do núcleo e ligados à sua membrana (FABBRI et al., 1998), ou seja, teoricamente estão protegidos, enquanto na situação de MII os cromossomos estão dispostos no citoplasma.

Quanto aos ovócitos maduros, SHAW et al. (2000) admitem que sejam mais difíceis de criopreservar do que o embrião em estágio de clivagem da mesma espécie. Muitos fatores contribuem para isso, incluindo a proporção volume/superfície do ovócito, zona pelúcida e fuso metafásico sensíveis à temperatura, bem como sua susceptibilidade à ativação partenogenética e injúrias causada por congelação.

Com o início da maturação e conforme a quebra do envelope nuclear e a condensação da cromatina, os centros organizadores de microtúbulos citoplasmáticos são recrutados do citoplasma, combinam com o material pericentriolar nuclear (MPC) e polimerizam microtúbulos em direção aos cromossomos condensados (VAN der ELST et al., 1992). Também, os microfilamentos de actina são dispostos no local perinuclear. Alguns microtúbulos atravessam a extensão do fuso meiótico de pólo a pólo, enquanto outros estendem dos fusos dos pólos aos cromossomos, que agora estão concentrados em um discreto feixe na placa metafásica.

Devido às características do ovócito maduro, isto é, cromossomos frouxamente ligados ao fuso, fora do envelope nuclear e em MII, além da extrusão do primeiro corpúsculo polar, pode-se considerá-los como sendo relativamente instáveis (BERNARD & FULLER, 1996). Qualquer alteração no complemento cromossômico, resultante de dispersão ou deslocamento do fuso,

pode causar a não disjunção de cromátides, resultando em aneuploidia, com várias conseqüências para o desenvolvimento embrionário e fetal. Em alguns ovócitos maduros descongelados, pode ocorrer um processo de repolimerização, permitindo ao fuso recuperar-se de forma que o subsequente processo associado à fertilização, clivagem e desenvolvimento possa ocorrer normalmente (BAKA et al., 1995). Além disso, os ovócitos maturados *in vitro* podem apresentar, em sua membrana plasmática, uma composição diferente de fosfolipídios ou uma maior concentração de colesterol (ARAV et al., 1996).

ZERON et al. (1999) concluíram que a área danificada, decorrente do resfriamento causado ao ovócito maduro, pode ser diferente daquela causada ao imaturo (VG) e, provavelmente, não esteja restrito a membranas. Anteriormente, ARAV et al. (1996) preconizaram que a membrana plasmática dos ovócitos imaturos é mais sensível que a do maturado, enquanto ovócitos congelados após maturação *in vitro* apresentam outros locais de danos, como microtúbulos e microfilamentos, que provavelmente estão relacionados à fertilização poliespermática. Diante disto, o sucesso da criopreservação requer a otimização de cada etapa do procedimento, considerando-se o tamanho, a permeabilidade e as características fisiológicas da célula constituinte (RALL, 1992).

SONGSASEN et al. (2002) descobriram que houve diferenças quanto a sensibilidade à congelação de ovócitos de diferentes fêmeas. Os autores adotaram a pressuposição que diferenças intra-específicas nas características da membrana de gametas femininos sejam influenciadas por sua constituição genética, podendo, conseqüentemente, afetar a sensibilidade destes gametas à criopreservação. Além disso, a formação do fuso meiótico e o alinhamento dos cromossomos durante a meiose, em ovócitos de mamíferos, são regulados por fatores intracelulares como, por exemplo, a quantidade de tubulina livre dentro do citoplasma e sua capacidade de nucleação. É possível que ovócitos de diferentes fêmeas contenham diferentes tipos ou quantidades destes fatores citoplasmáticos, que modulam a organização do fuso.

Devido aos resultados conflitantes sobre a criopreservação de ovócitos imaturos ou maturados, tem sido também pesquisada a criopreservação de ovócitos em diferentes estádio do ciclo celular, entre prófase I e metáfase II, inclusive. Assim, BARNES et al. (1997) congelaram ovócitos em estádio de vesícula germinal (VG), vesícula germinal rompida (BDVG) e metáfase II (MII) utilizando o método convencional, obtendo melhor resultado de clivagem e produção de blastocisto em ovócitos congelados após sete horas de maturação *in vitro* (BDVG).

2.3.2. Importância das células do *cumulus oophorus*

Os ovócitos são geralmente criopreservados envoltos por células do *cumulus oophorus*, constituindo os chamados complexo-ovócitos-*cumulus oophorus* (COC). Ao contrário do que acontece com o ovócito, que é uma célula única, extremamente grande e com características morfofuncionais únicas, as células do *cumulus oophorus* são numerosas e congelam facilmente (WASSARMAN, 1988 citado por VIZCARRA, 2000).

CAMARGO (1995) observou que a criopreservação de ovócito envolto por suas células do *cumulus oophorus* resultou em maior proteção à zona pelúcida. Entretanto, suas propriedades físicas foram afetadas, pois estavam mais susceptíveis a danos físicos, o que foi observado durante o desnudamento, quando a zona pelúcida apresentou rompimento. Os ovócitos do grupo-controle não apresentaram rompimento da zona pelúcida, evidenciando a baixa resistência da zona pelúcida dos ovócitos congelados. Assim, as células do *cumulus oophorus* conferem certa proteção à zona pelúcida, durante a congelação-descongelação.

Entretanto, determinadas concentrações de crioprotetores diminuem o grau de aderência das células do *cumulus oophorus* ao ovócito. Alternativamente,

a descongelação tem sido realizada à temperatura ambiente a fim de reduzir os danos na zona pelúcida (FUJIMOTO et al., 1994).

Diferentemente do processo *in vivo*, em muitas espécies, a permanência das células do *cumulus oophorus* é benéfica para a FIV, ou para promover a capacitação espermática, ou para prevenir a poliespermia. Na criopreservação, no entanto, as camadas de células do *cumulus oophorus* e o acúmulo de glicoproteínas podem reduzir a velocidade de penetração do crioprotetor, durante a estabilização e diluição (VAJTA, 2000).

2.4. Alterações celulares decorrentes do processo de criopreservação

2.4.1. Efeitos da temperatura

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos requer que os ovócitos sejam removidos de um sistema físico-hormonal materno altamente regulado e transferidos para outro extremamente variável. AVERY e GREVE (1993) aconselham que ovários e ovócitos sejam mantidos em temperaturas superiores a 30°C durante todo o processo de PIV, da coleta no matadouro ao estágio de blastocisto. POLLARD et al. (1996) argumentam que a exposição de ovócitos humanos e bovinos a temperaturas subfisiológicas pode induzir a várias anormalidades nos estádios de meiose e culminar em efeitos desfavoráveis à viabilidade celular. Ainda durante as manipulações pré-resfriamento, SAUNDERS e PARKS (1999) detectaram mudanças nos ovócitos, que incluem dispersão e agrupamento cromossômico, despolimerização de microtúbulos, alteração das estruturas do fuso e formação de crateras na membrana plasmática.

As injúrias ocorridas durante o resfriamento são definidas como um dano, após exposição à baixa temperatura sem congelação, podendo ser dividida em injúria indireta do resfriamento (IDCI), que é expressa em dias, e injúria direta do resfriamento (DCI) que é expressa rapidamente após o resfriamento, tendo como alvo primário a membrana plasmática (ARAV et al., 1996).

Entretanto, VAJTA (2000) argumenta que a extensão das lesões depende de fatores que incluem tamanho, forma, permeabilidade, qualidade e sensibilidade da célula, sendo que tais fatores são determinados pela espécie, pelo estágio e origem dos ovócitos e embriões. Ainda segundo esse pesquisador, três mecanismos podem danificar os embriões ou ovócitos, durante o resfriamento. Inicialmente, na faixa de +20°C a -5°C, ocorrem danos por resfriamento causando alterações de lipídeos, microfilamentos e microtúbulos. Segundo, na faixa de -5 a -35°C, a formação de cristais de gelo é a principal causa de danos. Finalmente, entre -35 e -130°C, podem ocorrer lesões estruturais (fraturas) na célula e na zona pelúcida.

Segundo ARAV et al. (1996), assim que a energia térmica é removida da amostra, a quantidade de movimento molecular na bicamada lipídica decresce. A queda de movimento molecular, especialmente das cadeias acil, permite aumentar a interação entre moléculas lipídicas adjacentes, resultando na transição de uma fase de cristal líquido mais fluida para uma fase gel rígida. Nem todos os lipídeos submetem-se à transição precisamente à mesma temperatura, sendo que uma separação lateral de fase pode ocorrer entre regiões de fase gel e região de fase cristal líquida.

Portanto, uma vez que o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos inclui alteração nas propriedades físicas da membrana, é possível que o estágio de maturação do ovócito seja afetado devido à sua sensibilidade a baixas temperaturas. ARAV et al. (1996) constataram que a transição de fase da membrana lipídica do ovócito em VG ocorre entre 13 e 20°C, enquanto uma ampla transição de fase, concentrada em torno de 10°C, foi observada por ovócitos em MII. O aquecimento do ovócito imaturo, durante sua temperatura de transição de fase, é mais danoso à membrana do que a exposição a baixas temperaturas. Os autores obtiveram 40%, 51% e 78% de integridade de membrana, ao expor os ovócitos imaturos a 13°C, 4°C e a 38°C, respectivamente. Entretanto, foram observadas diferenças não-significantes em integridade de membrana quando ovócitos maturados *in vitro* foram resfriados às mesmas

temperaturas. Além disso, a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) ou a alteração do potencial de enzimas oxidantes do ovócito induzidas pelo processo de criopreservação podem, segundo DINARA et al. (2001), acarretar a peroxidação lipídica da membrana plasmática, causando modificação na estrutura da membrana e reduzindo o potencial de sobrevivência do ovócito.

DOBRINSKY (1996) observou que o citoesqueleto reorganiza continuamente a forma, o movimento intracelular, o transporte de organela e segregação cromossômica, enquanto fornece uma via de comunicação dentro da célula. Diante disto, os danos a estas estruturas, induzidos pela congelação, provocam efeitos marcantes no subsequente desenvolvimento dos ovócitos, após a descongelação.

O resfriamento induz a alterações cromossômicas, incluindo desorganização da placa metafásica e fusos multipolares em ovócitos resfriados em todos os estádios de meiose (MOOR & CROSBY, 1985). Considerando ovócitos na segunda fase da meiose, PARKS e RUFFING (1992) alegam que o mais importante efeito deletério causado pelo resfriamento é a destruição ou desorganização dos microtúbulos, aparentemente, como resultado da despolimerização de tubulina. Esses danos nos microtúbulos podem, também, afetar a mobilidade e transporte de lipídeos e outros componentes do embrião, quebrando o suprimento de substrato necessário à formação do blastocisto (DOBRINSKY, 1996).

A despolimerização dos microfilamentos de actina, por crioprotetores e pela congelação, pode perturbar a disposição correta do citoesqueleto para o prosseguimento normal da meiose e fecundação (DOBRINSKY, 1996), além de causar aparentemente, liberação prematura de grânulos corticais, levando ao bloqueio da fertilização ou ao impedimento do bloqueio à poliespermia (PARKS & RUFFING, 1992). Corroborando, ASADA e FUKUI (2000) alegam que a falha do espermatozóide em penetrar o ovócito é o principal fator de queda de fertilização, após a criopreservação.

SCHMIDT et al. (1995) chamam atenção para uma etapa específica do processo de congelação, o “seeding”. Esses pesquisadores argumentam que, imediatamente após a adição do crioprotetor, ocorre uma contração do ovócito devido ao fluxo de água para fora da célula. Com o equilíbrio, o ovócito retém parte de seu volume original, mas após o “seeding”, ocorre outra desidratação provocando mais contração. Especularam que o deslocamento de vesículas e mitocôndrias, observado em seu estudo, esteve associado ao aumento da desidratação e conseqüente contração do ovócito. Portanto, durante a desidratação, as vesículas são comprimidas à medida que ocorre a contração do ovócito e, após a reexpansão do ovócito, as vesículas permanecem aparentemente concentradas em uma posição junto à membrana plasmática, resultando em deslocamento periférico. Após o “seeding”, a membrana plasmática ainda é capaz de adaptar a mudanças ocorridas no volume celular, enquanto a contração adicional resultante do contínuo resfriamento após “seeding” frequentemente causa ruptura da membrana. Além de alteração na membrana, os autores observaram, também, a ocorrência de uma significativa dilatação da mitocôndria e retículo endoplasmático. Por sua vez, a ocorrência de danos na membrana plasmática de ovócitos congelados imaturos é expressa logo após a descongelação, refletindo-se na reduzida taxa de maturação *in vitro*, enquanto a ocorrência de danos nos ovócitos congelados maturados é expressa em estádios posteriores de desenvolvimento (ARAV et al., 1996).

Quando submetidos a temperaturas extremamente baixas, os danos são outros. VAN den ABBEEL e VAN STEIRTEGHEM (2000) verificaram que a ocorrência de alterações deletérias na zona pelúcida depende da velocidade de resfriamento e aquecimento, do tipo de recipiente de estocagem (palhetas) e crioprotetor usados. STACHECKI et al. (1998b) congelaram ovócitos de camundongas em MII utilizando $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de 1,2 propanodiol pelo método convencional, e verificaram que a descongelação rápida (imersão em água a 30°C) evita a formação intracelular de gelo e recristalização, durante a descongelação. Entretanto, os ovócitos descongelados exibiram, rapidamente,

mais danos morfológicos, incluindo rompimento de zona pelúcida e destruição celular, do que aqueles descongelados em ar por 30 segundos, ou 120 segundos, antes de serem transferidos para a água.

Segundo SHAW et al. (2000), a criopreservação provoca danos em todo o sistema biológico, devido à formação de gelo intra e extracelular, apoptose, toxicidade, desequilíbrio de cálcio, formação de radicais livres, alteração na concentração de ATP, alterações no metabolismo geral, falhas na fertilização e na clivagem e ativação partenogenética. Quanto às alterações de membrana, podem ser verificadas fusões e rupturas com extravasamento de conteúdo celular. Em relação aos cromossomos, pode ocorrer ganho ou perda, polispermia, poliginia (falha de extrusão de corpúsculo polar) e tetraploidia. Quanto ao DNA, verifica-se apoptose, fusão e rearranjos anormais. No citoesqueleto, pode ocorrer dispersão de microtúbulos e actina. Pode ser verificada, também, a inativação de enzimas, alterações ultra-estruturais nas microvilosidades, mitocôndrias, vesículas, grânulos corticais, bem como o endurecimento e fratura da zona pelúcida.

2.4.2. Efeitos dos crioprotetores

Quanto à exposição dos ovócitos à solução de congelação e descongelação, devem ser considerados, além da concentração dos crioprotetores, a duração do tempo de exposição, que depende primariamente da permeabilidade deste crioprotetor sobre os ovócitos (DHALI et al., 2000). Muitos crioprotetores despolimerizam microfilamentos e microtúbulos antes da criopreservação, provocando, então, destruição irreparável nos componentes do citoesqueleto (DOBRINSKY, 1996) além de serem tóxicos e causarem destruição osmótica danificando a célula.

A adição de crioprotetores, antes do resfriamento, e a remoção após o aquecimento envolve o transporte acoplado de água e crioprotetor podendo,

quando realizada inadequadamente, resultar em alterações deletérias de volume celular.

Segundo PAYNTER et al. (1997), noções sobre a permeabilidade da membrana celular facilitam o delineamento dos protocolos de criopreservação, que minimizam danos decorrentes do estresse osmótico e reduzem a incidência de gelo intracelular. Associada a estas informações, a alteração na condutividade hidráulica pode refletir diferenças fisiológicas nos ovócitos utilizados, tais como estimulação hormonal e estágio de maturação ou maturidade (HUNTER et al., 1992). Em bovinos, ovócitos maturados *in vitro* têm maior condutividade hidráulica do que os imaturos, maturados *in vivo* ou ovócitos fertilizados *in vitro* (RUFFING et al., 1993). Estes resultados mostraram que é detectada uma diferença na permeabilidade entre ovócitos maturados *in vivo* e *in vitro*, indicando que o cultivo *in vitro* e o estágio de desenvolvimento são fatores que requerem consideração, durante o desenvolvimento dos protocolos de criopreservação para ovócitos.

TAKAGI et al. (1993) congelaram embriões de sete ou oito dias PIV em $1,6 \text{ mol L}^{-1}$ de propileno glicol e $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG utilizando o método convencional e, após a descongelação mantiveram os embriões na solução de congelação por 1, 10 ou 30 minutos. Em seguida, os embriões foram lavados e submetidos ao CIV por 72 horas. Os resultados sugerem que a toxicidade química de $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG e $1,6 \text{ mol L}^{-1}$ de propileno glicol aos embriões bovinos foi baixa.

HOTAMISLIGIL et al. (1996) relataram que a adição e remoção de crioprotetores em ovócitos causam desequilíbrio osmótico quando estes atravessam a membrana celular, resultando em alteração volumétrica e danos no funcionamento, na morfologia e organização do citoesqueleto do ovócito.

Segundo PAYNTER et al. (1997), a presença de crioprotetores pode induzir mudanças nas propriedades estruturais da membrana. ARAKAWA et al. (1990) preconiza que, devido ao seu caráter hidrofílico e hidrofóbico, o EG pode

estabilizar proteína, se a temperatura imposta ao sistema for baixa, enquanto em temperaturas mais elevadas pode desnaturar proteínas.

O uso de açúcares, também, tem sido testado por alguns pesquisadores para a criopresevação de ovócitos. Segundo NIEMANN (1991), a presença de sacarose no meio de reidratação reduz até 85% o tempo necessário para remover o glicerol da solução presente nos embriões. Assim, HERRLER et al. (1991) relataram que exposições prolongadas de sacarose têm um efeito deletério sobre a capacidade de ovócitos bovinos imaturos ou maturados. Entretanto, OTOI et al. (1995) verificaram que a sacarose associado ao EG é eficaz para congelação convencional e descongelação em procedimento “one step” de ovócitos imaturos de bovinos, mas não é eficaz para congelação de ovócitos previamente maturados. Segundo LIM et al. (1992) e NIEMANN (1991) os ovócitos bovinos imaturos são mais sensíveis ao tratamento com sacarose do que os ovócitos maturados.

Apesar de SCHELLANDER et al. (1994) não indicarem o uso de carboidrato durante a remoção do crioprotetor, uma vez que não consideraram ser este um elemento-chave no melhoramento da criopreservação do ovócito, SUZUKI et al. (1996) concluíram que, para obter uma maior taxa de desenvolvimento a blastocisto, foi necessário adicionar baixa concentração de carboidrato à solução de congelação.

Segundo MIYAKE et al. (1993), o EG tem sido o crioprotetor preferido para congelação utilizando o método convencional e para a vitrificação, em virtude de seu baixo peso molecular, que permite rápida penetração. OTOI et al. (1995) usaram $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG em ovócitos imaturos congelados e não detectaram nenhum desenvolvimento desses ovócitos a blastocistos; quando combinado a $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, foi obtida uma taxa de 1% de desenvolvimento a blastocisto. A sacarose é uma substância estabilizadora de membrana e minimiza os efeitos de elevadas concentrações de EG. LIM et al. (1991), congelando ovócitos com 1 mol L^{-1} de glicerol, obtiveram maior taxa de

clivagem e maior capacidade de desenvolvimento a duas e oito células do que quando os ovócitos foram congelados em $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de glicerol.

Vários pesquisadores realizaram experimentos para testar a citotoxicidade do crioprotetor, expondo os ovócitos à solução usada para desidratação e reidratação (IM et al. 1997; PARK et al. 1997; COOPER et al. 1998; LE GAL, 1995; LE GAL & MASSIP, 1999) e verificaram que a exposição sem criopreservação não provoca rompimento de zona pelúcida nem de membrana plasmática e que apesar de reduzida, a taxa de ovócitos que alcançaram o estágio de MII aproxima-se mais à de frescos do que àquela dos do congelados imaturos. Portanto, a perda da viabilidade em ovócitos bovinos congelados foi associada à etapa específica no processo de criopreservação.

Considerando a variedade de métodos e diferentes crioprotetores utilizados, parece improvável que pequenas mudanças nessas variáveis apenas melhorem os resultados de criopreservação de ovócitos e de embriões e, alternativamente, as características fisiológicas de ovócitos embriões devem ser examinadas no sentido de se procurar um método melhor de criopreservação (LEIBO et al., 1996).

2.5. Estratégias para reduzir as injúrias causadas pelo processo de criopreservação

Vários protocolos têm sido desenvolvidos, usando compostos crioprotetores e taxas ótimas de resfriamento, para impedir a formação intracelular de gelo enquanto minimizando os efeitos deletérios da exposição à concentração de soluto, cada vez mais elevada, encontrada em baixa temperatura.

Dentre as estratégias para reduzir as injúrias causadas pela congelação, LEDDA et al. (2001) destacam: adição de moléculas conhecidas como estabilizadoras de membranas, como proteínas e açúcares ou antioxidantes; resfriamento rápido, durante a transição de fase; eletrofusão de lipossomos de

composição definida com a membrana plasmática do ovócito a fim de estabilizar a membrana; e o uso de proteínas anticongelantes.

Em relação à adição de proteínas e outros componentes, alguns autores têm usado colina para substituir o NaCl. STACHECKI et al. (1998a) relataram que a maioria dos danos da congelação é causada por altas concentrações de soluto (efeito da solução) e gelo intracelular. O sal sódico é o principal componente dos meios de criopreservação, assim como o principal contribuinte para o efeito de solução. Durante a congelação, o aumento na concentração de soluto extracelular, causado pela formação de gelo, favorece não apenas o fluxo de água para fora da célula, mas, também, o aumento na difusão de sódio para dentro da célula. Neste instante, é esperado que a bomba de sódio torne-se incapacitada com a queda da temperatura. Se a concentração de sódio intracelular estiver aumentada, no momento em que a célula é imersa em nitrogênio líquido, tal situação ainda permanecerá imediatamente após a descongelação, podendo levar a danos após a descongelação. STACHECKI et al. (1998b) substituíram o NaCl por colina ($C_5H_{14}NOCl$ ou $ChCl$) e o Na_2HPO_4 por K_2HPO_4 , restando apenas 14 mM de Na no soro fetal bovino, usado como suplemento, e concluíram que a alta concentração de sódio no meio de congelação convencional é prejudicial à criopreservação do ovócito de camundongo, sendo a colina um substituto promissor.

Relativamente à eletrofusão de lipossomas, LEDDA et al. (2001) verificaram que a polarização, antes da criopreservação, de gotas de lipídeos presentes no citoplasma pode aumentar a capacidade do fuso e organelas de ovócitos de bovinos congelados após a maturação *in vitro*. Esses pesquisadores relataram que a alteração artificial da composição da membrana lipídica pode tornar os ovócitos mais resistentes à congelação e, então, criopreservar ovócitos imaturos e aqueles coletados de espécies com alta sensibilidade à temperatura hipotérmica. Usando MIV e hidroxibutiltolueno (BHT), esses pesquisadores reduziram a sensibilidade do ovócito imaturo ao resfriamento. É possível que estes tratamentos ajudem a modificar as propriedades da membrana celular e,

consequentemente, a sensibilidade do ovócito ao resfriamento. O BHT pode afetar as propriedades físicas da membrana devido a sua característica lipofílica (ZERON et al., 1999).

A geração de ERO, durante a criopreservação, pode causar fratura na cadeia de DNA. Diante disto, a suplementação de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e de óxido nítrico no meio de congelação e descongelação, melhora a sobrevivência e as taxas de fertilização de ovócitos de camundongo criopreservado em MII (DINARA et al., 2001).

ARAV et al. (1994) argumentam que a membrana celular é o primeiro local de dano em muitas células que não toleram a exposição criogênica ou a temperatura hipotérmica. As glicoproteínas anticongelantes circulantes, identificadas primeiramente em peixes antárticos, conferem proteção a várias células mamíferas e órgãos, quando resfriadas a temperaturas não fisiológicas, incluindo ovócitos de bovinos e de suínos, à medida que possuem habilidade para interagir e estabilizar a membrana celular de ovócitos e embriões obtidos de diferentes espécies (WANG et al., 1994; ARAV et al. 1994).

Outra estratégia para reduzir injúrias causadas pela descongelação consiste em submeter os ovócitos congelados-descongelados à incubação, antes da inseminação (ASADA & FUKUI, 2000). Segundo AMAN e PARKS (1994), os estudos sobre ovócitos bovinos após congelação-descongelação sugerem que a aparência normal do fuso é recuperada, após o cultivo. Corroborando, IM et al. (1997) concluíram que ovócitos bovinos congelados-descongelados necessitam de um recultivo por duas horas, antes da inseminação. Tais ovócitos podem restabelecer a estrutura normal dos cromossomos e fuso meiótico, após curto período de repetido cultivo anterior à inseminação. Este período adicional de incubação tem sido empregado para tentar amenizar outros efeitos da criopreservação. LANE et al. (2000) verificaram que a criopreservação afeta a habilidade da manutenção da homeostase intracelular à medida em que altera os transportes de Na^+/H^+ e troca de $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ responsáveis pela regulação do pH intracelular (pHi). Tal fato explicaria a baixa taxa de clivagem de embriões, após

a criopreservação, uma vez que a reduzida habilidade de regular o pH_i resulta em alterações no metabolismo e queda na produção de energia. Entretanto, observaram que até seis horas, após o aquecimento, os embriões não haviam restituído o sistema regulatório de pH_i. ASADA e FUKUI (2000) congelaram ovócitos de bovinos em diferentes períodos de maturação (18 ou 24 horas de MIV) em 1,8 mol L⁻¹ de EG associado a 0,1 mol L⁻¹ sacarose utilizando o método convencional, os quais foram depois recultivados por zero ou seis horas. Esses pesquisadores concluíram que os ovócitos congelados-descongelados, após 24 horas de MIV sem repetida cultura, têm especialmente baixa capacidade de fecundação e de desenvolvimento.

Entretanto, uma das áreas mais promissoras é a criobiologia propriamente dita. A partir de noções sobre os princípios de transferência de massa e de calor, é possível entender muitos dos princípios físico-químicos da resposta de células e tecidos vivos frente à congelação e descongelação. Assim, a partir destas informações, será possível executar um delineamento racional de protocolos e aparelhos necessários para seu emprego (DILLER, 1997).

2.6. Recuperação dos ovócitos após a descongelação e reidratação

Após a descongelação, ocorrem perdas de ovócitos devido aos rompimentos ou dificuldades de visualização dos mesmos durante as várias etapas de reidratação. O número de ovócitos descongelados, obtidos ao final do processo de reidratação, em relação ao número de ovócitos envasados após a desidratação (ou seja, o número de ovócitos congelados) representa o número de ovócitos recuperados. A partir deste número, faz-se o cálculo percentual dos ovócitos recuperados em relação aos congelados.

LIM et al. (1999), congelaram COC bovinos em MII, utilizando o método convencional e glicerol, DMSO ou propileno glicol e obtiveram 94, 96 e 93% de recuperação, respectivamente. COOPER et al. (1998) congelaram COC imaturos de camundongas com DMSO utilizando o método convencional e

recuperaram 83% dos ovócitos, após a descongelação. BEM et al. (1993) encontraram taxa de recuperação de 94,1%, ao congelar COC imaturos de bovinos. SOUZA (2001) recuperou 92,2%, após vitrificação de COC imaturos de bovinos, utilizando EG.

Nos estudos de criopreservação de ovócitos bovinos desnudados, poucas são as informações disponíveis sobre as perdas dos mesmos durante os procedimentos. Entretanto, parece que as perdas ocorrem de forma superior aos não desnudados, uma vez que SOUZA (2001) recuperou 79% dos ovócitos imaturos desnudados.

2.7. Efeitos do processo de criopreservação sobre a morfologia dos ovócitos

Os procedimentos de criopreservação podem, também, provocar alterações na morfologia do ovócito. A avaliação morfológica é o dado mais imediato que o pesquisador possui para inferir sobre a eficácia do protocolo de criopreservação utilizado, relacionando o percentual e os tipos de alterações morfológicas ocorridas com a viabilidade celular, após a descongelação e reidratação.

Poucos pesquisadores realizam a avaliação morfológica dos ovócitos após a reidratação, assim como, entre eles, não há padronização dos critérios utilizados nesta avaliação. A maior parte daqueles que realizam a avaliação morfológica apenas classificam os ovócitos como normais ou anormais, mas não especificam e, ou contabilizam as anormalidades encontradas. Assim, COOPER et al. (1998) consideraram como sendo morfolologicamente normais aqueles ovócitos que apresentaram a zona pelúcida intacta. Observaram também que 81,0% dos COC imaturos de camundongas apresentaram-se morfolologicamente normais. Ao vitrificar ovócitos de bovinos, utilizando o EG, SOUZA (2001) encontrou 72,6% de COC imaturos e 63,6% dos desnudos imaturos normais. Esse pesquisador considerou como normais os ovócitos que apresentaram forma esférica e simétrica sem degeneração aparente, e anormais aqueles ovócitos que

apresentaram perda de conteúdo celular, citoplasma retraído, citoplasma vacuolizado e citoplasma fragmentado.

Alguns autores utilizam o aspecto do citoplasma do ovócito, como critério para estimar sua viabilidade. Assim, OTOI et al. (1997) consideraram, viáveis, os ovócitos morfológicamente normais que tinham citoplasma escuro e eventualmente granulado, enquanto aqueles que apresentavam o citoplasma amarelo com grânulos de lipídeos polarizados foram considerados degenerados. Esses autores congelaram, COC imaturos de bovinos utilizando 1,6 mol L⁻¹ de 1,2 propanodiol pelo método convencional e obtiveram 67,4% de ovócitos morfológicamente normais. LIM et al. (1991) observaram que o citoplasma dos ovócitos congelados apresentaram-se irregulares na textura e pálidos na cor, comparativamente ao fresco.

Segundo KUBOTA et al. (1998), as mais óbvias alterações morfológicas, em ovócitos congelados, são a ruptura de zona pelúcida e a lise de membrana plasmática. É possível que a lise, ou descontinuidade observada na membrana plasmática do ovócito, seja consequência da destruição da organização de microfilamentos (SAUNDERS & PARKS, 1999). Em relação à zona pelúcida, alguns autores admitem que a presença das células do *cumulus oophorus* na congelação e descongelação de ovócitos bovinos possa ter um papel de proteger a zona pelúcida, uma vez que encontraram menor incidência de lesões em COC do que em ovócitos desnudos (CAMARGO, 1995; SOUZA, 2001).

De acordo com SAUNDERS e PARKS (1999), existem certas limitações ao uso da morfologia do ovócito como base para a sobrevivência após a descongelação. Quando os ovócitos são avaliados sem remoção das células do *cumulus oophorus*, números elevados podem ser obtidos de células com uma aparência normal. Quando as células do *cumulus oophorus* são removidas, os ovócitos podem ser avaliados mais objetivamente. LIM et al. (1999), após a reidratação dos ovócitos realizaram o desnudamento dos COC congelados maturados para avaliar a morfologia destes ovócitos e consideraram como

morfologicamente anormais os ovócitos com citoplasma escuro, granulado ou fragmentado, zona pelúcida fraturada, membrana vitelínica indefinida e espaço perivitelíneo dilatado. De acordo com este critério, esses pesquisadores obtiveram 62, 86 e 83% de ovócitos morfologicamente normais criopreservados utilizando o método convencional em 1 mol L⁻¹ de glicerol, DMSO ou propileno glicol, respectivamente.

As células do *cumulus oophorus* também já foram utilizadas como parâmetro para viabilidade celular. DIDION et al. (1990) definiram, como viáveis, os ovócitos que apresentaram células do *cumulus oophorus* relativamente grandes e translúcidas ligadas ao ovócito de citoplasma marrom-escuro; e como inviáveis, consideraram os ovócitos que apresentavam as células do *cumulus oophorus* pequenas, opacas e frouxamente ligadas ao ovócito e, ocasionalmente, o citoplasma marrom-claro. Parece que as células do *cumulus oophorus* também sofrem danos, durante o processo de criopreservação. Esta condição pode ser verificada no trabalho de COOPER et al. (1998) os quais congelaram COC imaturos de camundongas utilizando o método convencional e verificaram que todos os grupos de ovócitos recuperados tenderam a espalhar as células do *cumulus oophorus*, que estavam no ovócito quando congeladas, com muitos dos ovócitos estando completamente desnudados quando colocados no meio de maturação. De fato, SAUNDERS e PARKS (1999) observaram que o tempo necessário para realizar o desnudamento de ovócitos recém descongelados é menor do que tempo necessário para realizar o desnudamento de ovócitos frescos. Estas informações comprovam a fragilidade das células do *cumulus oophorus*, após serem congeladas.

2.8. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a maturação *in vitro* dos ovócitos

Várias pesquisas têm apresentado boa taxa de maturação *in vitro* de ovócitos frescos de bovinos, sejam desnudados ou não. Assim, foram obtidas taxas de 78% dos desnudos e 88,0% (IM et al., 1997), 81,3% (PARK et al., 1997) e 76,5% (SAUNDERS e PARKS, 1999) dos COC que alcançaram o estágio de metáfase II (MII).

Entretanto, os ovócitos submetidos à maturação *in vitro*, após os procedimentos de congelação-descongelação, apresentam taxas de MII bastante inferiores quando comparadas às daquelas dos ovócitos frescos. Assim, FUJIMOTO et al. (1994) observaram que apenas 4,0% dos ovócitos congelados maturaram *in vitro* após descongelação, enquanto 86,0% dos ovócitos não congelados alcançaram metáfase II. Resultados ligeiramente melhores, porém ainda baixos, foram obtidos por IM et al. (1997), os quais congelaram ovócitos em 1,5 mol L⁻¹ de 1,2 propanodiol utilizando o método convencional e obtiveram 44,0% de MII para COC e 30,0% para desnudos.

Segundo os resultados obtidos por SAUNDERS e PARKS (1999), a congelação tem efeito deletério sobre todos os componentes celulares. Esses pesquisadores verificaram que poucos ovócitos submetidos à congelação tinham arranjo cromossômico normal, em relação aos não congelados. Além disso, a percentagem de ovócitos com distribuição normal de microfilamentos foi menor em ovócitos congelados do que naqueles não congelados. Estas observações são de extrema importância, visto que a mínima alteração nas estruturas do citoesqueleto compromete a viabilidade dos ovócitos, de forma que os resultados de maturação também sejam comprometidos.

Com as tentativas recentes de dominar a criopreservação do gameta feminino, alguns pesquisadores tiveram a preocupação de verificar se as soluções utilizadas teriam algum efeito deletério nos ovócitos, de forma que pudesse comprometer a maturação dos mesmos. Assim, IM et al. (1997) submeteram

COC e ovócitos desnudos imaturos de bovinos $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de 1,2 propanodiol, sem congelação, e encontraram 77% e 59% de maturação, respectivamente. Também PARK et al. (1997) colocaram COC imaturos humanos em $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de 1,2 propanodiol e obtiveram 64,5 % de MII. Esses pesquisadores verificaram que, apesar de a exposição a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de propanodiol ter reduzido a taxa dos ovócitos que maturaram *in vitro*, ela não provocou alterações profundas no número de cromossomos e estrutura do fuso. Também SHAW et al. (2000) submeteram à maturação *in vitro* ovócitos bovinos em estágio de vesícula germinal (VG), após esses serem expostos por 3 minutos à solução de criopreservação e obtiveram 75,0% de MII usando $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EG a 39°C , e 89,6% a $22 - 24^{\circ}\text{C}$.

Nesta mesma linha de atuação, COOPER et al. (1998) observaram que os COC permaneceram intactos, quando expostos a $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de DMSO. O fato de a exposição ao DMSO sem congelação não ter resultado em nenhum efeito sobre a maturação indica que o resfriamento/congelação, ou suas conseqüências, induzem a mudanças que podem destruir conexões intercelulares ou conexões célula-matriz que envolvem os ovócitos. Adicionalmente, PICKERING et al. (1990) relatam que, além do efeito da baixa temperatura, a exposição aos crioprotetores também pode causar despolimerização de microtúbulos, acompanhada por conseqüente dispersão dos cromossomos da placa metafásica, sendo este um fator de risco para a ocorrência de aneuploidias para o zigoto.

2.9. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a fecundação *in vitro*

Algumas pesquisas têm apresentado alguns problemas, relativamente à fecundação de ovócitos previamente criopreservados. Segundo SAUNDERS e PARKS (1999), o comprometimento na capacidade de fecundação e de desenvolvimento em ovócito bovino criopreservado é causado pela destruição do sistema de microtúbulos no fuso meiótico, durante resfriamento. Segundo

FABBRI et al. (1998), os microtúbulos são envolvidos na mistura de cromossomos maternos e paternos, subsequente à quebra da membrana nuclear, enquanto os microfilamentos são responsáveis pela rotação do fuso e extrusão do corpúsculo polar, e tanto microfilamentos quanto microtúbulos são responsáveis pela migração do pronúcleo da região cortical para o centro do ovócito. O crioprotetor e, ou a criopreservação poderiam comprometer estrutura e função de microtúbulos e microfilamentos, resultando em bloqueio no estágio pronuclear.

ASADA e FUKUI (2000) encontraram taxa de 89,0% de penetração em ovócitos congelados-descongelados. Entretanto, verificaram que 32,0% eram ovócitos poliespérmicos. Esses pesquisadores sugerem que a causa desta elevada taxa de poliespermia seja a falta de endurecimento da zona pelúcida, após liberação do conteúdo dos grânulos corticais, decorrentes dos danos provocados pela congelação e descongelação. Entretanto, outras causas são admitidas, como a redução no número de grânulos corticais (FABBRI et al., 1998) e os danos ocorridos nos microtúbulos e microfilamentos (ARAV et al., 1996).

Congelando ovócitos de camundongos, WOOD et al. (1992) verificaram que a retomada da meiose, após a penetração espermática, é demorada nos congelados, em relação ao controle não congelado. Os espermatozóides não penetraram em 78% dos ovócitos congelados, após duas horas de incubação, enquanto que a taxa foi de 53% para os frescos. Esses pesquisadores verificaram, ainda, que a remoção da zona pelúcida antes da inseminação restituía a taxa de fertilização dos ovócitos congelados ao nível do controle, indicando que o problema poderia ocorrer na zona pelúcida.

Alguns pesquisadores têm obtido elevada taxa de fecundação de ovócitos criopreservados. OTOI et al. (1995) congelaram COC usando $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG, acrescido de sacarose e encontraram taxas de fecundação de 27,8, 22,2 e 16,7% para ovócitos imaturos congelados sem sacarose, com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e com $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose, respectivamente. Quanto aos ovócitos maduros, obtiveram 63,4; 54,5 e 63%, respectivamente. Estes resultados foram inferiores aos obtidos com ovócitos não congelados (86,6%). Também LIM et al (1999),

obtiveram taxas de fecundação de 79,0; 76,0 e 59,0% para COC congelados maturados em 1 mol L⁻¹ de glicerol, DMSO e propileno glicol, respectivamente.

Entretanto, algumas pesquisas têm apresentado baixas taxas de fecundação. SUZUKI et al. (1996), congelaram COC imaturos e obtiveram taxas de fecundação de 33,3; 46,7; 53,3 e 26,7% para aqueles congelados em 1,8 mol L⁻¹ de EG, 1,8 mol L⁻¹ de EG + 0,05 mol L⁻¹ de trealose, 1,8 mol L⁻¹ de EG + 0,1 mol L⁻¹ de trealose e 1,8 mol L⁻¹ de EG + 0,2 mol L⁻¹ de trealose, respectivamente. Também OTOI et al. (1997), utilizando COC maturados e congelados com 1,2 propanodiol, obtiveram taxas de fecundação e clivagem de 38,6 e 36,2%, respectivamente. FABBRI et al. (1998) criopreservaram ovócitos, utilizando 1,5 mol L⁻¹ de propileno glicol (PrOH), associado a 0,2 mol L⁻¹ de sacarose, e obtiveram 44,0% de COC e 25,0 % de desnudados fecundados.

2.10. Efeitos da congelação utilizando o método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário

Os resultados de clivagem e desenvolvimento embrionário de ovócitos criopreservados ainda são baixos. Algumas pesquisas têm apresentado resultados mais promissores, porém sem repetibilidade. Segundo SAUNDERS e PARKS (1999), a liberação de enzimas dos grânulos corticais e o endurecimento prematuro de zona pelúcida podem provocar comprometimentos à fecundação e resultar em queda na taxa de clivagem e, principalmente, no desenvolvimento embrionário.

Resultados animadores foram obtidos em algumas pesquisas. Assim, FABBRI et al. (1998) criopreservaram ovócitos humanos com 1,5 mol L⁻¹ de PrOH e 0,2 mol de sacarose e encontraram taxas de clivagem de 75% e 50% para COC e desnudos, respectivamente. LIM et al. (1991), congelaram COC maturados utilizando 1 e 1,5 mol L⁻¹ de glicerol pelo método convencional e obtiveram taxa de clivagem de 31,1 e 17,8%, respectivamente. Esses resultados

foram bastante inferiores àqueles obtidos com a fecundação de COC frescos (83,3%). LIM et al (1999), congelaram COC maduros e obtiveram 51,0; 54,0 e 33,0% de clivagem para COC congelados em 1 mol L⁻¹ de glicerol, de DMSO e propileno glicol, respectivamente. Também OTOI et al. (1997), congelaram COC maturados e obtiveram 36,2% de clivagem usando 1,2 propanodiol.

Entretanto, os resultados obtidos na maioria das pesquisas ainda são baixos (SCHELLANDER et al., 1994; OTOI et al., 1995; SUZUKI et al., 1996; SAUNDERS & PARKS, 1999; ASADA & FUKUI 2000), indicando a necessidade de pesquisas no intuito de melhorar as taxas e, ainda, conseguir a repetibilidade dos procedimentos com resultados mais satisfatórios.

SCHELLANDER et al. (1994), ao fecundar COC congelados maduros usando glicerol, DMSO e 1,2 PrOH, obtiveram taxa de clivagem de 9,8 e 11,6; 13,3 e 12,1 e 4,6 e 5,5% para COC criopreservados com 1 e 1,5 mol L⁻¹ de glicerol; 1 e 1,5 mol L⁻¹ de PrOH e 1 e 1,5 mol L⁻¹ de DMSO, respectivamente. Utilizando os mesmos tratamentos para ovócitos imaturos, obtiveram taxa de clivagem de 10,6; 14,7; 11,9; 17,3; 8,8 e 18,0%, respectivamente. Estes resultados foram inferiores aos obtidos com o uso de COC frescos (62,2%).

OTOI et al. (1995), congelaram COC imaturos e maturados de bovinos, utilizando o método convencional e 1,8 mol L⁻¹ de EG associado à sacarose e encontraram taxas de clivagem de 2,9; 3,3; e 7,0% dos imaturos congelados e 5,1; 1,9; e 1,7% dos maturados congelados sem sacarose, com 0,1 mol L⁻¹ de sacarose e com 0,2 mol L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

SAUNDERS e PARKS (1999) congelaram COC maduros e obtiveram 7,8% de clivagem, enquanto 53,3% dos ovócitos do grupo controle clivaram. Esses pesquisadores verificaram que apenas 7 a 14% dos ovócitos descongelados permaneceram com o fuso normal, o que explica a baixa taxa de clivagem dos ovócitos congelados. ASADA e FUKUI (2000), utilizando 1,8 mol L⁻¹ de EG e 0,1 mol L⁻¹ de sacarose, congelaram COC maduros e obtiveram 16,3% de clivagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos ovários e manipulação dos ovócitos

O experimento foi realizado no período de novembro de 2001 a julho de 2002, no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LRA-DVT-UFV).

Foram utilizados 1153 ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça definida e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em um matadouro localizado a 60 Km da UFV. Imediatamente após abate e evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica entre 35-38°C, acrescida de sulfato de estreptomicina (SIRARD e BILODEAU, 1990). Ao término da coleta, os ovários foram lavados e imersos em solução fisiológica, previamente aquecida a 38°C, e transportados acondicionados nessa solução em garrafa térmica, em tempo máximo de três horas, para o LRA - DVT- UFV.

No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica pré-aquecida a 37,5°C, sendo os folículos iguais ou menores que 10 mm de diâmetro puncionados, usando-se agulhas 25 X 7 gauge, adaptadas em seringas de 3 mililitros. Os folículos de diâmetro superior a 10 mm foram descartados, pelo fato de abrigarem ovócitos em estádios mais avançados do ciclo celular meiótico,

característica esta indesejável para o presente experimento. O líquido folicular, contendo os ovócitos, foi depositado em cálice cônico contendo 20 mL de meio Talp-Hepes (BAVISTER et al., 1983) mantido a 37,5°C. Ao término da aspiração, aguardou-se um período de 10 minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o “pellet” contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice, com o auxílio de pipeta de Pasteur, sendo então transferido para placa de Petri contendo meio Talp-Hepes mantida em placa aquecedora a 38°C. Com auxílio de um microscópio estereoscópio e uma micropipeta, foram selecionados, para o experimento, os ovócitos que apresentavam células do *cumulus oophorus* compactas (COC), segundo COSTA (1994). Os COC selecionados foram transferidos para outra placa de Petri contendo Talp-Hepes e, em seguida, lavados por duas vezes neste meio, em placa escavada, ambos com temperatura a 38°C.

3.2. Tratamentos

Foram utilizados 2863 COC imaturos, distribuídos em seis tratamentos. Para cada tratamento (exceto os frescos), em cada repetição, os COC recém selecionados foram aleatória e proporcionalmente distribuídos em dois grupos. Em um dos grupos, as células do *cumulus oophorus* foram mantidas aderidas ao ovócito; no outro grupo, os COC foram submetidos ao processo de desnudamento, segundo COSTA (1994), no qual as células do *cumulus oophorus* foram totalmente retiradas dos ovócitos.

O meio base utilizado para manipulação, assim como para congelação e descongelação, foi o Talp-Hepes acrescido de 0.4% de albumina sérica bovina fração V (BSA-V). Os tratamentos utilizados para este experimento são apresentados a seguir (Figura 1).

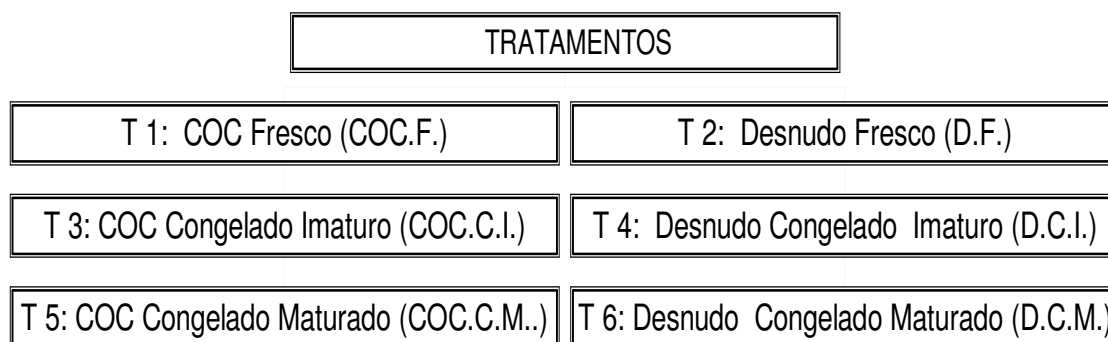


Figura 1- Organograma dos tratamentos.

Tratamento 1 (COC.F.)

Constituído de 692 COC frescos que, imediatamente após a seleção, foram submetidos aos processos de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), conforme descrito posteriormente.

Tratamento 2 (D.F.)

Constituído de 190 ovócitos desnudos frescos. Imediatamente após a seleção foram submetidos aos processos MIV, FIV e CIV, conforme descrito posteriormente.

Tratamento 3 (COC.C.I.)

Foram utilizados 582 COC imaturos, submetidos à criopreservação imediatamente após a seleção dos ovócitos. Posteriormente, foram descongelados, sendo que, aqueles considerados normais foram submetidos aos processos MIV, FIV e CIV.

Tratamento 4 (D.C.I.)

Foram utilizados 532 ovócitos desnudos imaturos. Imediatamente após a seleção, os ovócitos foram desnudados e submetidos à criopreservação. Posteriormente, foram descongelados, sendo que, aqueles considerados normais foram submetidos aos processos MIV, FIV e CIV.

Tratamento 5 (COC.C.M.)

Foram utilizados 381 COC que, imediatamente após a seleção, foram submetidos à MIV por 22 horas. Em seguida, os ovócitos foram criopreservados e posteriormente descongelados, e aqueles considerados normais foram submetidos ao recultivo em meio de maturação *in vitro*, por duas horas, sendo então, submetidos aos processos FIV e CIV.

Tratamento 6 (D.C.M.)

Foram utilizados 294 ovócitos que, imediatamente após a seleção, foram desnudados e submetidos à MIV por 22 horas. Em seguida os ovócitos foram criopreservados, depois descongelados, e aqueles considerados normais foram submetidos ao recultivo em meio de maturação *in vitro*, por duas horas e, então, submetidos aos processos FIV e CIV.

As repetições do grupo-controle (tratamentos 1 e 2) foram realizadas no período de novembro de 2001 a julho de 2002. Devido ao pequeno número de ovócitos obtidos em cada coleta, a congelação dos ovócitos dos tratamentos 3, 4, 5 e 6 ocorreu em épocas diferentes, sendo realizada em 15 repetições, para cada um dos tratamentos. Ovócitos dos tratamentos 3 e 4 foram congelados durante os meses de novembro e dezembro de 2001, enquanto os ovócitos dos tratamentos 5 e 6 foram congelados durante os meses de fevereiro, março e abril de 2002. A descongelação foi realizada no mês de julho de 2002, em nove repetições, para os ovócitos dos tratamentos 3 e 4, e quatro repetições para os ovócitos dos tratamentos 5 e 6.

3.3. Desidratação e congelação dos ovócitos

A congelação foi realizada em solução contendo $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de etileno glicol (EG) em Talp-Hepes acrescida de 0,4% de BSA-V, pelo do método convencional (OTOI et al., 1995) modificado.

Os ovócitos foram desidratados por imersão em três soluções (etapas), contendo concentrações crescentes do crioprotetor, durante um tempo de permanência máxima de cinco minutos, em cada etapa, à temperatura ambiente, conforme como se segue:

1ª etapa: $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de EG em meio Talp - Hepes

2ª etapa: $1,2 \text{ mol L}^{-1}$ de EG em meio Talp - Hepes

3ª etapa: $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG em meio Talp – Hepes.

Para o processo de desidratação, foi utilizada uma placa de vidro com nove escavações. Em cada uma das três primeiras escavações, foram colocados 800 L das soluções de desidratação e, então, os ovócitos foram submetidos a três etapas, conforme descrito anteriormente. Durante a terceira etapa, os ovócitos foram envasados em palheta de 0,25 mL, adotando-se o seguinte procedimento: uma coluna de aproximadamente 4 cm do meio de congelação foi aspirada para a palheta (6) e, em seguida, uma coluna de ar (5), uma coluna de aproximadamente 2 cm, constituída do meio de congelação contendo entre 10 e 20 ovócitos (4), ar (3) e meio de congelação (2) e, finalmente, ar (1) até que a primeira coluna (6) entrasse em contato com o êmbolo (7) (Figura 2).

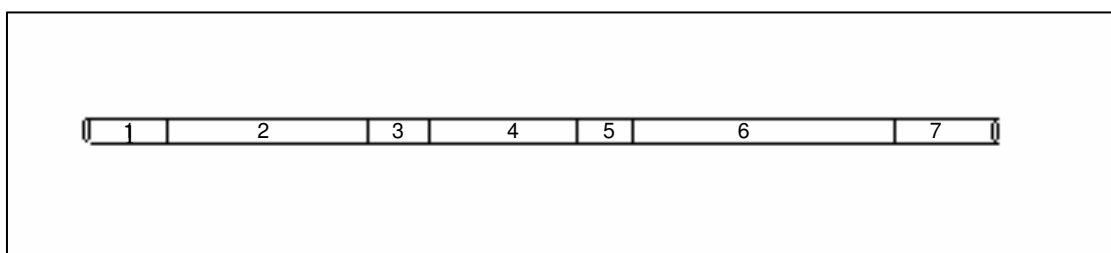


Figura 2 - Representação esquemática do envasamento de ovócitos.

As palhetas foram vedadas (1) e transferidas, verticalmente, para o

congelador de células (Biocool TM, FTS Systemms Inc., modelo BC-70-4 A) previamente equilibrado a 0°C, sendo o resfriamento inicial de 0°C até -6°C, com queda programada de temperatura de 1°C/minuto. Ao atingir -6°C, aguardaram-se 5 minutos e a indução de cristalização (“seeding”) foi realizada encostando-se uma pinça resfriada em nitrogênio líquido (N₂L) na coluna superior (C) da palheta. Após 10 minutos de estabilização a -6°C, a temperatura foi reduzida para -32°C a 0,3°C/minuto. As palhetas foram retiradas do congelador de células e expostas, horizontalmente, ao vapor de nitrogênio por 5 segundos, a cerca de dois centímetros do N₂L e, imediatamente, foram imersas e armazenadas em N₂L.

3.4. Descongelação, reidratação e recuperação dos ovócitos

Os ovócitos dos tratamentos 3, 4, 5 e 6 foram descongelados por imersão da palheta em banho-Maria a 30°C por 20 segundos.

A reidratação ocorreu em temperatura ambiente, em três etapas, de seis minutos cada uma, da seguinte maneira:

1^a etapa: 0,9 mol L⁻¹ de EG + 0,3 mol L⁻¹ de sacarose em meio Talp - Hepes

2^a etapa: 0,3 mol L⁻¹ de sacarose em meio Talp - Hepes

3^a etapa: meio Talp - Hepes sem EG e sem sacarose.

Para o processo de reidratação, foi utilizada uma placa escavada de vidro, contendo nove escavações. Com exceção da primeira escavação, que continha 300 L da solução de reidratação, as demais possuíam 800 L da referida solução.

As palhetas foram cortadas no ponto das colunas de ar (3 e 5, conforme Figura 2), para que os ovócitos tivessem o mínimo contato com a solução de desidratação. Assim, imediatamente após o conteúdo da palheta ter sido expelido na primeira escavação, os ovócitos foram transferidos para a segunda escavação, onde permaneceram até completar o tempo da primeira etapa de reidratação. Durante a segunda e terceira etapas de reidratação, os ovócitos

passaram por duas escavações, em cada etapa. Após a reidratação, os ovócitos foram lavados duas vezes em meio Talp-Hepes acrescido de 0,4% de BSA-V e, com auxílio de um microscópio estereoscópio, foi obtida a taxa de recuperação e realizada a avaliação morfológica do ovócito.

A taxa de recuperação consiste do número de ovócitos contabilizados após as lavagens em meio Talp-Hepes no final da reidratação, em relação ao total de ovócitos envasados e congelados. Portanto, os ovócitos que por quaisquer motivos - seja por não visualização ou pelo fato de não ter sido capturado em tempo hábil, visto que o tempo de permanência dos ovócitos em cada etapa da reidratação deve ser rigorosamente respeitado – permaneceram nas escavações correspondentes à etapas iniciais do processo de reidratação, foram considerados perdidos ou não recuperados.

3.5. Classificação e incidência de alterações morfológicas ocorridas nos ovócitos submetidos aos processo de criopreservação

Posteriormente, os ovócitos foram avaliados e classificados como morfolologicamente normais ou anormais. As avaliações dos COC foram realizadas com presença de suas respectivas células do *cumulus oophorus*. Foram considerados normais aqueles ovócitos que, após descongelação e reidratação, apresentaram zona pelúcida e membrana plasmática intactas, sem evidência de perda de conteúdo celular e de retração do citoplasma, segundo PARK et al. (1997). Portanto, ovócitos com características opostas às mencionadas foram considerados danificados, sendo imediatamente descartados, enquanto aqueles considerados sobreviventes, baseado na aparência normal de sua morfologia, foram submetidos aos processos MIV, FIV e CIV de acordo com o tratamento.

3.6. Avaliação da citotoxicidade do etileno glicol

A citotoxicidade do etileno glicol foi testada, expondo-se 33 COC imaturos à solução de desidratação e de reidratação, sem criopreservação. Em seguida, foram submetidos à maturação *in vitro* e, posteriormente avaliados para verificar e comparar seu estágio de maturação nuclear àquele dos ovócitos frescos e congelados imaturos, após estes serem submetidos a MIV.

3.7. Maturação *in vitro* (MIV)

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 10 g/ml de FSH previamente equilibrado por no mínimo duas horas à temperatura de 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora (Jouan, modelo IG 150) segundo COSTA (1994).

A maturação *in vitro* dos ovócitos foi realizada, por 24 horas, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, e por 22 horas para os tratamentos 5 e 6, em placas de poliestireno de 35 x 10 mm, contendo três mL do meio de maturação, em estufa incubadora nas mesmas condições descritas anteriormente. Os ovócitos dos tratamentos T₂ (D.F.), T₃ (COC.C.I.), T₄ (D.C.I.) e T₆ (D.C.M.) foram maturados na presença de células da granulosa em suspensão, recém-preparadas, com o intuito de suprir a ausência das células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito, decorrente do desnudamento (T₂ e T₄ e T₆), ou do processo de criopreservação (T₃). Essas células foram provenientes da escarificação de folículos.

Para avaliação da maturação nuclear, ovócitos de todos os tratamento foram desnudados, hipotonizados, fixados em lâminas e corados com orceína a 2% (COSTA, 1994). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1000X em imersão, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração dos cromossomos, em prófase I (PI), metáfase I (MI), anáfase I (AI) ou metáfase II (II). Foram considerados maturados, a nível nuclear, os ovócitos que

apresentavam configuração cromossômica em metáfase II, assim como o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente. Os ovócitos que apresentaram resquícios de cromatina condensada, mas, nenhuma configuração característica de algum estágio do ciclo celular, foram classificados como condensação de cromatina (CC), e sem configuração cromossômica (SCC) aqueles nos quais foi detectada ausência total de cromossomos.

3.8. Preparo do sêmen e fecundação *in vitro*

Foi utilizado sêmen bovino congelado em palhetas médias (0,53 mL) na concentração de 2×10^7 espermatozóides/dose, descongelado em banho-Maria à 37,5°C por 50 segundos. O meio de manipulação e incubação do sêmen e o de fecundação foram o Sp-T1 e o Fert-Talp, respectivamente, de PARRISH et al. (1988), modificados segundo COSTA (1994).

A fecundação foi realizada em placas de poliestireno de 35 X 10 mm, contendo gotas de 100 μ L de Fert-Talp acrescido de 10 μ g/mL de heparina, cobertas com óleo mineral. Em cada gota de fecundação, foram colocados 30 ovócitos no máximo e 2×10^6 espermatozóides/mL. Em seguida a placa foi levada para estufa de CO₂ nas mesmas condições da maturação. Doze horas após a inseminação, os ovócitos foram retirados do meio de fecundação e transferidos para a placa escavada contendo o meio de cultivo. As células do *cumulus oophorus* e os espermatozóides residuais foram removidos, por meio de repetidas pipetagens. Os ovócitos foram lavados três vezes e, imediatamente, submetidos ao cultivo *in vitro*.

Para avaliação da taxa de fecundação, pelo menos 30 ovócitos foram retirados de cada tratamento. Os ovócitos foram desnudados e colocados em uma lâmina, recobertos com uma lamínula com duas margens sustentadas por uma mistura de vaselina e parafina, preparada segundo RAFFETY (1980). Posteriormente, a lâmina foi mergulhada em uma solução de metanol e ácido

acético (3:1), em que permaneceu por 24 horas. Após este período, a preparação foi corada com orceína a 2% e analisada. Foram considerados fecundados os ovócitos que apresentaram núcleo espermático descondensado ou pronúcleo masculino e feminino, com a presença ou não da cauda do espermatozóide no citoplasma, conforme descrito por COSTA (1994) e OHGODA et al. (1988) modificado.

3.9. Cultivo dos zigotos e avaliação do desenvolvimento embrionário

O co-cultivo dos zigotos foi realizado em placa de poliestireno, contendo monocamada de células da granulosa, em 3 mL de TCM acrescido de substâncias (COSTA, 1994), durante 7 dias. O meio de cultivo foi substituído com 1,5 mL de meio fresco, a intervalos de 48 horas, após inseminação. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a inseminação. A taxa de mórulas e de blastocistos foi verificada no sétimo dia de cultivo.

3.10. Análise estatística

Os dados obtidos de cada amostragem, para todas as variáveis, foram agrupados em tabelas de contingência e analisados pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Recuperação dos ovócitos após descongelação e reidratação

Os números e percentagens de ovócitos, recuperados após a descongelação e reidratação, são apresentados na Tabela 1. Houve diferença ($P<0,01$) entre os ovócitos congelados imaturos (T_3 e T_4), entre os ovócitos congelados envoltos pelas células do *cumulus oophorus* (T_3 e T_5), bem como entre os ovócitos congelados desnudos (T_4 e T_6). Os ovócitos congelados maturados (T_5 e T_6) também apresentaram diferenças ($P<0,05$).

A taxa de recuperação dos COC congelados maturados (T_5) foi maior que a dos COC congelados imaturos (T_3). Os COC congelados maturados tendem a formar aglomerados, provavelmente como consequência da produção de mucina, sendo que, ao serem descongelados e expelidos da palheta, tais ovócitos permanecem em grupos. Entretanto, os COC congelados imaturos tendem a dispersar e ocupar toda área da escavação da placa usada para a reidratação. Deste modo, há maior probabilidade de perdas desses ovócitos em virtude da manipulação durante a reidratação, principalmente pelo fato de cada etapa ter o seu tempo específico de execução, que deve ser rigorosamente respeitado, a fim de não interferir nas etapas subsequentes.

Tabela 1- Números e percentagens de ovócitos congelados imaturos e maturados

in vitro, com *cumulus oophorus* ou desnudados, recuperados após descongelação e reidratação

	Tratamento	Total congelado	Ovócitos recuperados (%)
T ₃	COC.C.I.	582	539 (92,6) ^b
T ₄	D.C.I.	532	519 (97,5) ^a
T ₅	COC.C.M.	381	368 (96,6) ^a
T ₆	D.C.M.	294	274 (93,2) ^b
	Total	1784	1700 (95,3)

T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado maturado

a, b: Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P < 0,05) pelo teste do qui-quadrado.

Portanto, no presente experimento, foram recuperados 92,6% dos COC congelados imaturos, resultado este superior aos 83,0% dos COC congelados imaturos obtidos por COOPER et al. (1998), mas semelhante aos encontrados por SCHROEDER et al. (1990) e SOUZA (2001), que recuperaram 94,0 e 92,2% dos COC congelados imaturos, respectivamente.

Foram recuperados 96,6% dos COC congelados maturados. Estes dados são semelhantes aos encontrados por SCHROEDER et al. (1990), que recuperaram 96,0% dos COC congelados após serem submetidos ao processo MIV. LIM et al. (1999) recuperaram 94,0; 96,0 e 93,0% dos COC maturados congelados em glicerol, DMSO e propileno glicol, respectivamente. SCHELLANDER et al. (1994) recuperaram 90,0 a 95,0% dos COC congelados imaturos e COC congelados maturados.

A taxa de recuperação dos COC congelados parece não ser influenciada pela espécie – camundongo (SCHROEDER et al., 1990) ou bovino (SCHELLANDER et al., 1994), pelo método de criopreservação - vitrificação (SOUZA, 2001) ou convencional (dados desse experimento), nem pela

concentração (SCHROEDER et al., 1990; SCHELLANDER et al., 1994) e tipo de crioprotetor utilizado (LIM et al., 1999).

A taxa de recuperação dos ovócitos desnudados foi 97,5% para os imaturos (T₄) e 93,2% para os maturados *in vitro* (T₆). Considerando os desnudos imaturos, a taxa de recuperação, obtida neste estudo, foi semelhante à obtida por BEM et al. (1993), que encontraram 94,1%, usando o método convencional, e superior ao encontrado por SOUZA (2001), que recuperou 79,0% dos ovócitos, embora utilizando a vitrificação, o que pode ter provocado danos mais acentuados, a ponto de impedir que tais ovócitos sejam visualizados. A perda de ovócitos desnudos, durante a reidratação, é devida à lise celular, ocorrendo total perda de citoplasma e permanecendo apenas o resquício da membrana plasmática e da zona pelúcida, o que dificulta sua identificação. Quando ocorre lise dos COC, mesmo que o citoplasma saia do ovócito, as células do *cumulus oophorus* servem como referência para sua identificação. Outra razão é o fato de alguns ovócitos desnudados ficarem fora de foco, “boiando” na solução de reidratação, sendo identificados somente quando as escavações foram vistoriadas com a intenção de identificar o número de ovócitos perdidos durante a manipulação.

4.2. Efeitos do processo de congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a morfologia dos ovócitos

Os efeitos da congelação e descongelação sobre a morfologia dos ovócitos são apresentados na Tabela 2. Os COC congelados maturados (T₅) apresentaram a maior percentagem de ovócitos normais, após descongelação e reidratação; entretanto, este resultado foi similar ao dos COC congelados imaturos (T₃), não havendo diferença entre eles ($P>0,05$). Houve diferença ($P<0,01$) na percentagem de ovócitos com morfologia normal entre os congelados imaturos (T₃ e T₄), bem como entre os tratamentos 3 e 6 ($P<0,01$). A menor percentagem de morfologia normal ocorreu nos ovócitos desnudos congelados maturados (T₆), seguidos pelos desnudos congelados imaturos (T₄),

sendo encontrada diferença ($P < 0,05$) entre eles. Quanto aos ovócitos congelados maturados, os COC (T_5) apresentaram maior percentagem de morfologia normal após a reidratação, comparado aos desnudos (T_6) ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Influência do estágio de maturação nuclear e presença de células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito no momento da congelação sobre a viabilidade morfológica destes ovócitos após a descongelação e reidratação

T	N *	Normais		Anormais					
		N	%	Citoplasma retraído		Fratura de zona pelúcida		Perda de conteúdo celular	
				N	%	N	%	N	%
T_3	539	508	94,2 ^a	18	3,3	1	0,2	12	2,2
T_4	519	439	84,6 ^b	04	0,8	8	1,5	68	13,1
T_5	368	353	95,9 ^a	01	0,3	0	0	14	3,8
T_6	274	213	77,7 ^c	17	6,2	0	0	44	16,1

T: tratamento; T_3 : COC congelado imaturo; T_4 : desnudo congelado imaturo; T_5 : COC congelado maturado; T_6 : desnudo congelado maturado; N*: número de ovócitos recuperados

a, b, c: Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

O percentual de COC congelado imaturo (T_3) apresentando morfologia normal após descongelação e reidratação (94,2) foi superior ao percentual de COC congelado imaturo, encontrado por SCHROEDER et al. (1990), PARK et al. (1997), KUBOTA et al. (1998), COOPER et al. (1998) e SOUZA (2001), que obtiveram 69,0; 55,0; 47,0; 81,0 e 72,6%, respectivamente.

O método de congelação e descongelação, o tipo e concentração do crioprotetor utilizado e as características intrínsecas ao ovócito podem alterar a morfologia normal da célula. Isto explicaria a diferença nas taxas de ovócitos morfológicamente normais, encontradas pelos autores mencionados acima, uma

vez que o método de congelação rápida de ovócito humano, utilizado por PARK et al. (1997), e o de vitrificação de ovócito bovino utilizado por SOUZA (2001), tendem a causar mais danos estruturais do que a congelação utilizando o método convencional. SCHROEDER et al. (1990) e COOPER et al. (1998), utilizando DMSO para congelar ovócito de camundongo pelo o método convencional, obtiveram percentuais de ovócitos, morfolologicamente normais, inferiores aos encontrados no presente trabalho (69,0% e 81,0%, respectivamente). No caso de KUBOTA et al. (1998), a taxa de ovócitos morfolologicamente normais foi extremamente baixa e, provavelmente, ocorreu devido à solução de congelação utilizada, na qual associou-se EG e propanodiol, que pode ter falhado em proteger a célula, durante a congelação de COC de bovinos utilizando o método convencional.

A taxa de ovócitos morfolologicamente normais, obtida com COC congelados maturados (T_5) foi 95,9% e portanto, superior àquelas encontradas por SCHROEDER et al. (1990), OTOI et al. (1997), FABBRI et al. (1998) e KUBOTA et al. (1998), que obtiveram 81,0; 67,4; 54,0 e 72,0%, respectivamente. A ocorrência destes valores diferentes pode ser devida a protocolos e espécies diferentes, empregados por esses pesquisadores. Assim, FABBRI et al. (1998), ao congelar ovócito humano, além de usar apenas uma etapa para desidratação, aplicaram longa curva de congelação (até -150°C), o que pode ter provocado redução na taxa de ovócitos com morfologia normal, inclusive naquela dos ovócitos desnudos maturados, que correspondeu a 27,0% dos ovócitos viáveis. Além disso, esses pesquisadores alegam que a maior taxa de sobrevivência dos COC deve-se à presença das células do *cumulus oophorus*, que oferecem maior proteção contra a citotoxicidade do crioprotetor. Observando os dados obtidos por LIM et al. (1999), percebe-se que, alterando apenas uma variável no processo de congelação, no caso o crioprotetor, ocorrerá alteração no percentual de ovócitos viáveis após a reidratação. Assim, esses pesquisadores congelaram COC maturados *in vitro* de bovino em 1 mol L^{-1} de glicerol, 1 mol L^{-1} de DMSO ou 1 mol L^{-1} de propileno glicol e obtiveram 62,0; 86,0 e 83,0% de

ovócitos morfológicamente normais, respectivamente.

Entretanto, ao analisar o percentual de ovócitos anormais, em relação ao total de ovócitos recuperados, verifica-se neste experimento, baixa frequência de danos, como a inviabilidade celular pós-descongelação, relativos à morfologia, ocorridos nos ovócitos criopreservados (Tabela 2).

Alguns autores utilizam o aspecto do citoplasma do ovócito, como critério indicativo de sua sobrevivência. Assim, OTOI et al. (1997) consideraram como sobreviventes os ovócitos morfológicamente normais, que possuíam citoplasma escuro e eventualmente granulado. Aqueles apresentando citoplasma amarelo com grânulos de lipídeos polarizados foram considerados degenerados. LIM et al. (1991) observaram que o citoplasma dos ovócitos congelados apresentaram textura irregular e cor pálida, em comparação com o citoplasma dos ovócitos frescos. No presente experimento observou-se a condição de citoplasma retraído, ou não, ao final da reidratação.

SOUZA (2001) declara que o grau de retração do citoplasma é importante, pois, de acordo com sua intensidade, ele poderá comprometer, totalmente, a integridade da membrana citoplasmática e a organização das organelas do ovócito.

Alguns pesquisadores alegam que a presença de células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito dificulta a passagem de crioprotetor, de modo que tais ovócitos necessitam de maior período para reidratação. Considerando os ovócitos congelados imaturos, 18/539 (3,3%) dos COC (T₃) e 4/519 (0,8%) dos desnudos (T₄) apresentaram citoplasma retraído, ao final da reidratação. Percebe-se que a presença das células do *cumulus oophorus* em COC congelados imaturos (T₃) prejudicou a taxa de desidratação/reidratação, em relação aos ovócitos desnudos congelados imaturos (T₄) (Tabela 2). Comparando-se os COC congelados imaturos (T₃) com os COC congelados maturados (T₅), o fator diferencial será o estágio do ciclo celular. Segundo AGCA et al. (1997), a permeabilidade dos ovócitos bovinos à água e à 1,5 mol L⁻¹ de EG, é maior após a maturação *in vitro*. Assim, baseado nestas informações e de acordo com o

protocolo utilizado neste experimento, é provável que haja tempo diferencial nas etapas de desidratação e reidratação, considerando-se que a presença, ou não, das células do *cumulus oophorus* aderidas funcionam como barreira, pois, estas células atrasam a saída e entrada de crioprotetores e o estágio do ciclo celular, o que refletirá na permeabilidade da membrana plasmática deste ovócito ao crioprotetor e à água. Outro fator importante a ser considerado é o desnudamento. Aparentemente, o ideal seria desnudar levemente o ovócito, assim ele contaria com as células do *cumulus oophorus* para proteger a zona pelúcida e membrana celular, enquanto controlaria a entrada do crioprotetor. Contudo, é difícil remover, parcial e uniformemente, as células do *cumulus oophorus* em um grupo de ovócitos, podendo resultar em penetração desigual do crioprotetor, provocando uma desidratação diferencial. Por esta razão, neste experimento, adotou-se o desnudamento total do ovócito.

Considerando outras estruturas celulares, KUBOTA et al. (1998) argumentam que as mais nítidas alterações morfológicas, em ovócitos congelados, são a ruptura de zona pelúcida e lise de membrana plasmática. Neste trabalho, as alterações da zona pelúcida foram classificadas como fratura ou rompimento deste componente celular. Na tabela 2, verifica-se que apenas em COC congelados imaturos (T₃) e desnudos congelados imaturos (T₄) ocorreu fratura na zona pelúcida (0,2% e 1,5% do total de ovócitos recuperados, respectivamente), que consistia de uma ligeira interrupção da continuidade desta estrutura.

Em relação ao total de ovócitos recuperados, a incidência de perda de conteúdo celular entre os ovócitos congelados com *cumulus oophorus* (2,2% dos COC congelados imaturos e 3,8% dos COC congelados maturados) foi inferior aos 13,1% dos desnudos congelados imaturos e 16,1% dos desnudos congelados maturados. Portanto, os ovócitos desnudos, sejam eles imaturos ou maturados, apresentaram maior perda de conteúdo celular, o que confirma os resultados obtidos por CAMARGO (1995), que alega que a presença das células do *cumulus oophorus* proporciona proteção à zona pelúcida durante os processos de

congelação e descongelação de ovócitos bovinos. A presença de células do *cumulus oophorus* não evita a ocorrência de danos morfológicos, mas reduz a ocorrência de lise de zona pelúcida e de membrana plasmática, e conseqüentemente, a perda de conteúdo celular em COC congelados imaturos ou maturados.

Entretanto, apesar de exercer certa proteção física aos ovócitos, as células do *cumulus oophorus* também são afetadas pelos procedimentos de congelação. COOPER et al. (1998) congelaram COC imaturos de camundonga utilizando o método convencional, e verificaram que em todos os grupos de ovócitos recuperados ocorreu dispersão das células do *cumulus oophorus*, que estavam no ovócito quando congeladas, com muitos dos ovócitos estando completamente desnudados, quando colocados no meio de maturação. No presente experimento observou-se que as células do *cumulus oophorus* dos ovócitos submetidos à criopreservação desprendiam-se rápida e facilmente desses ovócitos, inclusive durante a reidratação. Foi observado que 62,2% (229/368) dos COC congelados maturados e 72,5% (391/539) dos COC congelados imaturos, ainda, permaneceram com as células do *cumulus oophorus* ao final do período de reidratação, sendo que 57,5% (225/391) dos COC congelados imaturos apresentavam, ao final da maturação *in vitro*, as células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito e expandidas. Além disso, observou-se neste experimento que o tempo necessário para realizar o desnudamento de ovócitos recém descongelados é menor do que tempo necessário para realizar o desnudamento de ovócitos frescos, fato anteriormente constatado por SAUNDERS e PARKS (1999). Estas informações comprovam que o procedimento de congelação altera a estrutura das células do *cumulus oophorus*, deixando-as mais frágeis e, por esta razão, elas se soltam facilmente.

Vale ressaltar que os ovócitos COC e desnudos frescos não apresentaram qualquer alteração morfológica, assim como apenas um dos 33 ovócitos submetidos ao teste de citotoxicidade do EG apresentou anormalidade morfológica ao final da reidratação, que consistia de retração do citoplasma.

Contudo, apesar de ser baixo o número de ovócitos apresentando perda de conteúdo celular, em relação ao total recuperado, esta foi a anormalidade mais freqüente encontrada entre desnudos congelados imaturos (85,0%), entre os COC congelados maturados (93,3%) e entre os desnudos congelados maturados (72,1%), enquanto os COC congelados imaturos apresentaram a retração do citoplasma como a anormalidade mais freqüente (58,1%), conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3- Freqüência de cada anormalidade em relação ao total de anormalidades ocorridas em cada tratamento

Tratamento	N*	Anormalidades					
		Citoplasma retraído		Fratura de zona pelúcida		Perda de conteúdo	
		N	%	N	%	N	%
T ₃ COC.C.I.	31	18	58,1	1	3,2	12	38,7
T ₄ D.C.I.	80	04	5,0	8	10,0	68	85,0
T ₅ COC.C.M.	15	01	6,7	0	0	14	93,3
T ₆ D.C.M.	61	17	27,9	0	0	44	72,1

T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado maturado; N*: número de ovócitos anormais.

Os ovócitos que apresentaram perda de conteúdo celular possuíam, obrigatoriamente, a membrana citoplasmática e a zona pelúcida rompidas. É esperado que se o tratamento é capaz de danificar a membrana, unidade básica da estrutura celular, o ovócito não seja mais capaz de sobreviver ou reconstituir-se.

Estes resultados indicam que os passos, seguidos no procedimento de congelação convencional, causam alterações irreversíveis em múltiplos componentes celulares de ovócitos bovinos, demonstrando a necessidade de melhores estratégias no sentido de prevenir a formação de danos decorrentes do procedimento de congelação.

Conforme observado neste estudo e de acordo com SAUNDERS e PARKS (1999), existem certas limitações para o uso da morfologia do ovócito,

como base para a sobrevivência após descongelação e reidratação. Quando os ovócitos são examinados para sobrevivência, sem proceder à remoção das células do *cumulus oophorus*, valores altos podem ser obtidos devido a uma aparência normal. Quando as células do *cumulus oophorus* são removidas, os ovócitos podem ser posicionados mais objetivamente, mas a estimativa de sobrevivência após a descongelação e reidratação permanece um indicador incorreto de viabilidade, conforme observado nas etapas posteriores de cultivo *in vitro*.

4.3. Efeitos do processo de congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a maturação *in vitro* dos ovócitos

O percentual de ovócitos dos tratamentos T₁ (COC.F.), T₂ (D.F.), T₃ (COC.C.I.) e T₄ (D.C.I.), que alcançaram o estágio de metáfase II, é apresentado na Tabela 4. O índice de ovócitos em metáfase II foi semelhante ($P>0,05$) entre os COC e desnudos frescos (T₁ e T₂, respectivamente), bem como entre COC e desnudos congelados imaturos (T₃ e T₄), respectivamente. Os ovócitos congelados imaturos (T₃ e T₄) apresentaram percentagens bem menores ($P<0,01$) do que os ovócitos frescos (T₁ e T₂). Portanto, a congelação utilizando o EG pelo método convencional provocou efeitos deletérios sobre os ovócitos, reduzindo o percentual de ovócitos que alcançaram o estágio de metáfase II, comparado aos ovócitos frescos.

Considerando os COC frescos (T₁) submetidos à maturação *in vitro* durante 24 horas, 82,5% (165/200) culminaram em MII. Tal taxa de MII de COC frescos foi similar àquelas encontradas por PARK et al. (1997), IM et al. (1997), SAUNDERS e PARKS (1999), SOUZA (2001) e BRANDÃO (2001), os quais obtiveram 81,0; 88,0; 76,0; 83,9 e 82 %, respectivamente.

Tabela 4 - Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a maturação *in vitro* em ovócitos com *cumulus oophorus* (T₃) ou desnudados (T₄)

Tratamento	N	MII*	AI*	MI*	PI*	CC*	SCC*
T ₁ COC.F.	200	82,5 ^a	1,0	14,0	0,0	0,5	5,0
T ₂ D.F.	69	75,4 ^a	4,3	4,3	0,0	4,3	11,6
T ₃ COC.C.I.	174	9,2 ^b	5,7	3,4	9,2	60,9	11,5
T ₄ D.C.I.	156	5,8 ^b	1,3	3,2	23,1	29,5	37,2

*em percentual ; N: número de ovócitos avaliados

T₁: COC fresco; T₂: desnudo fresco; T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo.

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

a, b: Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P < 0,05) pelo teste do qui-quadrado.

Inicialmente, alguns pesquisadores usaram a expansão das células do *cumulus oophorus* como critério para classificar um ovócito como maturado. Entretanto, em uma das repetições do presente experimento em que nenhum dos ovócitos frescos apresentou expansão das células do *cumulus oophorus* após o processo MIV, foi obtido 82,3 % de MII. Tal fato reafirma declarações de outros pesquisadores (CAMARGO, 1995; SOUZA, 2001), que declararam que a expansão das células do *cumulus oophorus* não é indicativo de maturação nuclear, nem para MIV de ovócitos frescos, tampouco para ovócitos previamente congelados imaturos.

A maior parte dos ovócitos desnudos frescos (T₂) (75,4%) alcançaram o estágio de MII (Figura 3), apresentando um valor semelhante aos 78,0% obtidos por IM et al. (1997). Entretanto, a escassez de dados referentes à maturação *in vitro* de ovócitos frescos previamente desnudados dificulta uma melhor comparação de resultados, neste tratamento.

Quando os ovócitos foram congelados imaturos, a taxa de MII obtida após eles serem descongelados, reidratados e submetidos à maturação *in vitro* caiu para 9,2% nos COC congelados imaturos (Figura 4) e 5,8% nos ovócitos desnudos congelados imaturos. Estes resultados são muito inferiores aos de IM et al. (1997), que obtiveram 44,0% dos COC e 30,0% dos desnudos bovinos congelados imaturos atingindo o estágio de MII, após serem criopreservados em $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de propileno glicol utilizando o método convencional. KUBOTA et al. (1998) obtiveram 54,0% de MII para COC de bovinos congelados imaturos, valor este superior ao encontrado no presente experimento, e embora empregando o método convencional, os autores utilizaram o EG associado a 1,2 propanodiol e à sacarose. PARK et al. (1997) congelaram COC imaturos de humanos, empregando o método rápido, utilizando $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de 1,2 propanodiol e obtiveram 61,0% de ovócitos em MII. Considerando a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, SOUZA (2001) obteve 17,5% e 0,0% de maturação dos COC e desnudos, respectivamente, utilizando o EG, enquanto BRANDÃO (2001) obteve 8,3% de maturação dos COC utilizando DMSO associado ao EG e à sacarose.

Vale ressaltar que, embora tenha sido obtida uma baixa taxa de ovócitos anormais após a descongelação e reidratação dos COC e desnudos imaturos, em relação ao total de ovócitos recuperados (Tabela 2), verificou-se que poucos ovócitos considerados, morfológicamente, normais alcançaram o estágio de MII (Tabela 4). Segundo WU et al. (1999), a criopreservação pode alterar a atividade de fatores reguladores, sobretudo as proteínas, de tal forma que o reinício da meiose não consiga ser realizado ou a maturação seja alterada. Tal fato evidencia que critérios morfológicos podem ser utilizados para pré-seleção, mas não devem ser empregados para determinar a sobrevivência dos ovócitos à criopreservação, e que fatores bioquímicos foram afetados. A documentação de danos celulares, durante ou após o processo de criopreservação, fornece informações importantes sobre a sensibilidade celular frente à criopreservação. A partir de tais

informações, poderão ser elaborados protocolos mais adequados para a criopreservação de ovócitos, maximizando o número de descendentes viáveis.

A congelação produz efeito deletério sobre todos os componentes celulares (SAUNDERS & PARKS 1999). Alguns pesquisadores têm constatado que o citoesqueleto sofre injúrias, durante o processo de criopreservação, entretanto não impedindo a maturação nuclear, mas prejudicando a reorganização dos cromossomos em MII (não sendo observada tal configuração). Segundo PICKERING et al. (1990), a exposição à crioprotetores e à baixa temperatura pode causar despolimerização de microtúbulos, acompanhada por conseqüente dispersão dos cromossomos da placa metafásica com risco de aneuploidias para o zigoto. Adicionalmente, KIM et al. (1996) preconiza que tanto a extrusão do corpúsculo polar quanto a organização da cromatina em MII necessitam que a estrutura de microtúbulos e microfilamentos esteja normal e funcional. De fato, no presente experimento, poucos ovócitos submetidos à congelação, em cada tratamento, tinham um arranjo cromossômico normal em relação aos não congelados, o que se pode ser observar na Figura 4. Além disso, foi observado durante a confecção das lâminas que os ovócitos submetidos à criopreservação hipotonizam menos.

No presente experimento, observou-se que 96,7% dos ovócitos submetidos ao teste de citotoxicidade do etileno glicol alcançaram o estágio de MII. Este percentual foi superior ao obtido para os ovócitos do grupo fresco, mas pode ser considerado como casualidade, visto que os dados para MII do grupo exposto foi realizado em única repetição. Outros pesquisadores testaram a citotoxicidade do crioprotetor usado em seus experimentos. Assim, IM et al. (1997) obtiveram 77,0% de MII para COC e 59,% de MII para desnudos imaturos expostos a 1,2 propanodiol. PARK et al. (1997) colocaram COC imaturos humanos em solução contendo 1,2 propanodiol e obtiveram 64,5 % de MII. Adicionalmente, COOPER et al. (1998) observaram que os COC permaneceram intactos, quando expostos apenas ao DMSO, e alegaram que o fato de a exposição ao DMSO sem congelação não ter tido nenhum efeito sobre a

maturação, é um indicativo que o resfriamento/congelamento ou suas conseqüências induzem mudanças, podendo destruir conexões intercelulares que envolvem os ovócitos. Portanto, baseado no presente experimento e em outros estudos, pode-se afirmar que a perda da viabilidade, em ovócitos bovinos congelados, estava associada à etapa específica no processo de criopreservação, visto que a exposição ao EG, além de não provocar alterações na membrana celular e zona pelúcida, não impediu que os ovócitos alcançassem o estágio de metáfase II.

Ao avaliar as configurações cromossômicas, mediante leitura de lâminas de maturação foi constatado que, em relação aos ovócitos que alcançaram o estágio de metáfase II após serem submetidos à maturação *in vitro*, o primeiro corpúsculo polar (CP) estava presente em 69,7%, 59,6%, 82,8%, 50,0% e 22,2% dos COC frescos, dos desnudos frescos, dos ovócitos expostos ao EG sem criopreservação, dos COC congelados imaturos e dos desnudos congelados imaturos, respectivamente.

Em tratamentos, nos quais os ovócitos não foram congelados (T₁ e T₂), poucos ovócitos não alcançaram o estágio de MII (Tabela 4). Quanto aos COC frescos (T₁), houve retomada da meiose, ou seja, saída do estágio de PI e tentativa de progresso a MII, em 30/35 ovócitos que não alcançaram MII, enquanto apenas 6/17 dos desnudos estavam nesta condição.

Foi observado também que 90,8% dos COC congelados imaturos (T₃) e 94,2% dos ovócitos desnudos congelados imaturos (T₄) não alcançaram o estágio de metáfase II. Pode ser considerado que 16/158 dos COC congelados imaturos e 7/147 dos desnudos congelados imaturos, que não alcançaram o estágio de MII, retomaram a meiose. Foi constatado também que 9,2% dos COC congelados imaturos (T₃) e 23,1% dos desnudos congelados imaturos (T₄) apresentaram configuração cromossômica em PI. Baseado no fato de que a confecção da lâmina foi realizada ao final do período de 24 horas de maturação *in vitro*, pode-se considerar que tais ovócitos estavam estacionários.

Em todos os tratamentos (Tabela 4), observaram-se ovócitos que apresentaram condensação da cromatina (CC). Considerando os ovócitos

congelados imaturos, 60,9% dos COC e 29,5% dos desnudos apresentaram cromatina condensada, após 24 horas de maturação *in vitro*, sendo que, em alguns casos, os cromossomos formaram pequenos grupos (Figura 5), ou apresentaram-se dispersos (Figura 6). A condensação da cromatina é um evento regulado pelo fator promotor de maturação (MPF) e ocorre na fase de pré metáfase I (PMI) (STOJKOVIC et al. 1999) constituindo, portanto, um mecanismo bioquímico essencial ao prosseguimento do ciclo celular. Entretanto, outro processo celular, a apoptose, caracteriza-se por condensação da cromatina e subsequente fragmentação de DNA (CROSS, 2001; FARIN et al., 2001). Neste experimento, a condensação da cromatina esteve, geralmente, associada a um citoplasma com aspecto vacuolizado.

A classificação sem configuração cromossômica (SCC) é atribuída a ovócitos nos quais não foi observado nenhum cromossomo. Comumente, isto é sinal de degeneração. Foi observado que COC frescos apresentaram a menor taxa de ovócitos sem configuração cromossômica (5,0%), dentre todos os tratamentos. Os índices de SCC foram semelhantes entre os desnudos frescos (T₂) e COC congelados imaturos (T₃) (11,6 e 11,5%, respectivamente); entretanto, ovócitos desnudos congelados imaturos (T₄) (Figura 7) apresentaram a maior ocorrência de SCC (37,2%).

No tratamento 2 (desnudo fresco), na ausência de células do *cumulus oophorus*, pode ter ocorrido ausência de algum fator que fizesse cessar seu mecanismo bioquímico e na carência, entrado em degeneração, o que teria causado a alta percentagem de SCC em desnudos frescos, comparados aos COC frescos. IM et al. (1997) preconizam que, em bovinos, a presença das células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito é importante para maturação *in vitro* de ovócitos congelados imaturos e argumentam que a baixa taxa de ovócitos desnudos pode ser devida a danos nas junções “gap” por remoção das células do *cumulus oophorus*.

FUKU et al. (1995) alegam que a retirada das células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito (desnudamento), antes da quebra da vesícula

germinal, período em que o desligamento ocorreria normalmente, poderia eliminar a comunicação metabólica essencial para aquisição de componentes necessários ao processo de maturação, bem como ser uma das razões para a menor capacidade de maturação de ovócitos criopreservados.

Contudo, considerando ovócitos criopreservados imaturos (COC e desnudos), além da degeneração, a condição SCC pode ser um indício de ausência de cromossomos e estar indiretamente relacionado às alterações morfológicas decorrentes do processo de criopreservação, uma vez que pode ter ocorrido perdas de conteúdo celular muito sutis, que não foram detectadas durante a avaliação morfológica, permitindo que tais ovócitos fossem submetidos aos procedimentos subseqüentes. Assim, a não-visualização dos cromossomos pode ser devida à perda efetiva deles, e não à degeneração dos mesmos. É possível que a degeneração seja uma condição apenas acelerada pela criopreservação, muito mais do que uma consequência direta.

Segundo SATHANANTHAN et al. (1987), os ovócitos obtidos por aspiração folicular encontram-se em diferentes fases de maturação. Com a preocupação que os ovócitos selecionados para os tratamentos T₃ e T₄ fossem imaturos, e que a maturação dos ovócitos dos demais tratamentos estaria ocorrendo *in vitro*, no presente experimento, 42 ovócitos recém-selecionados foram submetidos à técnica de avaliação da maturação nuclear. Foi constatado que 42/42 ovócitos, recém-selecionados para os vários procedimentos deste trabalho, estavam em PI (Figura 8). É interessante observar que, entre os ovócitos frescos submetidos à maturação *in vitro*, nenhum ficou retido em PI (Tabela 4), uma vez que ou eles retomaram a meiose e, portanto, alcançaram os estádios de MI, AI ou MII ou foram classificados como CC ou SCC. Portanto, o estágio de MII encontrado nos ovócitos deste experimento foi alcançado durante a maturação *in vitro*.

Algumas alternativas têm sido procuradas para amenizar os efeitos da congelação sobre o ovócito. Uma delas, a permanência das células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito no momento em que este é congelado, é alvo de

controvérsia entre pesquisadores. As células do *cumulus oophorus* podem evitar desidratação excessiva do ovócito e, de certa forma, controlar a entrada do crioprotetor. Adicionalmente, IM et al. (1997) declararam que é importante, para o processo MIV, que as células do *cumulus oophorus* estejam aderidas ao ovócito bovino congelado imaturo e que o co-cultivo de ovócitos desnudos com células da granulosa não substitui seu efeito. Adicionalmente, PAYNTER et al. (1999) alegam que, para alcançar a maturação *in vitro*, é muito importante que a organização e a estrutura celular permaneçam normais, não apenas o ovócito em maturação, mas, também as camadas de células que o envolvem (teca e granulosa) que são essenciais a vários processos de sinalização. Entretanto, conforme discutido anteriormente, a criopreservação afeta também as células do *cumulus oophorus*.

Outro procedimento que visa melhorar a viabilidade celular após a descongelação, mediante à fecundação *in vitro*, consiste em submeter o ovócito congelado após a maturação *in vitro* a um curto período de recultivo, para que organelas e citoesqueleto celulares se reorganizem. Por esta razão, IM et al. (1997) concluíram que a pre-incubação de ovócitos bovinos antes da inseminação pode superar injúrias causadas pela descongelação. Entretanto, AMAN e PARKS (1994) declararam que o fuso de ovócitos bovinos resfriados não é, completamente, restaurado após o reaquecimento.

Portanto, a estimativa de viabilidade após a descongelação, baseado em critérios morfológicos, permanece como um indicador incorreto, conforme verificado no desenvolvimento posterior dos ovócitos.

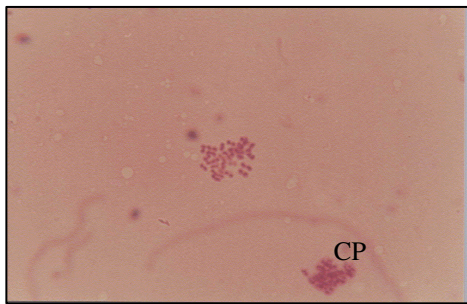


Figura 3 - Ovócito desnudo fresco (T_2) em metáfase II (1000X).



Figura 4 - COC congelado imaturo (T_3) em metáfase II (1000X).

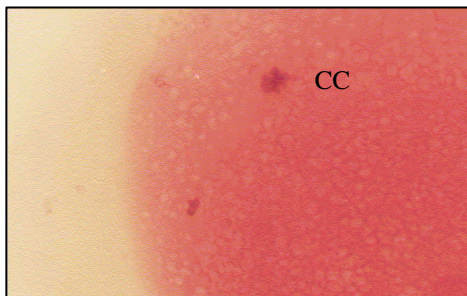


Figura 5 - COC congelado imaturo (T_3) apresentando cromatina condensada (CC) (1000X).

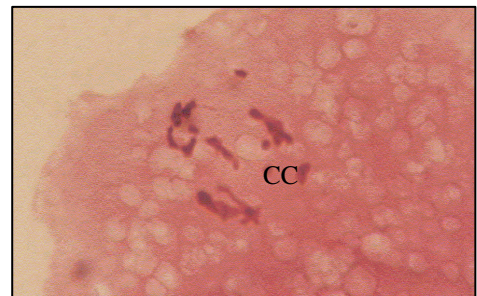


Figura 6 - Ovócito desnudo congelado imaturo (T_4) apresentando cromatina condensada (CC) (1000X).



Figura 7 - Ovócito desnudo congelado imaturo (T_4) sem configuração cromossômica (1000X).

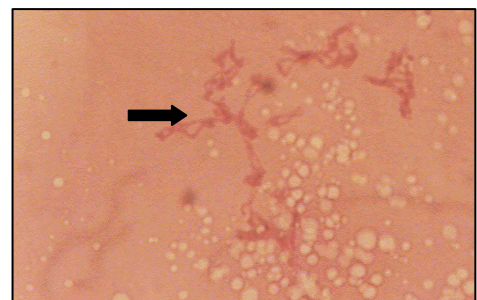


Figura 8 - Ovócito recém-selecionado apresentando configuração cromossômica em prófase I (1000X)

4.4. Efeitos do processo de congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a fecundação *in vitro*

Os resultados relativos à fecundação *in vitro* dos ovócitos, nos seis tratamentos, estão apresentados na Tabela 5. Os resultados dos tratamentos 1 e 3 foram semelhantes ($P>0,05$) quanto à percentagem de ovócitos fecundados. Houve semelhança também ($P>0,05$) entre os ovócitos de T₁ e T₅, T₂ e T₄, assim como entre T₄ e T₆. Os ovócitos desnudos de todos os tratamentos (T₂, T₄ e T₆) apresentaram as menores percentagens de fecundação, sendo que houve diferença ($P<0,01$) entre T₁ e T₂ e entre T₁ e T₆, assim como entre T₁ e T₄ ($P<0,05$). Houve diferença ($P<0,05$) entre os demais tratamentos.

A taxa de fecundação dos COC frescos (T₁) foi 56,2%, resultado este inferior aos encontrados por OTOI et al. (1997) e SOUZA (2001), os quais obtiveram 73,8 e 70,0% de COC frescos de bovinos, respectivamente.

No tratamento 2 (D.F.), entre as lâminas preparadas não foi identificada, em nenhum ovócito, indicação de ocorrência de penetração espermática. Entretanto, neste tratamento, houve registro de clivagem. Ovócitos e espermatozóides de todos os tratamentos permaneceram 12 horas coincubados e, após este período, foi retirada uma amostra para verificar a taxa de fecundação enquanto os restantes, quando viáveis, foram submetidos ao cultivo *in vitro*. Entretanto, a presença das células do *cumulus oophorus* e o procedimento de criopreservação podem interferir de maneira a atrasar a penetração do espermatozóide. Portanto, possivelmente, a penetração nos ovócitos (no tratamento 2), ocorre mais cedo do que os demais pelo fato dos mesmos serem não congelados e desprovidos de células do *cumulus oophorus*. Assim, no momento em que a amostra foi retirada para avaliar a taxa de fecundação destes ovócitos, não foi possível visualizar estruturas que indicassem que a fecundação já havia ocorrido.

Tabela 5 - Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a fecundação *in vitro*

Tratamentos	Inseminados	Fecundados		Não fecundados	
	N	N	%	T	CC/SCC
T ₁ COC.F.	73	41	(56,2) ^{a, b}	32	NE
T ₂ D.F.	33	0	(0) ^d	33	NE
T ₃ COC.C. I.	31	12	(38,7) ^b	19	18
T ₄ D.C.I.	35	03	(8,6) ^{c, d}	32	31
T ₅ COC.C. M.	33	21	(63,6) ^a	12	10
T ₆ D.C.M.	36	06	(16,7) ^c	30	24

T₁: COC fresco; T₂: desnudo fresco; T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado maturado; NE: não examinado

a, b, c, d: letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P< 0,05) entre os valores.

Na literatura, é comum encontrar autores que atribuem a baixa taxa de fecundação de ovócitos congelados ao endurecimento da zona pelúcida, independentemente da espécie, do estágio do ciclo celular no qual o ovócito foi congelado e do protocolo utilizado. Segundo WOOD et al. (1992) a inibição da fertilização induzida pela congelação ocorre, primariamente, na zona pelúcida. Entretanto, há estudos que avaliam a taxa de penetração espermática de ovócitos previamente submetidos ao processo de congelação, como o de ASADA e FUKUI (2000). Todavia, no presente experimento foram obtidos 38,7% de fecundação para COC congelados imaturos (T₃), sendo que este valor é superior aos 27,8% obtidos por OTOI et al. (1995), que congelaram ovócito bovino, utilizando 1,8 mol L⁻¹ de EG pelo método convencional, usando apenas uma etapa de desidratação. Contudo, SAUNDERS e PARKS (1999) declararam que, além do endurecimento prematuro da zona pelúcida bloquear a fertilização completamente (impedindo-a) ou parcialmente (permitindo a entrada de mais de

um espermatozóide), a destruição do sistema de microtúbulos no fuso meiótico, durante resfriamento, pode resultar na perda da capacidade de fecundação e de desenvolvimento do ovócito bovino.

A taxa de fecundação dos ovócitos COC congelados maturados (T₅) foi de 63,6% e, portanto, superior aos 38,6% obtidos por OTOI et al. (1997), mas ligeiramente inferior àquela obtida por LIM et al (1999). Entretanto, esse autor utilizou tipo e concentração diferentes dos usados no presente estudo, obtendo 79,0; 76,0 e 59,0% de fecundação, quando congelou COC maduros utilizando DMSO, PrOH e glicerol, todos à concentração de 1 mol L⁻¹.

Segundo WOOD et al. (1992) a presença de células do *cumulus oophorus* reduz o grau de endurecimento da zona pelúcida, observada em ovócitos maduros após incubação *in vitro*. Se o oposto é verdadeiro, esta pode ser a razão da baixa taxa de fecundação de ovócitos congelados desnudos. Adicionalmente, devido ao endurecimento da zona pelúcida, os espermatozóides que a atravessam são incapazes de realizar a fecundação propriamente dita, pois, já possuem reduzida reserva de energia. No presente experimento, os desnudos congelados imaturos (T₄) e os desnudos congelados maturados (T₆) apresentaram as menores taxas de fecundação dentre os congelados, ou seja, 8,6 e 16,7%, respectivamente. Estes resultados são superiores aos de SOUZA (2001), que não registrou fecundação, ao vitrificar ovócitos desnudos imaturos. Entretanto, é difícil comparar esses resultados, pois, existem poucos estudos relacionados à criopreservação de ovócitos desnudos, sejam imaturos ou após a maturação *in vitro*.

Constatou-se que todos os COC frescos (T₁) e desnudos congelados imaturos (T₄) considerados fecundados foram penetrados por um único espermatozóide. Entretanto, os tratamentos T₃, T₅ e T₆ apresentaram poliespermia. Assim, a percentagem de ovócitos fecundados, nos quais ocorreu a poliespermia, foi similar entre os COC congelados imaturos (25,0%) e COC congelados maturados (23,8%), sendo que, no tratamento 5, houve penetração de no mínimo dois e no máximo dez espermatozóides, enquanto 100% dos desnudos

congelados maturados foram penetrados por dois espermatozóides. FUKU et al. (1995) encontraram ovócitos congelados imaturos apresentando maior tendência à poliespermia do que os congelados maturados.

Para amenizar os efeitos da congelação e na tentativa de fornecer à célula um período para se recompor, muitos pesquisadores têm optado por submeter o ovócito já maturado a um período de recultivo, a fim de melhorar a capacidade de fecundação e de desenvolvimento embrionário. Contudo, SAUNDERS e PARKS (1999) relatam que a estrutura normal do fuso não foi recuperada, após 3 horas de incubação, assim como, após esse período, houve redução na configuração cromossômica normal.

PARKS e RUFFING (1992) declaram que os ovócitos imaturos parecem ser mais sensíveis aos crioprotetores do que os ovócitos maturados *in vitro*. ARAV et al. (1996) concluíram que a membrana plasmática do ovócitos bovinos imaturos é mais sensível ao resfriamento do que a membrana plasmática do ovócito em MII. Ovócitos maturados *in vitro* apresentam outros locais de danos, como microtúbulos e microfilamentos, que, provavelmente, estão relacionados à fertilização poliespermática.

4.5. Efeitos do processo de congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem, obtida no presente experimento (36,3%) para os COC frescos (T_1), é inferior à obtida por SAUNDERS e PARKS (1999) e SOUZA (2001), que encontraram 53,3% e 44,0% de clivagem, respectivamente, para COC frescos. Em relação aos clivados, 34,5% dos COC frescos alcançaram o estágio de mórula ou blastocisto, enquanto SOUZA (2001) obteve 21,4%. Apenas 7,9% dos ovócitos desnudos frescos (T_2) clivaram. Conforme relatado anteriormente é difícil comparar resultados de ovócitos desnudos em virtude da escassez de dados na literatura.

Considerando os ovócitos congelados, no presente trabalho houve clivagem apenas no tratamento 3 (Tabela 6), no qual foi obtido 0,4% de clivagem para COC congelado imaturo. Valores também baixos, como o descrito anteriormente, foram registrados por SCHELLANDER et al. (1994), que obtiveram 5,5 e 18,0% de clivagem para COC de bovinos congelados imaturos e maturados, respectivamente, em $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de DMSO. OTOI et al. (1995) obtiveram 2,9% e 5,1% de clivagem para COC imaturos e COC maturados utilizando $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ pelo método convencional. Entretanto, esse autor usou o TCM como meio-base para a solução de congelação. SAUNDERS e PARKS et al. (1999) obtiveram 7,8% de clivagem dos COC congelados maturados. ASADA e FUKUI (2000) obtiveram, em bovinos, 16,3% de clivagem dos COC congelados maturados, ao associar $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ de EG à $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose no meio de congelação, empregando etapa única de 10 minutos de desidratação, utilizando o método convencional.

BERNARD e FULLER (1996) chamam atenção para um efeito da exposição ao crioprotetor, que incorretamente é atribuído à partenogênese que ao nível de microscopia óptica é o desenvolvimento de bolhas, que podem ter aparência de clivagem. Entretanto, tais vesículas contêm pouco material citoplasmático e desenvolvem-se muito rapidamente, após exposição ao crioprotetor, descartando, então, a possibilidade de a clivagem ocorrida em T₃ ser devida a este fenômeno.

Para o fato de os ovócitos bovinos, congelados em estágio de vesícula germinal, produzirem taxa de clivagem menor do que aquelas dos ovócitos não congelados, SUZUKI et al. (1996) sugerem a ocorrência de algum dano na membrana e extensa desorganização do ooplasma, durante a congelação e descongelação, resultantes da formação de gelo intracelular ou estresse osmótico, o que pode ter interferido na subsequente fertilização e desenvolvimento do ovócito.

SCHROEDER et al. (1990) fizeram algumas observações importantes, tais como o “bloqueio” decorrente dos efeitos danosos da congelação, que ocorre

aparentemente no estágio de duas células. Segundo esses pesquisadores, em células que não sofreram o bloqueio neste estágio, o desenvolvimento do ovócito a mórula ou blastocisto não foi afetado. Além disso, declararam que os ovócitos desnudados antes da maturação *in vitro* exibiram menor capacidade de desenvolvimento do que os ovócitos envoltos por *cumulus oophorus*.

Tabela 6 - Efeitos da congelação utilizando o EG pelo método convencional sobre a clivagem e o desenvolvimento embrionário

Tratamentos	Cultivados <i>in vitro</i>	Clivados		Mórulas e Blastocistos	
	N	N	%	N	%
T ₁ COC.F.	383	139	(36,3)	48	(34,5)
T ₂ D.F.	63	05	(7,9)	0	
T ₃ COC.C. I.	226	01	(0,4)	0	
T ₄ D.C.I.	169	0		0	
T ₅ COC.C. M.	188	0		0	
T ₆ D.C.M.	137	0		0	

T₁: COC fresco; T₂: desnudo fresco; T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado maturado.

IM et al. (1997) testaram o efeito da pré incubação antes da inseminação e verificaram que os ovócitos congelados após maturação *in vitro* por 24 horas e não submetidos ao recultivo obtiveram 42% de clivagem, enquanto aqueles submetidos à maturação *in vitro* por 21 horas e recultivados por duas horas resultaram em 51% de clivagem.

Além da falha de fecundação, a não ocorrência de clivagem e desenvolvimento embrionário podem ser atribuídos a outros fatores. Alguns ovócitos não se desenvolverão, independentemente do protocolo utilizado assim como condições adversas (expressão gênica), fertilidade cruzada e origem dos ovócitos. Quanto aos ovócitos submetidos à criopreservação, supõe-se que eles,

após serem descongelados e submetidos à FIV e CIV, apresentam clivagem irregular e retardada, assim como retardamento na formação de blastocisto, comparativamente ao controle. Além disso, LANE et al. (2000) alegam que a baixa taxa de clivagem de embriões, após a criopreservação, é consequência de alterações no metabolismo e queda na produção de energia, decorrente da reduzida habilidade de regulação do pH intracelular (pHi). Estes autores observaram que, até seis horas após o aquecimento, os embriões não haviam restituído o sistema regulatório de pHi, que havia sido alterado pelo processo de criopreservação.

5. CONCLUSÕES

Não existe relação entre a aparência morfológica do ovócito criopreservado e sua capacidade de maturar *in vitro*, o que indica que a avaliação morfológica não pode ser utilizada como critério definitivo.

Ovócitos desnudos congelados pelo método convencional apresentam maior perda de conteúdo celular.

A classificação das anormalidades morfológicas, encontradas após a descongelação, mostrou ser um importante subsídio para a correlação com prováveis causas de injúrias, facilitando, assim, o aperfeiçoamento da técnica.

Ovócitos congelados utilizando o método convencional exibem expansão das células do *cumulus oophorus* sem maturação nuclear do mesmo, evidenciando que esta característica não é uma boa indicação morfológica de maturação *in vitro*, tal como ocorre com os frescos.

A presença de células do *cumulus oophorus* não influenciou na taxa de ovócitos que alcançaram metáfase II.

A congelação reduziu o número de ovócitos que alcançaram o estágio de metáfase II, comparativamente aos frescos.

A criopreservação de ovócitos imaturos e maturados de bovinos, utilizando o método convencional, ainda não apresenta resultados consistentes e com repetibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, J. P.; LARESE, A.; YANG, H.; PETRENKO, A.; McGANN, L. E. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. **Cryobiology**, v. 38, p. 363-371, 1999.
- AGCA, Y.; LIU, J.; PETER, A. T.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Cryoprotectant and water permeability of immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 340, 1997.
- ALLER, J. F.; ALBERIO, R. H.; LOVANNITTI, B.; CABODEVILA, J. Criopreservación de embriones mamíferos IIa. Parte. Métodos de congelación de embriones. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.77, n.3, p. 228 - 232, 1996.
- AMAN, R. R.; PARKS J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, n.1, p. 103-110, 1994.
- ARAKAWA, T.; CARPENTER, J. F.; KITA, Y.A.; CROWE, J. H. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis. **Cryobiology**, v. 27, p. 401-415, 1990.
- ARAV, A.; RUBINSKY, B.; SEREN, E.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. The role of thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.41, p. 107-112, 1994.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S. B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; CROWE, J. H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, n. 33, p. 589-599, 1996.

- ASADA, M; FUKUI, Y. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.54, p. 889-898, 2000.
- AVERY, B.; GREVE, T. Some aspects of bovine IVP. **Ars Veterinária**, v.9, n.2, p. 35-71, 1993.
- BAKA, G.; TOTH, T. L.; VEECK, L. L.; JONES, H. W.Jr.; MUASHER, J.; LANZENDORF, S. E. Formation of the spindle apparatus of *in-vitro* matured human oocytes following cryopreservation. **Human Reproduction**, p. 1816-1820, 1995.
- BARNES, F. L.; DAMIANI, P.; LOONEY, C. R.; DUBY, R. T. The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 183, 1997.
- BAVISTER, B. D.; BALL, G. D.; LEIBFRIED, M. L.; LENZ, R. W.; AX, R. L.; FIRST, N. L. Factor affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v.28, p. 717-725, 1983.
- BEDFORD, J. M.; KIM, H. H. *Cumulus oophorus* as a sperm sequestering device *in vitro*. **J. Exp. Zool.**, v. 265, p. 321-328, 1993.
- BEM, A. R.; FREITAS, V. C.; SOUZA, R. V.; RUMPF, R.; PEGORARO-RUMPF, L. M. Cryopreservation of immature of oocyte bovine using 1,2 propanediol and glycerol as cryoprotector. In: RÉUNION ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 9, 1993, LYON, **Anais**, Lyon, p. 184, 1993.
- BERNARD, A.; FULLER, B. J. Cryopreservation of human oocytes; a review of current problems and perspectives. **Human Reproduction Update**, v.2, n. 3, p. 193-207, 1996.
- BRANDÃO, D. O. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação *in vitro***. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 68p. Tese de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.
- CAMARGO, L. S. A. **Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos com 1,2 propanodiol**. Itaguaí: UFRRJ, 1995. 62p. Tese (Mestrado.em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.
- CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 2, p. 103-120, 1998.

- COOPER, A.; PAYNTER, S. J.; FULLER, B. J.; SHAW, R. W. Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation *in vitro* in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p. 971-978, 1998.
- COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "in vitro"**. Belo Horizonte: UFMG, 1994. 155p., Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- CROSS, J. C. Genes regulating embryonic and fetal survival. **Theriogenology**, v. 55, n.1, p. 193-207, 2001.
- DHALI, A.; MANIK, R. S.; DAS, S. K.; SINGLA, S. K., PALTA, P. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 159-165, 2000.
- DIDION, B. A.; POMP, D.; MARTIN, M. J.; HOMANICS, G. E.; MARKERT, C. L. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Journal Animal Science**, v. 68, p. 2803-2810, 1990.
- DILLER, K. R. Engineering-based contributions in cryobiology. **Cryobiology**, v. 34, p. 304-314, 1997.
- DINARA, S.; SENGOKU, K.; TAMATE, K.; HORIKAWA, M.; ISHIKAWA, M. Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. **Human Reproduction**, v.16, n.9, p. 1976-1981, 2001.
- DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.
- FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M. R.; SERACCHIOLI, R.; CIOTTI, P. M.; MAGRINI, O.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Oocyte cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 98-108, 1998.
- FARIN, P. W.; CROSIRE, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n.1, p. 151-170, 2001.
- FUJIMOTO, T.; CHOI, Y. H.; BRAUN, J.; OGURI, N. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. **Theriogenology**, v. 42, p. 1085-1094, 1994.

- FUKU, E.; LIU, J., DOWNEY, B. R. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 40, p. 177-185, 1995.
- GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Ovogênese em mamíferos: aspectos fisiológicos das divisões celulares. **Ciência e Cultura**, v. 42, n.1, p. 5-12, 1990.
- HERLLER, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Effects of cryoprotectants on fertilization and cleavage of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 35, p. 212, 1991.
- HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 161-168, 1996.
- HUNTER, J. E.; BERNARD, A.; FULLER, B.; AMSO, N.; SHAW, R. W. Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryopreservation: a comparison of two techniques. **Human Reproduction**, v. 6, p. 1460-1465, 1991.
- HUNTER, J. E.; BERNARD, A.; FULLER, B. J.; McGRATH, J. J.; SHAW, R. W. Measurements of the membrane water permeability (Lp) and its temperature dependence (activation energy) in human fresh and failed-to-fertilize oocytes and mouse oocyte. **Cryobiology**, v. 29, p. 240-249, 1992.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **J. Reprod Fert.**, Suppl. v. 38, p. 35-47, 1989.
- IM, K. S.; KANG, J. K.; KIM, H. S. Effects of *cumulus* cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 881-891, 1997.
- KIM, N. H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R. S. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 248-255, 1996.
- KUBOTA, C.; YANG, X.; DINNYES, A.; TODOROKI, J.; YAMAKUCHI, H.; MIZOSHITA, K.; INOHAE, S.; TABARA, N. *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 281-286,

1998.

- LANE, M.; LYONS, E. A.; BAVISTER, H. D. Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 389-394, 2000.
- LEDDA, S.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v. 55, p. 1359-1371, 2001.
- LE GAL, F. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, p. 1175-1185, 1995.
- LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, p. 290-300, 1999.
- LEIBO, S. P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; POLLARD, J. W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 45-53, 1996.
- LIM, J. M.; FUKUI, Y.; ONO, H. The post thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1225-1235, 1991.
- LIM, J. M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 37, n. 2, p. 351-361, 1992.
- LIM, J. M.; KO, J. J.; HWANG, W. S.; CHUNG, H. M.; NIWA, K. Development of *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 51, p. 1303-1310, 1999.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.
- MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys.**, v. 17, p. 53-92, 1990.
- MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, S. E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Theriogenology**, v. 40, p. 121-134, 1993.

- MOOR, R. M.; CROSBY, L. M. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. **Journal Reproduction Fertility**, v. 75, p. 467-473, 1985.
- MOOR, R. M.; DAI, Y.; LEE, C.; FULKA, J. Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 3, p. 223-236, 1998.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 109-124, 1991.
- OHGODA, O.; NIWA, K.; YUHARA, M.; TAKAHASHI, S.; KANOYA, K. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. **Theriogenology**, v. 29, p. 1375-1381, 1988.
- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; TAKAGI, M.; SUZUKI, T. Developmental competence of bovine oocytes frozen at different cooling rates. **Cryobiology**, v. 31, p. 344-348, 1994.
- OTOI T.; YAMAMOTO K.; KOYAMA N.; SUZUKI T. In fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v: 32, p. 455-460, 1995.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. A frozen-thawed *in vitro*-matured bovine oocytes derived calf with normal growth and fertility. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 58, n. 8, p. 811-813, 1996.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; MURAKAMI, M.; KIKKAWA, Y.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. **Cryobiology**, v. 34, p. 36-41, 1997.
- PALASZ, A. T.; ALKEMADE, S.; MAPLETOFT, R. J. Sodium hialuronate as a substitute for biological proteins in bovine and mouse embryo freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 172-174, 1993.
- PARKS, J. E.; RUFFING, N. A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 37,n. 1, p. 59-73, 1992.
- PARK, S. E.; LEE, K. A.; SON, W. Y.; KO, J. J.; LEE, S. H.; CHA, K. Y. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v.

68, n. 5, p. 920-926, 1997.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH J. L.; WINER, M. A. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PAYNTER, S. J.; FULLER, B. J.; SHAW, R. W. Temperature dependence of mature mouse oocyte membrane permeabilities in the presence of cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 34, p. 122-130, 1997.

PAYNTER, S. J.; COOPER, A.; FULLER, B. J.; SHAW, R. W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture *in vitro*. **Cryobiology**, v. 38, p. 301-309, 1999.

PICKERING, S. J.; CANT, A.; BRAUDE, P. R.; CURRIE, J.; JOHNSON, M. H. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. **Fertility and Sterility**, v. 54, n. 1, p. 102-108, 1990.

POLLARD, J.W.; MARTINO, R. N. D.; SONGSASEN, N.; PLANTE, C.; LEIBO, S. P. Effect of temperatures during oocyte recovery on *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p. 849-858, 1996.

RAFFETY, K. A. **Methods in experimental embryology of the mouse**. Johns Hopkins press, Baltimore, 1980.

RALL, W. F. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 237-245, 1992.

RUFFING, R. A.; STEPONKUS, P.L.; PITT, R. E.; PARKS, J. E. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology**, v. 30, p. 562-580, 1993.

SATHANANTHAN, A. H.; TROUSON, A.; FREEMAN, L. Morphology and fertilization of frozen human oocytes. **Gamete Res.**, v. 16, p. 343-354, 1987.

SATHANANTHAN, A. H.; NG., S. C.; TROUSON, A. The effects of ultra-rapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. **Gamete Res.**, v. 21, p. 385- 401, 1988.

SAUNDERS, M. K.; PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 178-187, 1999.

- SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F.; BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 909-915, 1994.
- SCHMIDT, M.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 281-290, 1995.
- SCHROEDER, A. C.; CHAMPLIN, A. K.; MOBRAATEN, L. E.; EPPIG, J. J. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. **J. Reprod. Fert.**, v. 89, p. 43-50, 1990.
- SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p. 59-72, 2000.
- SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 5, p. 777-783, 1990.
- 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.
- SONGSASEN, N.; YU, J.; RATTERREE, S. M.; VANDEVOORT, C. A.; LEIBO, S. P. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 4, p. 818-825, 2002.
- SOUZA, M. R. **Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, com ou sem “cumulus oophorus”**. Viçosa: UFV, 2001. 54 p. Tese (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Ciência Animal, área Reprodução Animal). Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- STACHECKI, J. J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 395- 400, 1998a.
- STACHECKI, J. J.; COHEN, J.; WILLADSEN, M. S. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. **Cryobiology**, v. 37, p. 346-354, 1998b.
- STOJKOVIC, M.; MOTLIK, J.; KOLLE, S. et al. Cell cycle control and oocyte maturation: review of literature. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 34, p. 335-342, 1999.

- SUZUKI, T.; BOEDIONO, A.; TAKAGI, M.; SAHA, S.; SUMANTRI, C. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. **Cryobiology**, v. 33, p. 515-524, 1996.
- TAKAGI, M.; OTOI, T.; SUZUKI, T. Survival rate of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to post-thaw exposure time in two cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 30, p. 466-469, 1993.
- VAJTA, G. Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 85-93, 2000.
- VAN den ABBEEL, E.; VAN STEIRTEGHEM, A. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. **Human Reproduction**, v. 15, n. 2, p. 373-378, 2000.
- VAN der ELST, J. C.; NERINCKX, S. S.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. **Hum. Reproduction**, v. 7, p. 1440-1446, 1992.
- VIZCARRA, V. E. L. **Fluido folicular na maturação de oócitos bovinos para a produção de embriões “in vitro”**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2000. 41p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária, área Patologia Animal e da Reprodução) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.
- VISKANTA, R.; BIANCHI, M. V. A.; CRITSER, J. K.; GAO, D. Solidification processes of solutions. **Cryobiology**, v. 34, p. 348-362, 1997.
- WANG, T.; ZHU, Q.; YANG, X.; LAYNE, J. R. Jr.; DEVRIES, A. L. Antifreeze glycoproteins from antarctic notothenioid fishes fail to protect the rat cardiac explant during hypothermic and freezing preservation. **Cryobiology**, v. 31, p. 185-192, 1994.
- WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G.; LEE, S. H. Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. **Biology of Reproduction** v. 46, p. 1187-1195, 1992.
- WU, B.; TONG, J.; LEIBO, S. P. Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. **Molecular Reprod. Dev.**, v. 54, p. 388-395, 1999.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 35- 42, 1999.