

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011**

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

T

S237v
2011

Santos, Giancarlo Magalhães dos, 1982-
Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos / Giancarlo
Magalhães dos Santos. – Viçosa, MG, 2011.
xii, 83f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Eduardo Paulino da Costa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Oócito - Reprodução. 2. Bovino - Oócito -
Maturação. 3. Bovino - Reprodução. 4. Etilenoglicol.
5. Biotecnologia animal. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS

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

APROVADA: 11 de agosto de 2011.

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Co-orientador)

Dr. Cláudio José Borela Espechit

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

Prof. Giuliano Moraes Figueiró

Eduardo Paulino da Costa
(Orientador)

**Aos meus pais Carlos Emílio e Maria Aparecida,
Dedico.**

"Há três coisas que atrapalham o crescimento de um homem: calúnia, inveja e desonestidade".

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por mais essa vitória, pela força concedida na realização dos meus sonhos.

Agradecimento especial aos meus pais, Carlos Emílio e Maria Aparecida, que acreditaram no meu sonho e estiveram sempre a meu lado, acompanhando-me a cada degrau superado rumo a esta realização.

Ao meu irmão Carlos Eduardo, que me entusiasmou ao longo do tempo de pós-graduação, sempre me aconselhando e ajudando em tudo de que precisei.

Aos meus irmãos, Leonardo e Vinícius que, apesar da distância, estão sempre torcendo por mim.

À Maria Carolina, que, apesar da distância, esteve sempre ao meu lado, apoiando-me e dando-me forças para a realização desse sonho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pelo acolhimento para a realização de mais este curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, pela concessão do financiamento, para a realização desta pesquisa.

A Rosi, secretária da Pós-graduação da Veterinária, pelo acolhimento, orações, orientações e pela amizade construída ao longo do curso, fica aqui meu agradecimento especial a você, que você continue sendo essa pessoa especial, que só de olhar para os nossos olhos consegue entender o nosso sentimento. Mais que amiga, a MÃE dos alunos da pós-graduação. Se em algum dia lhe faltar um amigo, pode ter certeza que aqui você tem um AMIGO.

Ao professor Eduardo Paulino da Costa, pelas orientações e ensinamentos.

Ao co-orientador Luiz Sérgio e todos os integrantes da Embrapa-CNPGL (João Gabriel, Michele, Miro, Joel, Carolina) por todo o auxílio prestado neste trabalho.

Ao prof. Laércio pelo auxílio na parte de microscopia eletrônica, sempre a disposição em me ajudar.

Aos membros da banca, pela honrosa participação na defesa e pelas sugestões valiosas, que contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.

Aos amigos Flávio, Guilherme, Leonardo, Leandro Pin e Welison, pela amizade construída entre nós que, com certeza, nos acompanhará ao longo de nossas vidas, pelas gargalhadas nos momentos de descontração na república.

Ao primo Maurinho, pelas palavras de conforto nos momentos que mais precisei, além de ser um pai em Viçosa, e a toda sua família.

Aos integrantes da família Maitan, viçosense, pelos momentos em família, os encontros e principalmente as festas.

Aos professores Breno, Fernando, Graziela e Giuliano, pelos ensinamentos prestados e orientação no início desta caminhada pela vida científica.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-Graduação, José Rogério, Flávio, Vivian, Gustavo, Rogério, Polyana, Leonardo, Erick, Bruno, Marcelo, Morgana, Fábio, André Ricardo, pela agradável convivência, pela amizade e auxílios prestados.

Aos grandes amigos Emílio, Rafael e Sanely que compartilharam todas as dificuldades desta etapa comigo, pode ter certeza que na minha memória só ficou as coisas boas, pois é dos caminhos pedregosos que nasce as melhores fontes de água.

As estagiárias Mariani e Vanessa pelos auxílios prestados no laboratório.

Aos proprietários do Frigorífico Sabor de Minas (Muriaé-MG), aos veterinários Mário Sérgio e Clério e aos seus funcionários, pessoas simples mas que se dedicam ao trabalho com a maior alegria, pela colaboração na obtenção dos ovários utilizados neste trabalho, obrigado a todos vocês que fizeram o possível para a realização desta pesquisa, até permitir furar a fila de abate.

Aos funcionários Nenzinho e Divino, pelos auxílios prestados ao longo do tempo em que estivemos juntos.

Aos funcionários do Setor de Transportes da UFV, pelas diversas viagens prestadas até o frigorífico, garantindo segurança e pontualidade, além das piadas que não poderiam faltar, fazendo-me rir no decorrer das viagens.

A ex-chefe do Departamento de Veterinária Prof. Marlene, por liberar as viagens para o frigorífico, sempre que precisei.

A Geraldinho, pela gentileza de marcar as viagens para Muriaé, sempre que necessário.

A Facisa-Univiçosa por me ofertar a disponibilidade de fazer parte do seu corpo docente, a todos os colegas de trabalho e alunos, vocês tem um lugar especial no meu coração.

Ao CPT Cursos Presencias, em especial aos Diretores Marco Antônio Marota e Nelson Maciel que me acolheram e deram o maior apoio na antecipada defesa de tese, quando cheguei e falei: “surgiu um imprevisto, tenho que defender!” E logo veio a resposta “não é problema é a solução para sua vida”. Agradeço também a todos os colegas de trabalho, dos funcionários do escritório, aos do convívio na fazenda (Cozinheiras, Auxiliares de cursos, Motoristas, Monitores e Professores).

BIOGRAFIA

GIANCARLO MAGALHÃES DOS SANTOS, filho de Carlos Emílio Martins dos Santos e Maria Aparecida Magalhães dos Santos, nasceu na cidade de Alegre, Espírito Santo, em 18 de junho de 1982.

Em julho de 2001, ingressou no Centro Universitário de Vila Velha - ES, graduando-se em Medicina Veterinária em julho de 2006.

Em julho de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, tendo defendido dissertação em 14 de julho de 2008.

Em agosto de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, tendo defendido tese em 11 de agosto de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Produção “in vitro” de embriões bovinos	3
2.2. Maturação Nuclear e Citoplasmática do Ovócito	4
2.3 Princípios da criopreservação	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO I	22
Capacidade de maturação “in vitro” de ovócitos após a exposição a diferentes soluções de vitrificação e tempo de equilíbrio	22
1. Introdução	22
2. Objetivo geral e específico	23
3. Material e Métodos	24
3.1. Localização	24
3.2. Coleta dos ovários	24
3.3. Manipulação dos ovócitos	24
3.4. Delineamento experimental	25
3.5. Reidratação dos ovócitos	26
3.6. Maturação “in vitro”	27
3.7. Avaliação da taxa de maturação nuclear “in vitro”	27
3.8. Análises estatísticas	28
4.0. Resultados e Discussão	28
5.0. Conclusão	33
6.0. Agradecimento	33
7.0. Referências Bibliográficas	33
CAPÍTULO II	37
Maturação “in vitro” de ovócitos bovinos vitrificados com etilenoglicol	37
Introdução	39

Material e Métodos	40
Resultados e Discussão.....	44
Conclusões.....	48
Agradecimento	49
Referências.....	49
CAPÍTULO III	52
Maturação nuclear e ultraestrutura de ovócitos bovinos cultivados “in vitro” após a vitrificação.....	52
Introdução.....	54
Material e Métodos	55
Resultados e Discussão.....	59
Conclusões.....	64
Agradecimento	65
Referências.....	65
CAPÍTULO IV	68
Diferentes soluções de vitrificação na abundância de mRNA em ovócitos bovinos imaturos	68
Introdução.....	70
Material e métodos.....	71
Resultados e discussão	75
Conclusões.....	77
Agradecimentos	77
Referências.....	77
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	83

RESUMO

SANTOS, Giancarlo Magalhães dos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2011. **Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos**. Orientador: Eduardo Paulino da Costa. Co-orientadores: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo e João Henrique Moreira Viana.

Objetivou-se avaliar o efeito de soluções vitrificantes e da vitrificação em ovócitos imaturos bovino. Os ovócitos foram obtidos a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas logo após o abate, selecionados morfológicamente e distribuídos de acordo com os tratamentos. O procedimento experimental foi dividido em duas fases. Na primeira fase foi testada a toxicidade de soluções de vitrificação. Na segunda fase, foi testado o efeito da vitrificação. Na primeira fase, os ovócitos foram submetidos à maturação “in vitro” após manutenção em diferentes soluções de vitrificação (61 tratamentos). Foram testadas soluções de equilíbrio (SE) de 3, 8, 16, 20, 32 e 40% de Etilenoglicol (EG) em tempos (TE) de 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 minutos e posteriormente mantidos por 1 minuto em solução de vitrificação (SV) contendo 40% de EG e 1,0 mol.L⁻¹ de sacarose. O mesmo procedimento foi realizado, porém, utilizando solução de vitrificação contendo 25% de EG, 25% de DMSO e 1,0 mol.L⁻¹ de sacarose. Após estes procedimentos, os ovócitos foram reidratados e submetidos ao cultivo ‘in vitro’ por 24 horas. Observou-se maturação nuclear em grande parte dos tratamentos com exceção das combinações de SE com 32 e 40% de EG nos diferentes TE. Da mesma forma, os ovócitos expostos à SV de 25% de EG + 25% de DMSO + 1 mol.L⁻¹ de sacarose não possibilitaram a maturação. Os melhores resultados foram as soluções de SE contendo 3%, 16%, expostas por cinco minutos e 20% de EG, expostas por 10 minutos (76,7, 57,1 e 66,7% de ovócitos em metáfase II, respectivamente). Todos estes tratamentos foram expostos ao final do equilíbrio à SV, contendo 40% de EG + 1,0 mol.L⁻¹ de sacarose. Na segunda etapa, ovócitos foram submetidos aos procedimentos conforme descrito na primeira fase. Foram testadas SE com 3% de EG (por 1, 5, 6, 8, e 10 minutos), 8% de EG (por 1, 5 e 10 minutos), 16 e 20% de EG (por 5 e 8 minutos). Posteriormente, os ovócitos foram mantidos por 1 minuto em SV contendo 40% de EG e 1,0 mol.L⁻¹ de sacarose. Posteriormente, os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25 mL, vitrificados (imersos em nitrogênio líquido) e

posteriormente desvitrificados, rehidratados e submetidos à maturação “in vitro” por 24 horas. Observou-se que as combinações SE com 3% de EG, com TE de 1, 5, 6, 8 e 10 minutos proporcionaram taxas de metáfase II de 10,4; 19,3; 10,0; 7,6 e 14,3% respectivamente. As combinações SE com 8% de EG, com TE de 1, 5 e 10, e SE com 16% de EG, com TE de 5 minutos e SE de 20% de EG, com TE de 8 minutos proporcionaram taxas de metáfase II de 12,9; 6,9; 2,4; 23,1 e 2,0% respectivamente, sendo que todas diferem ($P<0,05$) ao grupo testemunha (73,7%). Foram processados ovócitos para a avaliação da ultraestrutura e expressão gênica. A ultraestrutura indicou que ovócitos de todos os tratamentos testados (exceto o grupo testemunha) apresentavam organelas degeneradas. Adicionalmente, não foi observada a distribuição citoplasmática típica de mitocôndrias de um ovócito maduro. Já na expressão gênica observou-se que ovócitos expostos a solução de equilíbrio de 16% de EG em tempo de cinco minutos apresentam maior quantidade de transcritos relacionados com o estresse oxidativo (HSP 70.1). No entanto, os transcritos da transcrição materno-zigótica (MATER e ZAR1) foram sub-regulados ($P<0,05$). Conclui-se que os procedimentos de desidratação testados para vitrificação de ovócitos, com exceção das combinações de SE com 32 e 40% de EG nos diferentes TE, podem não comprometer a taxa de maturação nuclear após maturação “in vitro”. Entretanto, comprometem a integridade ultraestrutural, a maturação citoplasmática e a expressão gênica.

ABSTRACT

SANTOS, Giancarlo Magalhães dos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2011. **Vitrification of bovine immature oocytes**. Adviser: Eduardo Paulino da Costa. Co-advisers: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, Luiz Sérgio de Almeida Camargo and João Henrique Moreira Viana.

The aim was to investigate the effects of vitrification solutions and vitrification of bovine immature oocytes. The oocytes were obtained from ovaries collected from bovine females immediately after slaughter, morphologically selected and distributed according to the treatments. The experimental procedure was divided into two phases, in the first phase was tested the toxicity of vitrification solutions and in the second phase was tested the effect of vitrification. In Experiment 1, the oocytes were matured *in vitro* after maintenance in different vitrification solutions (61 treatments). Solutions of equilibrium (SE) of 3, 8, 16, 20, 32 and 40% ethylene glycol (EG) were tested to equilibration time (ET) of 1, 2, 4, 5, 6, 8 and 10 minutes and then maintained by 1 minute in the vitrification solution (VS) containing 40% EG and 1.0 mol L⁻¹ sucrose. The same procedure was performed in other treatment, but using the vitrification solution containing 25% EG, 25% DMSO and 1.0 mol L⁻¹ sucrose. After these procedures, the oocytes were rehydrated and subjected to cultivation *in vitro* for 24 hours. Nuclear maturation was observed in most treatments except in SE combinations with 32 and 40% EG at different ET. Likewise, the oocytes exposed to SV 25% EG + 25% DMSO + 1 mol L⁻¹ sucrose did not allow maturation. The best results were obtained with SE solutions containing 3% and 16% exposed for five minutes and 20% EG exposed for 10 minutes (76.7, 57.1 and 66.7% of oocytes in metaphase II, respectively). All treatment groups were exposed to the end of the equilibrium to the SV, containing 40% EG + 1.0 mol L⁻¹ sucrose. In Experiment 2, oocytes were submitted to the procedures described in the Experiment 1. Were tested SE containing 3% EG (for 1, 5, 6, 8, and 10 minutes), 8% EG (for 1, 5 and 10 minutes), 16 and 20% EG (for 5 and 8 minutes). Subsequently, the oocytes were maintained for 1 minute at SV containing 40% EG and 1.0 mol L⁻¹ sucrose. Subsequently, the oocytes were packed into 0.25 mL straws, vitrified (immersed in liquid nitrogen) and subsequently desvitrified, rehydrated and submitted to maturation *in vitro* for 24 hours. It was observed that the SE combination with 3% of EG, in ET of 1, 5, 6, 8 and 10 minutes provided the metaphase II rates of 10.4, 19.3, 10.0, 7.6 and 14.3% respectively. The combinations SE with 8% EG with ET 1, 5 and

10 minutes and SE with 16% EG, 5 minutes with ET and SE of 20% EG with ET 8 minutes provided rates of metaphase II 12.9, 6.9, 2.4, 23.1 and 2.0% respectively, all of which differ ($P < 0.05$) than the control group (73.7%). Oocytes were processed for the evaluation of the ultrastructure and gene expression. The ultrastructure of oocytes indicated that all treatments (except control group) had degenerated organelles. Additionally, it not observed cytoplasmic distribution of mitochondria typical of a mature oocyte. In the gene expression was observed that oocytes exposed to the equilibrium solution of 16% EG in five minutes have a higher amount of transcripts related to oxidative stress (HSP 70.1). However, the transcripts of the maternal-zygotic transcription (MATER and ZAR1) were under-regulated ($P < 0.05$). We conclude that the procedures of dehydration tested for cryopreservation of oocytes, except for combinations of SE with 32% EG and 40 in different TE, cannot compromise the rate of nuclear maturation after maturation "in vitro". However, ultrastructural compromise the integrity, cytoplasmatic maturation and gene expression.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização de biotécnicas ligadas à reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Neste sentido, especialmente no tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso. Adicionalmente, outras biotécnicas como a produção “in vitro” (PIV) estão cada dia mais difundidas, apesar de fatores limitantes como a necessidade de um laboratório de cultivo bem estruturado e próximo ao local de coleta. Deste modo, a possibilidade de criopreservação imediata dos ovócitos recém aspirados (imaturos) facilitará sobremaneira o procedimento de produção “in vitro” de embriões, tornando-o mais acessível e prático.

Com a otimização de criopreservação de ovócitos, a técnica possibilitará a formação de bancos de germoplasma, mantendo a variabilidade genética entre as raças e preservando espécies selvagens em extinção. Finalmente, a criopreservação representa ainda um apoio essencial na produção de embriões, na engenharia genética e nos procedimentos de transferência nuclear e clonagem de embriões.

Adicionalmente, o progresso da criopreservação de ovócitos permitirá uma melhor logística, tanto no manejo de doadoras e receptoras como também no laboratório (DIEZ et al., 2005), proporcionando disponibilidade de ovócitos que permite concentrar as atividades em dias programados, contribuindo na redução dos custos de produção “in vitro” de embriões.

Dentre as metodologias para criopreservação de ovócitos, a vitrificação tem sido apontada como uma importante alternativa, sendo sua viabilidade demonstrada em várias espécies domésticas. Nos últimos anos, pesquisas têm indicado que o aumento da velocidade de resfriamento e reaquecimento proporciona maior sobrevivência aos ovócitos criopreservados e isto é obtido por meio das metodologias de vitrificação. Os resultados obtidos com a criopreservação de ovócitos bovinos, especialmente os imaturos, são ainda muito ruins e pouco atrativos economicamente.

A criopreservação de ovócitos imaturos (recém aspirados) possibilita que o processamento seja realizado no próprio local de aspiração folicular. Adicionalmente, a vitrificação não requer equipamentos especiais, facilitando

sobremaneira a criopreservação de ovócitos no sentido prático e econômico, reduzindo significativamente os custos. Assim, o grande desafio é encontrar um protocolo de vitrificação de ovócitos imaturos que possa ser aplicado posteriormente na produção “in vitro” de embriões bovinos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes soluções e tempos de equilíbrio e de soluções de vitrificação para ovócitos imaturos bovinos que sejam eficientes sobre a taxa de maturação “in vitro”.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção “in vitro” de embriões bovinos

A PIV de embriões no Brasil encontra-se em destaque, sendo que no ano de 2008 ultrapassou 66% da produção mundial (VIANA et al., 2010), tendo como principal objetivo acelerar o ganho genético do rebanho bovino (TESSMANN et al., 2004). Entretanto, a técnica apresenta limitações, sendo um dos principais problemas, os baixos resultados do desenvolvimento “in vitro” dos embriões, uma vez que, em média, de cada 100 ovócitos bovinos colocados para maturar, apenas 30 a 40% se desenvolvem até o estágio de blastocisto (MOORE et al., 2007; GONÇALVES et al., 2007).

Evidências sugerem que, enquanto as condições de cultivo na PIV podem influenciar o potencial de desenvolvimento dos embriões bovinos, a qualidade intrínseca do ovócito é o fator chave que determina a proporção de ovócitos que se desenvolvem até blastocisto (LONERGAN e FAIR, 2008). Deste modo, ovócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da produção “in vitro” de embriões. Caso contrário, os índices podem ser ainda menores (SENEDA et al., 2001).

Segundo Peixer et al. (1995), além dos baixos índices de blastocistos, a PIV ainda apresenta outras limitações como a qualidade biológica e as dificuldades na criopreservação dos embriões, a menor viabilidade dos ovócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e o custo, que pode ser superior ao do embrião produzido pela transferência de embriões (TE). De acordo com MIRANDA et al. (2007), o custo do embrião produzido ainda continua elevado em função da necessidade de infraestrutura laboratorial, que inclui equipamentos importados e de alto custo, bem como meios e reagentes para o cultivo celular/embrionário. Na maioria das vezes, estes reagentes e equipamentos são importados e, conseqüentemente, de difícil aquisição e sujeitos às variações de preço de acordo com a moeda estrangeira.

Portanto, a fim de se obter melhores resultados com a técnica de PIV, muitos estudos continuam sendo desenvolvidos visando avaliar individualmente cada uma

das etapas, procurando ajustar, da melhor maneira possível, todas as variáveis envolvidas no processo.

2.2. Maturação Nuclear e Citoplasmática do Ovócito

Um dos principais motivos da PIV apresentar reduzidas taxas de eficiência é a ausência de competência dos ovócitos antes da maturação. Em condições “in vivo”, o reinício da meiose ou maturação ocorre após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) durante o estro e, momentos antes da ovulação, são observadas modificações citoplasmáticas em ovócitos (MÁXIMO, 2009). Neste mecanismo, estão envolvidas a síntese de proteínas e as mudanças no número, tamanho e posição de organelas, como a migração periférica dos grânulos corticais.

Contudo, no procedimento “in vitro”, a simples retirada do ovócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear, ou seja, a meiose é retomada espontaneamente (MAYES e SIRARD, 2001; GONÇALVES et al., 2002; DIEZ et al., 2005).

A maturação nuclear do ovócito compreende a progressão do estágio dictióteno da primeira prófase meiótica ou estágio de vesícula germinativa (VG), seguida das fases de metáfase I (MI), anáfase I e telófase I, até a fase de metáfase II (MII). Esta fase coincide com a expulsão do primeiro corpúsculo polar (CP), ocorrendo, assim, a segunda parada da meiose (MEHLMANN, 2005; DEKEL, 2005).

A duração necessária para a conclusão da primeira divisão meiótica de ovócitos bovinos “in vitro” varia entre 18 e 24 horas (SÜSS et al., 1988; HYTTEL et al., 1989). Todavia, existe uma sequência de eventos para a maturação nuclear do ovócito, sendo que o processo de quebra da vesícula germinativa (QVG) “in vitro” ocorre entre sete e 12 horas após o início do cultivo, enquanto a MI ocorre entre 12 e 15 horas e a MII a partir de 18 horas, com a eliminação do corpúsculo polar entre 18 e 21 horas. Após seis a sete horas, o CP se degenera, não podendo mais ser observado (HYTTEL et al., 1989).

A correta ocorrência desta sequência de eventos é fundamental, pois a habilidade do ovócito em ser fertilizado e desenvolver normalmente depende tanto da

maturação nuclear quanto da citoplasmática (HURTT et al., 2000; MAGNUSSON et al., 2008). O ovócito somente reiniciará a segunda parada da meiose se for fecundado pelo espermatozoide (FIGUEIREDO et al., 2002).

Durante o crescimento folicular, os ovócitos adquirem sua competência progressivamente. O fato deles chegarem ao estágio de MII “in vitro” não necessariamente significa que sejam competentes para suportar uma fecundação normal e posterior desenvolvimento embrionário “in vitro” (CROZET et al., 1995). Isso demonstra que a capacidade de completar a maturação citoplasmática se desenvolve além da maturação nuclear (DODE et al., 2000).

A maturação representa o estágio final da preparação do ovócito para a fecundação. Nesse período, mudanças morfológicas e bioquímicas, denominadas em seu conjunto de maturação citoplasmática, são essenciais para completar a meiose e para seu desenvolvimento futuro (DONNAY et al., 2004; DIEZ et al., 2005).

Costa (1994) e Diez et al. (2005) caracterizaram o ovócito imaturo bovino por apresentar várias camadas de células do *cumulus oophorus* não expandidas, aderidas a zona pelúcida, com comunicações formadas com o ovócito por meio junções *gap*, e núcleos normais. As mitocôndrias estão situadas na periferia, intimamente ligadas a gotas lipídicas, juntas ao retículo endoplasmático, com presença de grânulos corticais próximo ao córtex. Além dessas características, ausência ou pequeno espaço perivitelínico (EPV) (COSTA, 1994).

Entretanto, no decorrer da maturação ocorre redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e a maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} são alguns dos eventos citoplasmáticos que ocorrem no ovócito (MERMILLOD et al., 2000; MORATO et al., 2008), com desenvolvimento do EPV (COSTA et al., 1994). O ovócito e a população de células da granulosa e do *cumulus oophorus* encontram-se interconectados pelas junções *gap* (HYTTEL et al., 1989).

As funções dessas junções *gap* são diversas, pois permitem a passagem de substâncias de baixo peso molecular via células do *cumulus oophorus* (GORDON, 1994), transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao ovócito. Mensageiros como adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e Ca^{2+} podem passar através das junções *gap* para as células vizinhas, propagando sinais induzidos por estimulação hormonal (LAWRENCE et al., 1978).

A integridade das junções *gap* ainda parece ser essencial para dar suporte ao processo de fecundação (TANGHE et al., 2003).

Destarte que na maturação as mitocôndrias exercem papel de extrema importância, pois são responsáveis pelo suprimento energético no processo de maturação, sendo crucial para o desenvolvimento do ovócito a sua movimentação para áreas de alto consumo (MÁXIMO, 2009). Adicionalmente, um número reduzido de mitocôndrias no decorrer do metabolismo ovocitário, pode influenciar posteriormente na embriogênese inicial, por causar uma distribuição anormal de organelas (SHOUBRIDGE et al., 2007).

Já os eventos moleculares relacionados à maturação citoplasmática não são ainda totalmente conhecidos (MERMILLOD et al., 2000), mas sabe-se que a transcrição e o armazenamento de proteínas no citoplasma, são de fundamental importância na maturação e garantem o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células em bovinos, quando o genoma embrionário é ativado, tornando-se necessária a síntese de novas proteínas (MEIRELLES et al., 2004).

Os ovócitos com uma maturação nuclear normal, em tempo regular, mas que possuem uma assincronia entre a maturação citoplasmática e a nuclear, não serão fecundados ou não irão ter um desenvolvimento embrionário satisfatório, tornando-se degenerados (BEVERS et al., 1997; MAGNUSSON et al., 2008).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite a investigação de eventos citoplasmáticos e tem sido utilizada para elucidar detalhes referentes à morfologia do ovócito (MORATO et al., 2008).

2.3 Princípios da criopreservação

A criopreservação com estocagem à temperaturas muito baixas em nitrogênio líquido (-196°C) é desejável por razões biológicas e comerciais (SHAW et al., 2000). Existe grande interesse em desenvolver um método viável para manter a viabilidade de ovócitos de mamíferos por longos períodos pensando em conservação de espécies (PRENTICE et al., 2011).

O princípio do resfriamento consiste em diminuir a taxa metabólica e permitir a estocagem e transporte do ovócito (ZERON et al., 1999, DIEZ et al., 2005). Portanto, deve se remover o máximo possível de água das células antes de se

proceder a sua congelação. Quando esta desidratação não ocorre, grandes cristais de gelo se formam, lesando severamente a estrutura intracelular. Entretanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr, 1986).

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

Um dos fatores que limita o sucesso na congelação de ovócitos é a ocorrência de injúrias causadas pelo abaixamento da temperatura durante o processo. A maioria das células não sobrevive quando expostas a baixas temperaturas (-196°C), a menos que sejam colocadas soluções que as protejam, além de serem resfriadas e aquecidas mediante taxas específicas (SHAW et al., 2000). Estas injúrias resultam em danos irreversíveis à membrana plasmática, principalmente quando utilizado o método de criopreservação lenta, convencionalmente utilizado, caracterizado pela capacidade de causar choque osmótico e cristalização de partículas de gelo no interior da célula (LEDDA et al., 2007). Como os ovócitos bovinos são muito frágeis neste estágio, é desejável que o decréscimo da temperatura ocorra rapidamente, como acontece no processo de vitrificação (CETIN e BASTAN, 2006).

A vitrificação é um processo termodinâmico, no qual o aumento da viscosidade determina que os fluídos crioprotetores adquiram propriedades mecânicas de um sólido amorfo semelhante ao vidro, mantendo as propriedades do líquido, prevenindo assim a formação de cristais de gelo (PEREIRA e MARQUES, 2008; ZHOU et al., 2010). O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeação e concentração do crioprotetor e o tempo de exposição, os quais devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular, sem, no entanto, produzir lesões osmóticas ou tóxicas (MEZZALIRA et al, 2002, CHECURA e SEIDEL Jr, 2007, PRENTICE et al. 2011). Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a congelação e descongelação, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: primeiro, a toxicidade do crioprotetor que limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento, limitando, portanto a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1986), e segundo, os agentes crioprotetores podem ter ação direta na produção de crioinjúrias,

como por exemplo, alteram a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (ARNOLD et al., 1983).

A vitrificação de ovócitos tem sido relatada em várias espécies de mamíferos incluindo ratos, bovinos e humanos (CETIN e BASTAN, 2006). Entretanto, o sucesso da vitrificação do complexo *cumulus*-ovócito tem sido limitado devido a complexidade das estruturas e a sensibilidade ao resfriamento (MASSIP, 2003).

Permitindo variações entre protocolos utilizados, o processo de vitrificação de ovócitos bovino é fundamentado em dois passos: primeiro, aumentando a velocidade da condução de temperatura e segundo, aumentando a concentração de crioprotetores. Neste contexto, por exemplo, o uso de um pequeno volume ($<1\mu\text{l}$) de crioprotetor em alta concentração, possibilita taxas de resfriamento muito rápidas (15.000 a 30.000°C/min). A estratégia da vitrificação resulta numa eliminação total da formação de cristais de gelo, tanto no interior das células vitrificadas (intracelular) quanto na solução extracelular (LIEBERMANN et al., 2002).

Uma vantagem é que enquanto os protocolos de congelação lenta utilizados para a criopreservação de ovócitos e embriões de diferentes espécies requerem o uso de equipamentos de elevado custo, o uso de técnicas ultra-rápidas como a vitrificação reduz significativamente os custos, uma vez que não requer nenhum equipamento especial e pode ser facilmente adaptada à rotina (BARIL et al., 2001).

Para se obter altas taxas de resfriamento é necessário o uso de elevadas concentrações da solução crioprotetora, o que diminui a formação de cristais de gelo (COBO & DIAZ 2011; PRENTICE et al. 2011). Uma consequência disso é que uma concentração mínima de alguns crioprotetores pode levar à toxicidade osmótica ou química (PARK et al., 2001). A redução na concentração do crioprotetor pode ser obtida por meio do uso adicional de polímeros não permeáveis, os quais permanecem na área extracelular (CHECURA e SEIDEL Jr 2007). A redução da toxicidade do crioprotetor também pode ser obtida pelo uso de uma combinação de dois crioprotetores ou exposição das células em dois passos às soluções de criopreservação (LIEBERMANN et al., 2002; PRENTICE et al., 2011).

A possibilidade de um ovócito sobreviver à criopreservação depende tanto de seu tamanho (ASADA e FUKUI, 2000; ANCHAMPARUTHY et al., 2009) quanto do estágio celular em que se encontra (OTOI et al., 1995; MAGNUSON et al., 2008). Quanto maior o volume do ovócito, maior o tempo necessário para que a célula atinja o equilíbrio osmótico em presença de crioprotetores (HENDRIKSEN et al., 2000).

Desta forma, sucesso limitado na criopreservação tem ocorrido em espécies com ovócitos muito grandes. Tal fato explica a maior dificuldade na criopreservação de ovócitos bovinos, resultando consequentemente em baixas taxas de produção de blastocistos após o aquecimento, FIV e cultura “in vitro”. Devido ao seu grande tamanho é mais difícil para a água e os crioprotetores se moverem através da membrana plasmática (SEIDEL Jr., 2006), características que associadas à penetração desigual do crioprotetor podem resultar em danos em parte do ovócito e crioproteção insuficiente em outra (FAGUNDES et al, 2004).

A criopreservação de ovócitos bovinos proporciona a criação de bancos de recursos genéticos, permitindo o uso futuro em diversas biotecnologias, além de possibilitar um melhor planejamento da produção “in vitro” de embriões (DIEZ et al., 2005). Das perspectivas de conservação de recursos genéticos, a criopreservação de sêmen é um fato, mais assegura somente a metade da genética do animal. Sendo assim, o desenvolvimento de protocolo para manter a viabilidade de ovócitos é importante para a conservação da genética da fêmea (PRENTICE et al., 2011).

Contudo, sabe-se que atualmente os resultados obtidos de FIV de ovócitos criopreservados são em geral muito baixos, sendo consequentemente, pouco atrativos comercialmente. Estes baixos índices são decorrentes da alta sensibilidade destes gametas ao resfriamento, o que é determinado por características próprias como o tamanho, o inter-relacionamento com as células da *corona radiata*, a funcionalidade e o posicionamento de organelas, o alto teor lipídico e o coeficiente de permeabilidade de sua membrana. Estes fatores, por sua vez, são diretamente influenciados pelo estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas (MEZZALIRA et al, 2002; MAGNUSSON et al., 2008).

Assim, o estágio de desenvolvimento dos ovócitos no momento da criopreservação tem-se mostrado como fator crítico para a sua sobrevivência após a descongelação (DIEZ et al., 2005; MAGNUSSON et al., 2008; ANCHAMPARUTHY et al., 2009; ZHOU et al., 2010). Esta condição ocorre tendo em vista que ovócitos imaturos e maturados apresentam, cada um, características que refletem sua organização nuclear e citoplasmática (DIEZ et al., 2005).

Lim et al. (1992) e Diez et al. (2005) concluíram que ovócitos bovinos imaturos não sobrevivem à congelação da mesma forma que os maturados “in vitro”. Isto ocorre devido ao arranjo das micro-organelas no ovócito imaturo que é mais sensível ao choque térmico, com comprometimento da síntese proteica envolvida na

maturação, fertilização e desenvolvimento. O comprometimento da competência de desenvolvimento dos ovócitos pode ser primeiramente explicado pelo dano nuclear, incluindo desorganização do fuso e perda de parte dos microtúbulos, como também outras alterações ultraestruturais observadas em ovócitos vitrificados (DIEZ et al., 2005). O estágio nuclear no qual os ovócitos são submetidos à criopreservação pode influenciar na habilidade futura de desenvolvimento após a FIV. Diante desta, ovócitos maturados por zero, seis e 12 horas têm menos habilidade de sobreviver à criopreservação que os maturados por 24 horas (DIEZ et al., 2005).

ZERON et al. (1999) observaram que ao resfriar ovócitos à temperatura de 16°C ocorre redução mais acentuada da viabilidade com ovócitos imaturos do que com maduros. Nesta temperatura, os ovócitos imaturos apresentam a fase de transição da membrana lipídica, fato correlacionado com a quebra da integridade da membrana plasmática (ARAV et al., 1996). Esta redução na viabilidade também pode estar relacionada com o fato de que o citoesqueleto de ovócitos imaturos é particularmente mais susceptível ao frio que o citoesqueleto mais flexível de ovócitos em metáfase II (HURT et al., 2000).

Também HOCHI et al. (1997), ao vitrificarem ovócitos com zero, seis, 12 e 24 horas de maturação, verificaram que os ovócitos em MII foram mais resistente à criopreservação, uma vez que a maior porcentagem de blastocistos provenientes de ovócitos criopreservados foi obtida quando a vitrificação foi realizada com a célula no estágio de MII. Esses resultados sugerem que a tolerância dos ovócitos à criopreservação aumenta de acordo com o estágio de maturação.

Por outro lado, algumas pesquisas têm mostrado que um dos fatores que afetam a competência do desenvolvimento de ovócitos bovinos congelados é o tipo de crioprotetor utilizado. Os crioprotetores são classificados de acordo com a sua permeabilidade à membrana celular em permeáveis (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, propanediol) e não permeáveis, os quais são divididos em carboidratos (sacarose, glicose, lactose, trealose e raffinose) e polímeros (ficoll, dextran e polivinil pirrolidona). O etilenoglicol (EG) tem sido usado como crioprotetor de eleição para a congelação pelo método convencional e para a vitrificação, graças a sua baixa toxicidade e peso molecular reduzido. Esta condição é caracterizada por rápida penetração nas células, removendo, conseqüentemente, grande parte da água intracelular antes da congelação. Desta forma, evita-se a formação de cristais de gelo e protege as organelas celulares dos efeitos deletérios da criopreservação (MIYAKE

et al., 1993; DINNYÈS et al., 2000). Contudo, alguns autores citam ainda que a exposição repentina a altas concentrações de crioprotetores pode ser muito tóxica ao ovócito (MORATO et al. 2008; SRIPUNYA et al. 2010). Uma alternativa sugerida para evitar o efeito tóxico de alguns crioprotetores é a utilização de soluções de equilíbrio com baixas concentrações de substâncias crioprotetoras a fim de minimizar o efeito tóxico das soluções vitrificantes (DHALI et al. 2000).

Nos protocolos de vitrificação, o EG associado a outros crioprotetores não permeáveis tem se tornado a solução mais comumente utilizada (MARTINO et al., 1996). Os aditivos com alto peso molecular, como os dissacarídeos (sacarose ou trealose), não penetram a membrana celular e podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor requerida, bem como a toxicidade do EG. Isto ocorre devido à redução na concentração necessária para promover criopreservação bem sucedida (LIEBERMANN et al., 2002). Neste caso, a sacarose exerce concomitantemente um efeito osmótico fundamental, sendo, portanto, empregada na rehidratação após a descongelação. Diversas observações confirmam o efeito estabilizante da adição de sacarose na solução de vitrificação. Na presença de sacarose, a estabilidade da membrana dos ovócitos foi sensivelmente aumentada após exposição prolongada a altas concentrações de EG (RAYOS et al., 1994).

Martins et al. (2005) avaliaram o efeito da vitrificação na maturação “in vitro” de ovócitos bovinos imaturos com diferentes soluções de equilíbrio (3; 20 e 40% de EG), diferentes tempos de equilíbrio (0,5; 5 e 15 minutos) e diferentes soluções de vitrificação (40% EG + 1M de trealose e outra com 40% EG + 1M de sacarose). Os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25 mL após os banhos e imersos em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, foram reidratados e maturados “in vitro” por 24 horas. Os autores verificaram que o protocolo utilizando 20% EG na solução de equilíbrio, com tempo de equilíbrio de 5 minutos e com a solução de vitrificação contendo 40% de EG + 1M de sacarose, proporcionou índices razoáveis de maturação “in vitro” (44,55% em metáfase II).

Yamada et al. (2006) compararam diferentes associações de EG, glicerol e DMSO na criopreservação de ovócitos bovinos imaturos. Os ovócitos foram colocados em solução de equilíbrio contendo 10% EG e 0,25M trealose por 10 minutos. Posteriormente, foram colocados em soluções de vitrificação contendo 0,5M de sacarose e diferentes crioprotetores: EG +DMSO1= 20% EG e 20% DMSO; EG +DMSO2= 25% EG e 25% DMSO ou EG +GLY= 25% EG e 25% glicerol

mantendo 30 segundos em cada solução. Durante este tempo, foram envasados em OPS (*open pulled straw*) e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram descongelados e lavados em três soluções diferentes: a primeira com 10% FCS, 10% EG e 1M trealose, a segunda com 10% FCS e 0,5% de trealose, e a última somente com 10% FCS. Os ovócitos permaneceram em cada solução por três minutos. Em seguida, foram maturados por 24 horas, obtendo respectivamente as seguintes taxas de maturação: EG + DMSO1 (11,7%); EG + DMSO2 (29,2%); EG + GLY (4,3%); EG + GLY. Os ovócitos do grupo controle alcançaram 75,9% de taxa de maturação.

Já Cetin e Bastan (2006) avaliaram EG, DMSO e a mistura de ambos no processo de vitrificação de ovócitos. O grupo vitrificado em EG foi exposto a 20% de EG por 45 segundos e, posteriormente, colocado em solução com 40% EG e 1M de sacarose por 25 segundos. O mesmo procedimento foi realizado com o DMSO, sendo realizada a substituição do EG pelo DMSO. Na mistura de DMSO com o EG, foi utilizado na primeira etapa 10% de EG + 10% DMSO por 45 segundos, e na segunda etapa, 20% EG + 20% DMSO + 1M de sacarose. Posteriormente, foram envasados em palhetas e imersos em nitrogênio líquido por 30 dias, depois descongelados e lavados em três diferentes soluções (0,25; 0,15 e 0M de sacarose) em tempos de 1,5; 1,5 e 5 minutos, respectivamente. Estes ovócitos criopreservados foram maturados por 24 horas e fixados para posterior avaliação. A porcentagem de ovócitos observados com primeiro corpúsculo polar foi de 31,6%; 7,5%; 13,3% e 74,7%, no estágio de Metáfase II foram 34,1%; 14,9%; 20,7% e 79,6% nos grupos EG, DMSO, ambos e controle, respectivamente.

Pyles (2006) avaliou a vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando EG, DMSO e dimetilformamida (DF). Este autor vitrificou em OPS, ovócitos (experimentos 1, 2 e 3) e embriões bovinos (experimentos 4, 5 e 6) em três soluções de vitrificação distintas: experimentos 1 e 4 (20%EG + 20%DMSO + 0,5M sacarose); experimentos 2 e 5 (20%DF + 20%EG + 0,5M sacarose); experimentos 3 e 6 (20%DF + 20%DMSO + 0,5M sacarose). Os embriões foram vitrificados na presença ou não de citocalasina B. Os ovócitos foram vitrificados ou somente expostos aos crioprotetores imaturos (G0h e G0hexp), ou após 6 horas (G6h e G6hexp), 12 horas (G12h e G12hexp) ou 22 horas de MIV (G22h e G22hexp). Após a exposição ou aquecimento, parte dos ovócitos foi cultivada para completar 22 horas de MIV e foi destinada à PIV, para avaliação da capacidade de se desenvolverem até

blastocisto. Observou-se neste experimento, que a associação de EG+DMSO é a mais eficiente para vitrificação de ovócitos, pois ocorreu clivagem (1G12h=7,3%; 1G22h=4,2%). A realização da MIV antes da vitrificação foi benéfica. Apesar de nenhuma das soluções de crioprotetores ter sido capaz de promover proteção adequada aos ovócitos submetidos à vitrificação em qualquer momento da MIV, não houve produção de blastocistos em nenhum experimento. Os únicos grupos de embriões vitrificados, nos quais ocorreu re-expansão foram aqueles que utilizaram DF na composição da solução crioprotetora, indicando que esta substância pode ter um efeito benéfico na vitrificação de embriões bovinos.

Outro fator que parece estar ligado à eficiência na maturação do ovócito é a idade do animal submetido à coleta. Albarracín et al. (2005) avaliando o efeito da vitrificação de ovócitos obtidos de novilhas pré-puberes e vacas adultas concluíram que a vitrificação de ovócitos bovinos no estágio de Metáfase II pelo método OPS produz mudanças biológicas nos mesmos. Estas mudanças compreendem anormalidades na organização de microfilamentos de actina e alterações na configuração de cromossomos e microtúbulos. Entretanto, os ovócitos recuperados de vacas adultas foram mais sensíveis à exposição aos crioprotetores, enquanto a vitrificação apresentou piores efeitos em ovócitos de novilhas. Apesar dessas alterações, uma determinada proporção de ovócitos vitrificados foi capaz de se desenvolver até a fase de blastocisto.

Tão importante quanto os meios de vitrificação utilizados é o diâmetro da pipeta em que são alocados os ovócitos para o processo de vitrificação. O objetivo análogo é acondicionar os ovócitos em um recipiente de volume mínimo proporcionando uma taxa de congelamento ultra-rápida e satisfatória (PRENTICE et al. 2011). Os métodos utilizados em pesquisas incluem a OPS que faz uso de uma paleta estirada (VATJA et al. 1998), utilização de paletas de 0,25 mL (MARTINS et al. 2005), “cryoloop” (LANE et al. 1999), “microdrop” (PAPIS et al. 2000), “flexipet-denuding pipette” (LIEBERMANN et al. 2002), “electron microscope copper grid” (MARTINO et al. 1996), “cryotop” (KUWAYAMA et al. 2007; HAJARIAN et al., 2011) e o método de “nylon mesh” (MATSUMOTO et al. 2001).

Recentemente, o método em que se utiliza o cryotop com pequenos volumes de solução, tem se mostrado bastante promissor por permitir a criopreservação de ovócitos e embriões em volumes mínimos (KUWAYAMA et al. 2007; MORATO et al. 2008). Porém, este método demonstra ser falho no que tange a questão da

bioseguridade das células, visto que são expostas diretamente ao nitrogênio líquido. Neste caso, o método em que se utiliza paletas de 0,25 mL, por serem lacradas, representam uma excelente alternativa para impedir a contaminação; no entanto, a velocidade de congelação desta paleta é inferior ao crytop (BIELANSKI & VATJA, 2009).

Grande parte dos ovócitos criopreservados são fertilizados e cultivados até blastocistos usando os mesmos protocolos de cultura desenvolvidos para ovócitos não criopreservados. Esta é uma das razões para que os ovócitos criopreservados necessitem de um sistema de cultivo especial (MEN et al., 2003). Em pesquisas realizadas por estes pesquisadores, mais de 90% dos ovócitos criopreservados estavam viáveis imediatamente após o aquecimento pela análise morfológica, confirmada pelo teste de permeabilidade da membrana com iodeto de propídeo. Porém, o efeito negativo da criopreservação foi se expressando gradualmente durante o cultivo “in vitro”. A primeira perda maciça de viabilidade dos ovócitos está compreendida à falha na fertilização, uma vez que apenas 50% dos ovócitos clivaram. A conclusão é que algum mecanismo de degeneração se iniciou naqueles ovócitos não clivados. Em relação aos embriões clivados, apenas 5% se desenvolveram até o estágio de blastocisto. A maioria paralisou seu desenvolvimento durante os primeiros dias de cultivo e começou a degenerar. Segundo estes autores, fatores como resfriamento, crioprotetores e efeito osmótico podem contribuir para o início da apoptose. Constatou-se que a alta concentração de crioprotetores usados para a vitrificação é tóxica para a célula. Além disso, o crioprotetor residual intracelular após aquecimento pode interagir com as estruturas celulares ou moléculas impedindo o desenvolvimento da célula ovocitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRACÍN, J.L.; MORATÓ, R.; ROJAS, C.; MOGAS, T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. **Theriogenology**, v.63, p.890-901, 2005.
- ANCHAMPARUTHY, V.M.; DHALI, A.; LOTT, W.M.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Vitrification of bovine oocytes: implications of follicular size and sire on the rates of embryonic development. **Journal Assistant Reproduction Genetic**. v.26, p.613–619, 2009.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S.B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, p. 589-599, 1996.
- ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochem. Biophys. Acta**, v.782, p.121-128, 1983.
- ASADA, M.; FUKUI, Y. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.53, p.889-898, 2000.
- BARIL, G.; TRALDI, A-L.; COGNIE, Y.; LEBOEUF, B.; CBECKERS, J.F.; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v.56, p.299-305, 2001.
- BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.
- BIELANSKI, A.; VAJTA, G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. **Human Reproduction**, v.24, p.2457–2467, 2009.
- CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.29-36, 2006.
- CHECURA, C.M.; SEIDEL Jr, G.E. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.67, p. 919–930, 2007.
- COBO, A.; DIAZ, C. Clinical application of oocytes vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Fertility and Sterility**, Article in Press, 2011.

COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte, 1994. p.155. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; BUDOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.293–298, 1995.

DEKEL, N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocytes maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.19-25, 2005.

DHALI, A., MANIK, R.S., DAS, S.K., SINGLA, S.K., PALTA, P. Vitrication of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 1295-1303, 2000.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrication before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v.64, p.317-333, 2005.

DINNYES, A., DAÍ, Y., JIANG, S., YANG, X. High developmental rates of vitricified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 513-518, 2000.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; ALVES, R.G.O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p. 207-214, 2000.

DONNAY, I.; FAERGE, I.; GRONDAHL, C.; VERHAEGHE, B.; SAYOUD, H.; PONDERATO, N.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Effect of prematuration, meiosis activating sterol and enriched maturation medium on the nuclear maturation and competence to development of calf oocytes. **Theriogenology**, v.62, p.1093–1107, 2004.

FAGUNDES, L.M.; COSTA, E.P.; TORRES, C.A.A.; et al. Congelação de ovócitos Desnudos ou Não, Maturados e Imaturos de Bovinos, Utilizando o Etileno Glicol pelo Método Convencional. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, p.2026-2036, 2004.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. 64 **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p.227-260, 2002.

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

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

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Cambridge**: Cambridge University Press, p.30-142, 1994.

HAJARIAN, H.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; DALIRI, M.; DASHTIZAD, M.; KARAMISHABANKAREH, H.; ABAS MAZNI, O. Cryotop and development of vitrified immature bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.67-73, 2011.

HENDRIKSEN, P.J.M.; VOS, P.L.A.M.; STEENWENG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.

HOCHI, S., et al. Effect of nuclear stages during in-vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. **Theriogenology**, v.47, p.345, 1997. Abstract.

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

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v.67, p. 73-80, 2007.

LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**, v.17, p. 1234-1236, 1999.

LAWRENCE, T.S.; BEERS, W.H.; GILULA, N.B. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. **Nature**, p.272-501, 1978.

LEDDA, S.; BOGLIOLI, L.; SUCCU, S.; ARIU, F.; BEBBERE, D.; LEONI, G.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival. **Reproduction Fertility Development**, v.19, p.13–23, 2007.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1671-1680, 2002.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos - Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 68, p. 17-22, 2008.

MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W.B.; GOISSIS, M.D.; YAMADA, C.; TAVARES, L.M.T.; ORTIZ, M.E.; ASSUMPÇÃO, D.; VISINTIN, J.A. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.265-273, 2008.

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

MARTINS, R.D.; COSTA, E.P.; CHAGAS, J.S.C. et al. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.128-134, 2005.

MASSIP, A. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.43, p.325–330, 2003.

MATSUMOTO, H., JIANG, J.Y., TANAKA, T., SASADA, H., SATO, E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v.42, p. 139-144, 2001.

MÁXIMO, D.M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação “in vitro”**. Brasília, 2009. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade de Brasília, Brasília.

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

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.13-20, 2004.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p.791-799, 2005.

MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J.; RUTLEDGE, J.J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v.47, p.73–81, 2003.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL, R.; MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.1, p.89-95, 2000.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; CRUZ, F.B.; BARBIERI, D.P.; DAMIANI, J.C. Vitificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.2, p. 108-114, 2002.

MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D; OHASH, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

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

MOORE, K.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v.68, p.1316-1325, 2007.

MORATO, R., MOGAS, T, MADDUX-HYTTEL, P. Ultrastructure of Bovine oocytes exposed to Taxol prior to OPS vitrification. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.1318-1326, 2008.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

PARK, S.E.; CHUNG, H.M.; CHA, K.Y.; HWANG, W.S.; LEE, E.S.; LIM, J.M. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. **Fertility and Sterility**, v.75, p.1177-1184, 2001.

PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V.; RUMPF, R.; DE BEM, A.R.; NETO, M.A.P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargem. **Zootecnia**, v.32, p. 49, 1995.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v.9, p.267-277, 2008.

PRENTICE, J.R.; SINGH, J.; DOCHI, O.; ANZAR, M. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.75, p.602-609, 2011.

PYLES, E.S.C.S.; **Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006. p.121. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, 2006.

RAYOS, A.A.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sacarose or trehalose. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.123-129, 1994.

SEIDEL JR., G.E. **Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings.** Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986.

SENEDA, M. M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A.D.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.

SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p. 59-72, 2000.

SHOUBRINDGE, E.A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.87-111, 2007.

SRIPUNYA, N. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **Journal Reproduction Development**, v.56, p.176-81, 2010.

SÜSS, U.; WÜTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. **Biology of Reproduction**, v.38, p.871-880, 1988.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; MEHRZAD, J.; MAES, D.; DUCHATEAU, L.; KRUIF, A. Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.60, p.135-149, 2003.

TESSMANN, J.V.; MOZZAQUATRO, L.P.R.; SANTOS, M.V.; CHEQUIM, R.M.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.177-184, 2004.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38 (suplemento 2), p.661-674, 2010.

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

YAMADA, C.; CAETANO, H.V.A.; SIMÕES, R.; et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, 2006.

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

ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W., LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66–72, 2010.

CAPÍTULO I

Capacidade de maturação “*in vitro*” de ovócitos após a exposição a diferentes soluções de vitrificação e tempo de equilíbrio

1. Introdução

O desenvolvimento e a utilização de biotécnicas ligadas à reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Neste sentido, especialmente referente a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso. Adicionalmente, outras biotécnicas como a fecundação “*in vitro*” (FIV) estão tornando mais difundidas, apesar de fatores limitantes como a necessidade de um laboratório de fecundação bem estruturado e próximo ao local de coleta. Deste modo, a possibilidade de criopreservação imediata dos ovócitos recém aspirados, imaturos, facilitaria de sobremaneira o procedimento de produção “*in vitro*” de embriões, tornando-o mais acessível e prático.

Dentre as metodologias para criopreservação de ovócitos, a vitrificação tem sido apontada como uma importante alternativa, sendo sua viabilidade demonstrada em várias espécies como humanos (KUWAYAMA 2007; ANTINORI et al. 2007), bovinos (SRIPUNYA et al. 2010), suínos (LIU et al. 2008), equino (BOGLIOLO et al. 2006), ovinos (SUCCU et al. 2007), e bubalinos (GASPARRINI et al. 2007). Nos últimos anos, pesquisas têm indicado que o aumento da velocidade de resfriamento e reaquecimento proporciona maior sobrevivência aos ovócitos criopreservados (REN et al. 1994). Esta constatação fez com que as pesquisas desenvolvidas até então sejam baseadas principalmente na variação entre os protocolos de vitrificação.

Os resultados obtidos com a criopreservação de ovócitos bovinos, especialmente os imaturos, são ainda muito baixos e pouco atrativos economicamente, apesar de alguns estudos recentes demonstrarem resultados bem desafiadores (VIERA et al. 2002; CHIAN et al. 2004), inclusive com nascimento de alguns animais a partir da FIV de ovócitos vitrificados (ZHOU et al. 2010).

A utilização de soluções de equilíbrio (SE) representa uma alternativa estratégica que objetiva-se evitar o efeito tóxico de alguns crioprotetores. Estas

soluções são constituídas por baixas concentrações de substâncias crioprotetoras, a fim de minimizar o efeito tóxico das soluções vitrificantes (WOOD et al 1993; DHALI et al. 2000).

Contudo, a grande vantagem da criopreservação de ovócitos imaturos (recém aspirados) é a possibilidade do processamento no próprio local da aspiração folicular. Adicionalmente, a vitrificação não requer equipamentos especiais, facilitando de sobremaneira a criopreservação de ovócitos no sentido prático e econômico, consequentemente, reduzindo significativamente os custos. Assim, o grande desafio é encontrar um protocolo eficiente de vitrificação de ovócitos imaturos, sem prejudicar a competência ovocitária, de maneira que possa ser aplicado posteriormente na produção “in vitro” de embriões bovinos.

2. Objetivo geral e específico

Definir procedimentos e meios equilíbrio e de vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos que possibilitem uma maturação “in vitro” eficaz. Utilizar ovócitos imaturos recém aspirados, ou seja, na fase de dictióteno, possibilitando que os procedimentos de punção folicular possam ser realizados em locais distantes de laboratórios. Os ovócitos criopreservados, logo após a coleta, poderão ser transportados sem dificuldades para os laboratórios onde então será realizada a maturação “in vitro”.

Adicionalmente, o trabalho objetivou avaliar o efeito na taxa de maturação nuclear de ovócitos imaturos cultivados “in vitro” quando submetidos à diferentes concentrações e tempos de exposição a soluções vitrificantes, predizendo desta forma, avaliar o efeito de toxicidade dos meios de manipulação sobre a capacidade de desenvolvimento do ovócito.

3. Material e Métodos

3.1. Localização

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LRA/ DVT/ UFV). Foram utilizados ovários coletados de fêmeas bovinas, sem raça e idade definidas e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em frigorífico localizado a 90 km do laboratório.

3.2. Coleta dos ovários

Os ovários foram coletados no frigorífico imediatamente após o abate e evisceração. Após a coleta, foram imersos em garrafa térmica com solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C. Em seguida ao término da coleta, foram transportados até o laboratório, num tempo máximo de duas horas.

3.3. Manipulação dos ovócitos

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina e colocados em banho Maria a 38°C. Imediatamente, os folículos ovarianos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados por agulhas 25x7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado num cálice cônico.

Ao término da aspiração, foi respeitado um tempo de aproximadamente cinco minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o pelete contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice com auxílio de pipeta de Pasteur. Estes ovócitos foram transferidos para uma placa de Petri contendo Talp-Hepes (Bavister et al., 1983). Com auxílio de microscópio estereoscópico e micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo Talp-Hepes, que foi mantida em placa aquecedora a 38°C, e então classificados morfológicamente de acordo com Costa et al. (1997a). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *cumulus oophorus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus* foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo Talp-Hepes.

3.4. Delineamento experimental

Foram utilizados 2742 ovócitos imaturos, distribuídos em 61 tratamentos, sendo um controle, com três repetições para cada tratamento. Cada repetição continha cerca de 10 a 15 ovócitos, perfazendo uma média de 30 a 45 ovócitos por tratamento.

O meio base utilizado para a manipulação e para as soluções de equilíbrio, vitrificação e reidratação foi o Talp-Hepes, acrescido de 0,4% de Albumina Sérica Bovina (BSA) e ajustado para 285 mOsm/kg (BAVISTER et al., 1983). No tratamento controle, os ovócitos foram selecionados e submetidos à MIV.

Para o processo de equilíbrio, foi utilizada uma placa com nove escavações. Os ovócitos foram transferidos, aproximadamente quinze de cada vez, para uma das escavações contendo a solução de equilíbrio (SE) de acordo com cada tratamento e experimento (Tabela 1). Os ovócitos foram mantidos imersos na SE por um

determinado tempo de equilíbrio (TE). Após o término do TE os ovócitos foram transferidos para outra escavação que continha a solução de vitrificação (SV) permanecendo por um minuto. Posteriormente, os ovócitos de cada tratamento foram submetidos à reidratação.

Tabela 1: Distribuição dos tratamentos proposto no delineamento experimental para avaliar a toxicidade das soluções de vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos

Solução de Equilíbrio	Tempo de Equilíbrio	Solução de Vitrificação
	10	
3% de EG	8	40% de EG + 1,0 mol L ⁻¹ de sacarose
20% de EG	6	Ou 25% de EG
40% de EG	5	+
	4	25% de DMSO
	2	+
	1	1,0 mol L ⁻¹ de sacarose
	10	40% de EG + 1,0 mol L ⁻¹ de sacarose
8% de EG		Ou
16% de EG	5	25% de EG
		+
32% de EG		25% de DMSO
	1	+
		1,0 mol L ⁻¹ de sacarose

3.5. Reidratação dos ovócitos

Os ovócitos foram reidratados gradativamente em soluções de sacarose. Na reidratação, foi utilizada uma placa com nove escavações, sendo que os ovócitos foram depositado na primeira, contendo 300 µL de meio-base com 0,5 mol.L⁻¹ de sacarose e permanecendo por no máximo um minuto. Em seguida, os ovócitos foram

transferidos sucessivamente para a segunda, terceira e quarta escavações, contendo, respectivamente, 500 µL de meio-base com 0,5 mol L⁻¹ de sacarose, 500 µL de meio-base com 0,33 mol L⁻¹ de sacarose e 500 µL de meio-base com 0,17 mol L⁻¹ de sacarose. Em cada uma dessas soluções os ovócitos foram mantidos por um minuto, ao término da última reidratação, onde os ovócitos foram lavados sucessivamente em meio Talp-Hepes. Para tanto, foram transferidos para a quinta e sexta escavação, contendo 500 µl de meio Talp-Hepes. Após a reidratação, os ovócitos foram avaliados, e submetidos à maturação “in vitro”.

3.6. Maturação “in vitro”

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 10µg/mL de FSH (Costa, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo aproximadamente 15 ovócitos em 400µL de meio de maturação em cada poço, equilibrado por no mínimo duas horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas. Após este período, foram submetidos à avaliação da taxa de maturação nuclear.

3.7. Avaliação da taxa de maturação nuclear “in vitro”

Para avaliação da taxa de maturação nuclear, os ovócitos de todos os tratamentos foram submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus oophorus* (COSTA et al., 1997b). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâmina e

corados com orceína a 2%, segundo COSTA et al. (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz, com aumento de 1000X em imersão, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados, de acordo com a configuração cromossômica em metáfase I (MI) (Figura 1), metáfase II (MII) (Figura 2), cromatina condensada em grumos (CCG) ou sem configuração cromossômica (SCC). Foi considerado como maturação nuclear o ovócito que apresentasse configuração cromossômica em metáfase II e também o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente.

3.8. Análises estatísticas

Os resultados obtidos da variável qualitativa “avaliação morfológica pós reidratação” foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (SAEG, 1999). Os resultados da taxa de maturação nuclear pós cultivo foram comparados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

4.0. Resultados e Discussão

Observou-se que as combinações SE com 3% de EG, com TE de 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 minutos e SV de 40% de EG + 1 mol.L⁻¹ de sacarose proporcionaram taxa de metáfase II de 55,2; 73,5; 71,1; 76,7; 63,6; 69,0 e 70,6% respectivamente, sendo semelhantes ($P>0,05$) ao grupo testemunha (74,0%). As combinações SE com 8% de EG, com TE de 1, 5, e 10 minutos e SV de 40% de EG + 1 mol.L⁻¹ de sacarose

proporcionaram taxa de metáfase II de 73,8; 64,9 e 68,9% respectivamente, sendo semelhante ($P>0,05$) ao grupo testemunha (81,8%).

Combinação de SE com 16% de EG, com TE de 5 minutos e SV de 40% de EG + 1 mol.L⁻¹ de sacarose proporcionou taxa de metáfase II de 57,1% sendo semelhante ($P>0,05$) ao grupo testemunha (72,6%). As combinações de 20% de EG, com TE de 1 e 8 minutos e SV de 40% de EG + 1 mol.L⁻¹ de sacarose proporcionou taxa de metáfase II de 61,1 e 66,7% respectivamente, sendo semelhante ($P>0,05$) ao grupo testemunha (79,5%).

Entretanto, as combinações de SE com 32 e 40% de EG nos diferentes TE não possibilitaram a maturação nuclear. Da mesma forma, os tratamentos expostos à SV de 25% de EG + 25% de DMSO + 1 mol.L⁻¹ de sacarose não possibilitaram à maturação nuclear. No presente estudo, os tratamentos que apresentaram os melhores resultados comparados ao grupo testemunha estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Taxa de maturação nuclear (% de Metáfase II) de ovócitos de bovinos cultivados *in vitro*, após exposição à diferentes soluções de equilíbrio e tempos em solução vitrificante de 40% de EG + 1mol.L⁻¹ de sacarose

	Controle	T1	T2	T4	T5	T6	T8	T10
G3	74,0	55,2	73,5	71,1	76,7	63,6	69,7	70,6
G8	81,8	73,8	-	-	64,9	-	-	68,9
G16	76,2 ^a	48,0 ^b	-	-	57,1 ^a	-	-	28,2 ^b
G20	79,5 ^a	61,1 ^a	40,0 ^b	29,5 ^b	50,0 ^a	46,4 ^b	66,7 ^a	33,3 ^b

* ^{a,b} Percentuais com letras sobrescritas diferentes na mesma linha indicam diferença ($P<0,05$) entre tratamentos pelo teste do qui-quadrado.

G(Grupo) 3, 8, 16 e 20 refere-se as soluções de equilíbrio nas concentrações de 3, 8, 16 e 20% de Etilenoglicol, respectivamente.

T(Tempo de Equilíbrio) 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 refere-se aos tempos de 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 minutos, respectivamente.

Controle, cultivado logo após a aspiração.

O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeação, a concentração e a escolha do crioprotetor mais apropriado (WANI et al. 2004). Outro fator capaz de interferir na criopreservação ovocitária é o tempo de exposição e a

remoção do crioprotetor (NOWSHARI et al. 1994). O conjunto destes fatores são de fundamental importância e objetivam minimizar ao máximo a formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR et al. 2005) e a ocorrência de injúrias ovocitárias provocadas por variações osmóticas ou tóxicas das SV e SE (PEDRO et al. 1997; MEZZALIRA et al, 2002).

Ao analisar os tratamentos utilizados no presente estudo, constatou-se que estes apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo testemunha, principalmente quando foram utilizados tratamentos com concentração de equilíbrio com 32 e 40% de EG.

O estágio de maturação parece ser um fator que interfere consideravelmente na sobrevivência de ovócitos submetidos a vitrificação (LIM et al. 1991). Comparado aos resultados encontrados no presente estudo, Magnusson et al. (2008) demonstraram taxas de maturação superiores utilizando soluções crioprotetoras contendo 30 e 40% de EG. Entretanto, estes autores trabalharam com ovócitos em diferentes estádios de maturação, encontrando taxas de clivagem de 71,15% e 81,82% a partir de ovócitos imaturos expostos a soluções de vitrificação contendo 30 e 40% de EG, respectivamente.

Em todos os estádios analisados, o estágio de MII parece ser o estágio mais resistente a criopreservação. Tais informações corroboram os achados de outros autores (HOCHI et al. 1997; LeGal et al. 1994; DIEZ et al., 2005). O motivo da maior tolerância deste grupo de ovócitos à criopreservação permanece desconhecido (MEN et al. 2002).

Segundo LeGal et al. (1994), a explicação para maior tolerância a criopreservação de ovócitos em estágio de MII é que estes demonstram ser mais permeáveis ao crioprotetores em comparação aos ovócitos em MI. Já Lim et al. 1992, afirmam que os ovócitos imaturos tem menor capacidade de sobrevivência após a

criopreservação, uma vez que este processo danifica o núcleo e o arranjo de microorganelas no ovócito, comprometendo todo o processo de síntese proteica envolvido nas etapas de maturação, fertilização e desenvolvimento.

Adicionalmente, Zhou et al. (2010) relataram que essas injúrias causadas pelo resfriamento em ovócitos imaturos são mais intensas do que em maturados devido a baixa estabilidade da membrana e a susceptibilidade do citoesqueleto. A partir destes achados, pode-se ressaltar que as taxas de maturação nuclear encontradas no presente estudo, podem ter sido influenciadas negativamente por ter sido realizada a partir de ovócitos imaturos que foram expostos às soluções de equilíbrio.

Outro fator primordial para a eficiência da criopreservação de ovócitos bovinos é tipo de crioprotetor utilizado. O EG, crioprotetor utilizado neste trabalho, tem se mostrado mais conveniente para vitrificação de ovócitos bovinos, equinos e humanos, principalmente por possuir alta permeabilidade e baixa toxicidade (PYLES 2006). Entretanto, os crioprotetores jamais são capazes de garantir a sobrevivência de 100% das células criopreservadas. Essa falha pode ser causada pela toxicidade do crioprotetor, uma vez que limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento, limitando então a eficácia do mesmo (FAHY 1986). Outro aspecto a considerar é que os crioprotetores podem ter ação direta causando crio-injúrias, como lesão de membranas (ARNOLD et al. 1983).

A comparação do presente trabalho com tratamentos homólogos se torna muito complexa, face a heterogeneidade dos procedimentos experimentais encontrados na literatura pesquisada. Contudo, Pyles (2006) ao expor os ovócitos imaturos a soluções contendo meio de manutenção (MN) + 10% EG + 10% DMSO e uma outra solução contendo MN + 10% EG + 10% Dimetilformamida (DM) obteve taxas de clivagem de 37,1 e 33%, respectivamente. De acordo com os resultados

obtidos por este autor, as taxas de clivagem dos ovócitos imaturos apresentaram-se bem inferiores quando comparadas ao controle.

Estes achados, em associação com os achados do presente estudo, corroboram vários outros autores que constataram a maior sensibilidade de ovócitos imaturos aos efeitos dos agentes crioprotetores e ao processo de vitrificação (OTOI et al. 1995; MEN et al. 2002). Ainda, segundo Pyles (2006), o efeito deletério do meio de vitrificação sobre os ovócitos foi mais pronunciado, principalmente pela DM, sendo que a solução DMSO + EG foi menos deletéria ao grupo de ovócitos expostos. Este fato corrobora HURT et al. (2000), que concluíram que o EG é o crioprotetor mais vantajoso para os ovócitos, devido a sua baixa toxicidade e alto poder de penetração na célula. Entretanto, assim como no presente estudo, a redução das taxas de maturação podem estar relacionadas as condições experimentais, visto que assim que o ovócito é retirado do ambiente folicular ele reassume a meiose (DIEZ et al. 2005).

Zhou et al. (2010) relatam que o tempo de exposição em soluções contendo 30 e 40% de EG deve ser menor que um minuto para que haja viabilidade dos ovócitos. Sendo assim, pode-se sugerir que este foi o principal motivo das SE com 32 e 40% de EG nos diferentes TE não terem possibilitado a maturação nuclear. Os mesmos autores, descrevem que o DMSO apresenta maior toxicidade quando comparado ao EG, fato este que pode explicar que os tratamentos expostos à SV de 25% de EG + 25% de DMSO + 1 mol.L⁻¹ de sacarose não possibilitaram a maturação nuclear.

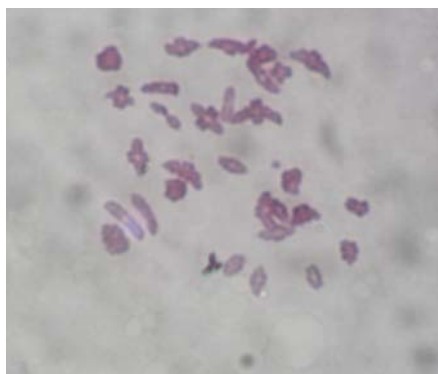


Figura 1. Ovócito em metáfase I. 1000X.

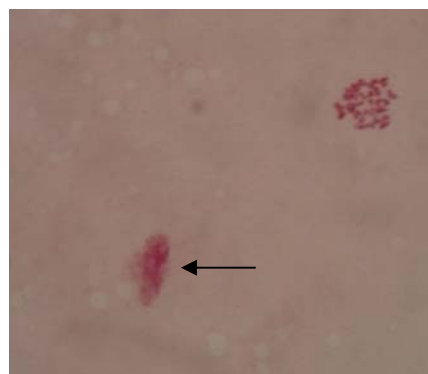


Figura 2. Ovócito em metáfase II com corpúsculo polar (seta). 1000X.

5.0. Conclusão

Conclui-se que concentrações elevadas de EG (32 e 40%) associadas aos TE utilizados e SV de 25% de EG + 25% de DMSO + 1 mol L⁻¹ de sacarose danificam o ovócito, impossibilitando a maturação nuclear, após o cultivo ‘in vitro’.

6.0. Agradecimento

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a execução deste experimento.

7.0. Referências Bibliográficas

ANTINORI, M.; LICATA, E.; DANI, G.; CERUSICO, F.; VERSACI, C.; ANTINORI, S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reproduction Biomed Online**, v.14, p.72–79, 2007.

ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochem. Biophys. Acta**, v.782, p.121-128, 1983.

BAVISTER, B.D.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; LENZ, R.; AX, R.L.; FIRST, N.L. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology Reproduction**, v. 28, p.717-725, 1983.

BOGLIOLO L, ARIU F, ROSATI I, ZEDDA MT, PAU S, NAITANA S. Vitrification of immature and in vitro matured horse oocytes. **Reproduction Fertility Development**, v.18, p.149–150, 2006.

CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **Journal Reproduction Development**, v.50, p.685–696, 2004.

COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. Belo Horizonte, 1994. p.155. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.417-424, 1997a.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997b.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997c.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C.O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v.64, p.317-333, 2005.

DHALI, A., MANIK, R.S., DAS, S.K., SINGLA, S.K., PALTA, P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 1295-1303, 2000.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

GASPARRINI, B.; ATTANASIO, L.; DE ROSA, A.; MONACO, E.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.335–342, 2007.

HOCHI, S., et al. Effect of nuclear stages during in-vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. **Theriogenology**, v.47, p.345, 1997. Abstract.

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

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, p. 73-80, 2007.

LE GAL, F.; GASQUI, P.; RENARD, J.P. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model. **Cryobiology**, v.31, p.154–170, 1994.

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

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

LIU, Y.; DU, Y.; LIN, L.; LI, J.; KRAGH, P.M.; KUWAYAMA, M.; BOLUND, L.; YANG, H.; VAJTA, G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. **Cryo Letters**, v.29, p.315–320, 2008.

MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W.B.; GOISSIS, M.D.; YAMADA, C.; TAVARES, L.M.T.; ORTIZ, M.E.; ASSUMPÇÃO, D. VISINTIN, J.A. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.265-273, 2008.

MAZUR, P.; SEKI, S.; PINN, I.L.; KLEINHANS, F.W.; EDASHIGE, K. Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. **Cryobiology**, v.51, p.29–53, 2005.

MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v.57, p.1095–103, 2002.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; CRUZ, F.B.; BARBIERI, D.P.; DAMIANI, J.C. Vitificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 2, p. 108-114, 2002.

NOWSHARI, M.A.; NAYUDU, P.L.; HODGES, J.K. Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.1193–1204, 1994.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

PEDRO, P.B.; ZHU, S.E.; MAKINO, N.; SAKURAI, T.; EDASHIGE, K.; KASAI, M. Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. **Cryobiology**, v.35, p.150–158, 1997..

PYLES, E.S.C.S.; **Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006. p.121. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, 2006.

REN, H.S.; WEI, Y.; HUA, T.C.; ZHANG, J. Theoretical prediction of vitrification and devitrification tendencies for cryoprotective solutions. **Cryobiology**, v.31, p.47–56, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.

SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777-783, 1990.

SRIPUNYA, N. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **Journal Reproduction Development**, v.56, p.176-81, 2010.

SISTEMA de análise estatística e genética (SAEG), UFV, Central de processamento de dados, Viçosa- M.G., 1999.

SUCCU, S.; LEONI, G.G.; BEBBERE, D.; BERLINGUER, F.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; MADEDDU, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v.74, p.1337–1344, 2007.

VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D.P.; LEHMKUHL, R.C.; RUBIN, M.I.B.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.45, p.91–94, 2002.

WANI, N.A.; MAURYA, S.N.; MISRA, A.K.; SAXENA, V.B.; LAKHCHAURA, B.D. Effect of cryoprotectants and their concentration on in vitro development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.61, p.831–842, 2004.

WOOD, M.J.; BARROS, C.; CANDY, C.J.; CARROLL, J.; MELENDEZ, J.; WHITTINGHAM, D.G. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. **Biology Reproduction**, v.49, p.489-495, 1993.

ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W., LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66–72, 2010.

CAPÍTULO II

Maturação “*in vitro*” de ovócitos bovinos vitrificados com etilenoglicol

Artigo Submetido à Revista Brasileira de Zootecnia (Protocolo 533/10)

RESUMO: A ação de diferentes concentrações de etilenoglicol (EG) durante diferentes períodos de tempo foi avaliada sobre ovócitos imaturos de bovinos vitrificados. Quatro soluções de equilíbrio (SE), contendo 3, 8, 16 ou 20% de EG e os tempos de equilíbrio (TE) de 1, 5, 6, 8 e 10 minutos foram utilizados, de acordo com cada tratamento. Os ovócitos foram expostos a solução contendo 3% de EG e aos cinco TE, enquanto a SE contendo 8% de EG foi utilizada nos tempos 1, 5 e 10 minutos. As SE com 16 e 20% de EG foram expostas aos tempos de equilíbrio de 5 e 8 minutos, respectivamente. Os ovócitos de todos tratamentos foram ao final do período de equilíbrio expostos à solução de vitrificação (SV) contendo 40% de EG + $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose. Ovócitos maturados “*in vitro*” logo após a aspiração serviram como grupo controle para o experimento composto de 1.112 ovócitos imaturos, distribuídos em 11 tratamentos. Os ovócitos foram expostos à solução de equilíbrio de acordo com o tratamento e transferidos para solução de vitrificação. O envase dos ovócitos foi efetuado em palhetas de 0,25mL que foram submersas imediatamente em nitrogênio líquido. Posteriormente, as palhetas foram reaquecidas e os ovócitos reidratados gradativamente em soluções de sacarose. Após 24 h no meio de maturação sob atmosfera controlada determinou-se a taxa de maturação nuclear. Observou-se que as combinações SE com 3% de EG, com TE de 1, 5, 6, 8 e 10 minutos proporcionaram taxas de metáfase II de 10,4; 19,3; 10,0; 7,6 e 14,3% respectivamente. As combinações SE com 8% de EG, com TE de 1, 5 e 10, e SE com 16% de EG por 5 minutos e SE de 20% de EG por 8 minutos proporcionaram taxas de metáfase II de 12,9; 6,9; 2,4; 23,1 e 2,0% respectivamente, diferindo ($P < 0,05$) do grupo de ovócitos controle (73,7%). Os resultados indicam que o protocolo com 16% de etilenoglicol na solução de equilíbrio e por cinco minutos, proporcionou índices razoáveis de maturação “*in vitro*”.

Palavras-chave: criopreservação, etilenoglicol, maturação nuclear

***In vitro* maturation of immature bovine oocytes vitrified with Ethylene Glycol**

ABSTRACT: The action of different concentrations of Ethylene Glycol (EG) during different time periods was evaluating to immature bovine oocytes vitrified. Four equilibrations solutions (ES), containing 3, 8, 16 or 20% EG and equilibration time (ET) of 1, 5, 6, 8 and 10 minutes were used according to each treatment. The oocytes were exposed to a solution containing 3% EG and for 5 minutes ET, while the ES containing 8% EG was used for 1, 5 and 10 minutes. The ES with 16 and 20% EG were exposed to equilibration time of 5 and 8 minutes, respectively. At the end of equilibrium time the oocytes of all treatments were exposed to vitrification solution (VS) containing 40% EG + 1.0 mol L⁻¹ sucrose. *In vitro*-matured oocytes immediately after aspiration served as control group for the experiment composed of 1112 imature oocytes, distributed in 11 treatments. The oocytes were exposed to the solution of equilibrium in accordance with the treatment and transferred to vitrification solution. The oocytes were loaded in 0.25 mL straws and immediately submerged in liquid nitrogen. Subsequently, the straws were thawing and the oocytes were gradually rehydrated in solutions of sucrose. After 24h in maturation medium under controlled atmosphere determined the rate of nuclear maturation. It was observed that the combinations would be 3% of EG, with TE of 1, 5, 6, 8 and 10 minutes proportionated the metaphase II rates of 10.4, 19.3, 10.0, 7.6 and 14.3%, respectively. The combinations of SE with 8% EG with TE of 1,5 and 10; SE with 16% EG by 5 minutes and 20% EG by 8 minutes provided metaphase II rates of 12.9, 6.9, 2.4, 23.1 and 2.0 %, respectively, differing (P<0.05) of oocytes control group (73.7%). The results indicate that the protocol with 16% ethylene glycol in equilibration solution for 5 minutes proportionate reasonable rates of *in vitro* maturation of bovine oocytes.

Key words: Cryopreservation, Ethylene glycol, nuclear maturation

*** Foram utilizados neste capítulo os tratamentos que obtiveram os melhores resultados de MIV nos procedimentos do Capítulo I.**

Introdução

O desenvolvimento e a utilização de biotécnicas ligadas à reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos. Neste contexto, o Brasil se destaca principalmente na produção “in vitro” de embriões bovinos, contribuindo com 66,6% dos embriões produzidos no mundo durante o ano de 2008 (Viana et al., 2010).

No entanto, esse percentual poderia ser superior, caso alguns fatores limitantes fossem solucionados. Dentre eles, está a necessidade de um laboratório de fecundação “in vitro” próximo ao local de coleta dos ovócitos, uma vez que a partir do momento da aspiração folicular, o ovócito que se encontra no estágio dictióteno da prófase meiótica, reinicia a meiose até atingir a metáfase II. Logo após a aspiração, o potencial de desenvolvimento dos ovócitos já fica comprometido (Lonergan & Fair, 2008). Por esta razão, os ovócitos necessitam ser transportados ao laboratório o mais rápido possível, para dar continuidade à maturação, fecundação e cultivo “in vitro” em ambiente e atmosfera controlada.

Contudo, devido a ampla extensão territorial do Brasil, as propriedades estão localizadas distantes desses laboratórios, impossibilitando ou dificultando a produção “in vitro” de embriões. Deste modo, a criopreservação imediata dos ovócitos recém aspirados e imaturos contribui para a manutenção da qualidade ovocitária, auxiliando sobremaneira o procedimento da produção “in vitro” de embriões, em locais inacessíveis onde tal técnica não seria possível.

Dentre as metodologias para criopreservação de ovócitos, a vitrificação, tem sido apontada como uma alternativa (Vieira et al., 2002). Porém, os resultados obtidos com a vitrificação de ovócitos bovinos, especialmente os imaturos, ainda são

muito baixos e pouco atrativos economicamente (Yamada et al., 2006; Magnusson et al., 2008; Zhou et al., 2010).

A criopreservação de ovócitos imaturos (recém aspirados) possibilita que o processamento seja realizado no próprio local de aspiração folicular. Adicionalmente, a vitrificação não requer equipamentos especiais, o que facilita sobremaneira a criopreservação de ovócitos no sentido prático e econômico, o que consequentemente, reduz de maneira significativa os custos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de etilenoglicol (EG) por diferentes períodos de tempo foi avaliada sobre ovócitos imaturos de bovinos vitrificados.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (LRA/ DVT/ UFV). Os ovários foram coletados imediatamente após o abate e a evisceração de fêmeas bovinas, sem raça e idade definidas e em diferentes fases do ciclo estral, abatidas em frigorífico localizado a 90 km do laboratório.

Os ovários foram imersos em garrafa térmica com solução fisiológica (0,9% de NaCl) acrescida de sulfato de estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C e transportados até o laboratório, num tempo máximo de duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina e colocados em banho maria a 38°C. Os folículos ovarianos (entre 2 a 8 mm de diâmetro) foram puncionados com

agulhas 25 x 7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros e o líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado em cálice de vidro cônico estéril.

O período de decantação dos ovócitos após o término da aspiração foi de cinco minutos. O “pellet” foi recuperado do fundo do cálice com auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para uma placa de Petri (90 x 15 mm), contendo meio Talp-Hepes (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), segundo Bavister et al. (1983). Com auxílio de um microscópico estereoscópico e uma micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri (30 x 10 mm) contendo Talp-Hepes, mantida em placa aquecedora a 38°C para serem classificados morfológicamente de acordo com Costa et al. (1997a). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *Cumulus oophorus* compacto e com mais de três camadas de células do *cumulus* foram selecionadas em uma placa de Petri (30 x 10 mm) contendo Talp-Hepes para posteriormente serem submetidos aos tratamentos. Os ovócitos que constituíram o grupo controle foram submetidos à maturação “*in vitro*” logo após a aspiração.

O experimento foi conduzido com 1112 ovócitos imaturos, distribuídos em 11 tratamentos, em seis repetições. Cada palheta continha cerca de 15 a 20 ovócitos, perfazendo uma média de 100 ovócitos por tratamento. O número de tratamentos realizados diariamente foi baseado na quantidade de ovócitos viáveis obtidos após a aspiração dos ovários.

O meio utilizado para a manipulação e para as soluções de equilíbrio, vitrificação e reidratação foi o Talp-Hepes, acrescido de 0,4% de Albumina Sérica Bovina (BSA) (MERCK) e ajustado para 285 mOsm/kg (Bavister et al., 1983). As SE assim como as SV foram confeccionadas no momento do uso. Para as SE foram utilizadas diferentes concentrações de EG (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), de acordo com o tratamento, acrescidas ao meio Talp-Hepes. A SV foi constituída do meio Talp-Hepes acrescido de 40% de EG + 1,0 mol/L⁻¹ de sacarose.

Para o processo de equilíbrio utilizou-se uma placa com nove escavações. Os ovócitos foram transferidos (quinze de cada vez, em média) para uma das escavações contendo a solução de equilíbrio (SE) de acordo com cada tratamento e experimento (Tabela 1). Os ovócitos foram mantidos imersos na SE pelo tempo de equilíbrio (TE) de acordo com o tratamento, o qual foram transferidos para a solução que continha a solução de vitrificação (SV). O envase dos ovócitos foi conduzido em palhetas de 0,25mL após o período de 60 segundos que estiveram expostos a solução de vitrificação, as quais foram vedadas e imersas em nitrogênio líquido. Aproximadamente metade da palheta foi colocada rapidamente no nitrogênio e o restante foi colocado lentamente. As palhetas e raques foram identificadas e armazenadas por 30 dias até a próxima avaliação.

Tabela 1: Delineamento experimental para vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos com diferentes concentrações de etilenoglicol na solução de equilíbrio

Tratamentos	Tempo de equilíbrio	Solução de equilíbrio	Solução de vitrificação
T1	1 minuto	3% de EG	40% de EG + 1,0 mol/L ⁻¹ de sacarose
T2	5 minutos		
T3	6 minutos		
T4	8 minutos		
T5	10 minutos		
T6	1 minuto	8% de EG	
T7	5 minutos		
T8	10 minutos		
T9	5 minutos	16% de EG	
T10	8 minutos	20% de EG	
TEST	Testemunha		

Os ovócitos vitrificados foram reaquecidos pela exposição das palhetas por cinco segundos ao ar, seguindo de imersão em banho-maria a 37°C por 30 a 45 segundos. O conteúdo de cada paleta foi depositado em placa escavada (Corning®) com 300 µl de meio Talp-Hepes com 0,4% de BSA e 0,5 mol L⁻¹ de sacarose por no máximo um minuto. Em seguida, os ovócitos foram transferidos sucessivamente para outros poços contendo 500 µl de Talp-Hepes com 0,5; 0,33 e 0,17 mol L⁻¹ de sacarose, por um minuto em cada solução. Ao término da última reidratação, os ovócitos foram lavados sucessivamente em meio Talp-Hepes e submetidos à maturação “in vitro”.

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 10 µg/ml de FSH (Costa, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo aproximadamente 15 ovócitos em 400 µL de meio de maturação em cada poço, equilibrado por no mínimo duas horas à 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas. Após este período, os ovócitos foram submetidos à avaliação da taxa de maturação nuclear.

Todos ovócitos foram submetidos ao procedimento de remoção das células do *Cumulus oophorus* (Costa et al., 1997b). Posteriormente, foram hipotonizados, fixados em lâmina e corados com orceína a 2%, segundo Costa et al. (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 1000X em imersão, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados, de acordo com a configuração cromossômica, em metáfase II (MII). Ovócito com configuração cromossômica metáfase II e presença do corpúsculo polar foi considerado como maturo.

Os resultados da taxa de maturação nuclear pós cultivo foram comparados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002).

Resultados e Discussão

Os resultados relacionados à taxa de maturação nuclear encontram-se apresentados na Tabela 2. A taxa de maturação nuclear do grupo de ovócitos controle (73,7%), neste experimento foi semelhante às reportadas por Park et al. (1997), Le Gal et al. (1999), Costa et al. (2002), Martins et al. (2005), Yamada et al. (2006) e Santos (2008), os quais obtiveram 81,0; 71,0; 84,0; 74,6, 75,9 e 80,1%, respectivamente. Costa et al. (2002) relataram que ligeiras diferenças observadas por diferentes pesquisadores podem ser atribuídas, possivelmente, às particularidades dos meios de maturação e a qualidade geral dos ovócitos obtidos em função da época do ano em que foram coletados, este último influenciado pelo fator nutricional. Contudo, o resultado do grupo controle neste trabalho confirma que os procedimentos e meios adotados para a maturação “in vitro” dos ovócitos foram adequados.

Tabela 2: Taxa de maturação nuclear após o reaquecimento e reidratação de ovócitos imaturos vitrificados em meio Talp-Hepes com 40% de Etilenoglicol e 1 mol L⁻¹ de Sacarose

Tratamentos	Tempos na solução de equilíbrio/concentração de Etileno Glicol	N	% de MII
Controle	Controle	133	73,7 ^a
T9	5 min/16% EG	91	23,1 ^{b,c}
T2	5 min/3% EG	109	19,3 ^{b,c,e}
T5	10 min/3% EG	98	14,3 ^{b,c,e,g}
T6	1 min/8% EG	85	12,9 ^{b,c,e,g,i}
T1	1 min/3% EG	106	10,4 ^{b,d,e,g,i,k}
T3	6 min/3% EG	100	10,0 ^{b,d,e,g,i,k,m}
T7	5 min/16% EG	101	6,9 ^{b,d,e,g,i,k,m,o}
T4	8 min/3% EG	105	7,6 ^{b,d,e,g,i,k,m,o,p}
T8	10 min/20%EG	84	2,4 ^{b,d,f,h,j,l,n,o,p,q}
T10	8 min/20% EG	100	2,0 ^{b,d,f,h,j,l,n,o,p,q}

Taxas com letras diferentes sobrescritas diferem (P<0,05) pelo teste qui-quadrado.

Analisando as interações de SE x TE, observa-se que a combinação de 16% de SE com o TE por cinco minutos (T9) proporcionou a maior taxa de MII (23,1%), sendo superiores os 19,0 e 17,5% encontradas por Costa et al. (2002) e Fagundes (2002), respectivamente. Contudo, utilizando protocolos semelhantes, Martins et al. (2005) encontraram resultados superiores aos observados neste experimento. Ao avaliar o efeito da vitrificação na maturação “in vitro” de ovócitos bovinos imaturos, este autor verificou que o protocolo utilizando 20% EG na SE, com TE de 5 minutos e com a SV contendo 40% de EG + 1M de sacarose, proporcionou 44,55% de metáfase II.

As piores taxas de maturação verificadas (T10) na presente pesquisa foram conferidas ao meio com concentração mais elevada (20%) de EG e maior tempo de

equilíbrio (8 minutos), assim como relatado por Martins et al. (2005). A justificativa para este ocorrido, segundo Im et al. (1997), pode estar associado não ao estresse osmótico, mas sim à eventos bioquímicos como inativação de enzimas necessárias para progressão meiótica e/ou biofísicos como a eluição de lipídeos das membranas. Este fato é confirmado neste trabalho pelo T9, onde a SE contendo 16% EG durante um TE de cinco minutos reproduziu uma taxa de maturação de 23,1%, demonstrando desta forma que, ao diminuir o TE em relação a concentrações mais elevadas de EG, tem-se resultados mais satisfatórios.

Segundo Costa et al. (2002), o tipo e a concentração de crioprotetor, assim como o tempo de equilíbrio e exposição dos ovócitos são de suma importância no processo de vitrificação, corroborando com Vieira et al. (2008), que ressalta que estes são os principais fatores limitantes que determinam baixa taxa de clivagem e de blastocistos após a vitrificação. Desde modo, os tempos de equilíbrio versus a concentração do EG podem ter causados danos adversos nos ovócitos do presente estudo, refletindo em baixa taxa de maturação nuclear dos tratamentos, quando comparados ao grupo controle.

Uma das formas de evitar os efeitos nocivos no processo de vitrificação seria aumentar as concentrações de crioprotetores no decorrer do equilíbrio, diminuindo o tempo de exposição a esta solução (Vajta et al. 1998). Tal fato pode ser comprovado no presente experimento onde ao avaliar a SE com 8%, o TE que proporcionou melhor taxa de maturação (12,6%) foi de um minuto (T6) e não o TE de 10 minutos (T8), que apresentou a taxa de 2,4%. Por outro lado, Papis et al. (2000) demonstraram que o aumento no período de equilíbrio, utilizando concentrações mais baixas de crioprotetores também pode ser uma alternativa eficiente.

Ao comparar o tempo de equilíbrio entre tratamentos com a SE de 3% de EG pode-se observar que ocorreu diferença ($P < 0,05$) entre o TE de 5 e 10 minutos em

relação aos demais, demonstrando uma superioridade destes tratamentos (T2 e T5). Observa-se ainda que, a SE com menor concentração de EG e também o menor TE proporcionaram a melhor taxa de MII (19,3%). Condição semelhante foi observada por Martins et al, (2005) trabalhando com SE de 3% de EG em TE de cinco minutos (18,07% de MII). Corroborando, Vajta et al. (1998), também encontraram resultados semelhantes, os quais vitrificaram ovócitos maduros bovinos utilizando o OPS (*open pulled straw*) mantendo-os por 30 a 45 segundos na solução de equilíbrio, seguido por 25 segundos na solução de vitrificação, obtendo desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Entretanto, estes pesquisadores além de utilizarem paletas diferentes trabalharam com ovócitos maduros, o que possivelmente contribuiu para esta diferença, já que, os referidos são mais resistentes à criopreservação do que os imaturos (Otoi et al., 1995).

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados seria a metodologia de envase, que foi realizada em OPS, tendo como principal vantagem, a velocidade com que as estruturas são envasadas e recuperadas, reduzindo o tempo de exposição dos embriões a concentrações muito altas de crioprotetores. Neste caso, o volume reduzido minimiza os danos na zona pelúcida que ocorrem no decorrer do resfriamento e reaquecimento (Beebe et al., 2002). Vajta et al. (1998) também ressaltam que com uso de OPS, a taxa resfriamento é sete a dez vezes mais rápida do que com palhetas convencionais, semelhantes às utilizadas neste experimento.

Portanto, consideramos que um dos maiores entraves do trabalho realizado foi a utilização de paletas de 0,25 mL. A principal vantagem da vitrificação em palhetas de 0,25 mL seria a praticidade, tendo em vista o custo benefício. Porém, devemos ressaltar a necessidade em lacrar essas palhetas para evitar o contato direto com o nitrogênio líquido (N₂L), conforme foi realizado neste experimento. Ao vedar as palhetas, evita-se o risco hipotético de contaminação com patógenos que podem estar

presentes no nitrogênio líquido (Cobo & Diaz, 2011). Entretanto, como já mencionado, os métodos de vitrificação com sistemas abertos (OPS; cryolop, grades de microscopia eletrônica, microgotas) apresentam eficiência maiores quando comparado ao método de palheta de 0,25 mL, por usarem taxas de resfriamentos extremamente altas com redução na concentração dos crioprotetores (Cobo & Diaz, 2011). Por outro lado, o risco de contaminação pelos sistemas abertos, limitou sua utilização em larga escala (Vajta e Kuwayama, 2006).

As taxas de maturação nuclear encontradas indicam que os crioprotetores, os tempos de equilíbrio ou até mesmo os procedimentos de vitrificação realizados não foram eficazes na preservação da integridade dos ovócitos. Tal fato foi descrito também por Costa et al. (2002), Martins et al. (2005) e Cetin & Bastan (2006), os quais não encontraram eficiência na vitrificação de ovócitos bovinos com uso do etilenoglicol. No entanto, neste experimento, optou-se pelo uso do EG, tendo em vista, ser um crioprotetor de baixa toxicidade (Kasai et al., 1990).

Conclusões

O protocolo com 5 minutos de equilíbrio em Talp-Hepes com 16% de etilenoglicol e a solução de vitrificação com 40% de etilenoglicol + 1,0 mol L⁻¹ de sacarose, proporcionou índices razoáveis de maturação “in vitro”(23,1%), para ovócitos imaturos de bovinos. A metodologia de vitrificação para ovócitos imaturos de bovinos ainda deve ser aprimorada, pois não apresenta resultados consistentes e com repetibilidade.

Agradecimento

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a execução deste experimento.

Referências

- BAVISTER, B.D.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L. et al. Factors affecting sucessful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v.28, p.717-725, 1983
- BEEBE, L. F. S.; CAMERON, R.D.A.; BLACKSHAW, A.W. et al. Piglets born from centrifuged and vitrified early and perihatching blastocysts. **Theriogenology**, v.57, p.2155-2165, 2002.
- CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. **Animal Reproduction Science**, v.92, p.29-36, 2006.
- COBO, A.; DIAZ, C. Clinical application of oocytes vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Fertility and Sterility, Article in Press, 2011.
- COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestrututais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.417-424, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997b.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997c.
- COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; TORRES, C.A.A. et al. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1122-1129, 2002.
- FAGUNDES, L.M.. **Congelação de ovócitos desnudos ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o etilenoglicol pelo método convencional**. 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- 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.
- KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, A. et al. A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal Reproduction Fertility**, v.89, p.90-97, 1990.
- 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.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos- Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.
- MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W.B.; GOISSIS, M.D. et al. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.265-273, 2008.
- MARTINS, R.D.; COSTA, E.P.; CHAGAS, J.S.C. et al. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.128-134, 2005.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N. et al. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.
- PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.54, p.651-658, 2000.
- PARK, S.E.; LEE, K.A.; SON, W.Y. et al. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v.68, p.920-926, 1997.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SANTOS, G.M. **Diferentes tempos de exposição e meios para o transporte na taxa de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos**. 2008, 33f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- 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.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P. et al. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38 (suplemento 2), p.661-674, 2010.
- VIEIRA, A.D.; FORELL, F.; FELTRIN, C. et al. Calves born after direct transfer of vitrified bovine in vitro-produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p. 314–318, 2008.
- VIERA, A.D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D.P. et al. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.45, p.91-94, 2002.
- YAMADA, C.; CAETANO, H.V.A.; SIMÕES, R.; et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, 2006.
- ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W. et al. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66–72, 2010.

CAPÍTULO III

Maturação nuclear e ultraestrutura de ovócitos bovinos cultivados “in vitro” após a vitrificação

Artigo Submetido à Revista Brasileira de Zootecnia (Protocolo 286/11)

RESUMO: Objetivou-se avaliar os parâmetros celulares de integridade funcional e estrutural de ovócitos bovinos previamente equilibrados em duas soluções crioprotetoras, vitrificados e posteriormente maturados “in vitro”. Os ovócitos foram distribuídos em dois tratamentos, solução de equilíbrio (SE) 3% de etilenoglicol (EG) (SE3) e SE16 (16% de EG), onde permaneceram por cinco minutos. Os tratamentos foram expostos ao final do equilíbrio à solução de vitrificação (SV), contendo 40% de EG e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose. Em seguida, os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25mL e imersos em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram descongelados e reidratados gradativamente em soluções de sacarose. Em seguida, foram cultivados por 24 horas e após a maturação, os ovócitos de cada tratamento tiveram as células do *cumulus oophorus* removidas, e processadas para a avaliação da taxa de maturação nuclear e citoplasmática. Representavam o tratamento testemunha, ovócitos maturados “in vitro” logo após a aspiração. Observou-se que as combinações SE3 e SE16 proporcionaram taxas de metáfase II (MII) de 19,3 e 23,13% respectivamente, diferindo ($P < 0,05$) ao grupo testemunha (73,7%). Os ovócitos do grupo controle apresentaram configuração citoplasmática compatível com maturação, ou seja, estágio de MII. Tal fato foi evidenciado principalmente pela presença de numerosas mitocôndrias, caracterizando o estágio de maturação citoplasmática ovocitária. Os ovócitos dos grupos tratados apresentaram configuração compatível com degeneração celular. Este achado sugere que os tratamentos de vitrificação interferiram na qualidade dos ovócitos por interromper o processo de meiose ovocitária. Assim, os tratamentos testados se mostraram pouco efetivos na vitrificação de ovócitos bovinos.

Palavras-chave: criopreservação, etilenoglicol, maturação citoplasmática

Ultrastructure and nuclear maturation of bovine oocytes cultured in vitro after vitrification

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the parameters of cell functional and structural integrity of bovine oocytes equilibrated in two cryoprotectant solutions, vitrified and matured in vitro. The oocytes were allocated to two treatments, the equilibrium solution (ES) 3% ethylene glycol (EG) (ES3) and ES16 (16% EG), where they remained for five minutes. The treatments were exposed to the end of the balance to the vitrification solution (VS) containing 40% EG and 1.0 mol.L⁻¹ sucrose. Then, the oocytes were loaded into 0.25 mL straws and immersed in liquid nitrogen. Subsequently, they were thawed and rehydrated gradually in sucrose solutions. Then, they were cultured for 24 hours and after maturation, the oocytes from each treatment had the *oophorus cumulus* cells removed, and processed to assess the rate of nuclear and cytoplasmic maturation. The control treatment was represented by in vitro oocytes matured after aspiration. It was observed that the combinations SE16 SE3 provided rates of metaphase II (MII) of 19.3 and 23.13% respectively, differing ($P < 0.05$) from the control group (73.7%). The oocytes from the control group showed configuration compatible with cytoplasmic maturation, ie, stage of MII. This fact was evidenced mainly by the presence of numerous mitochondria, characterizing the stage of oocyte cytoplasmic maturation. The oocytes of treated groups showed configuration compatible with cellular degeneration. This finding suggests that vitrification treatments interfere with the quality of oocytes for interrupting the process of oocyte meiosis. Thus, the treatments shown to be less effective in the vitrification of bovine oocytes.

Key words: cryopreservation, ethylene glycol, cytoplasmic maturation

** Foram utilizados neste capítulo os tratamentos que obtiveram os melhores resultados de MIV após vitrificação nos procedimentos do Capítulo II. Sendo selecionados para essas próximas etapas, dois tratamentos (3 e 16% de EG em TE de 5 minutos).*

Introdução

A maturação inadequada dos ovócitos, seja citoplasmática ou nuclear, reflete em baixos índices de fecundação. No cultivo “in vitro” de ovócitos, o sucesso na maturação citoplasmática é mais difícil de ser alcançado que na maturação nuclear (Diez et al., 2005). Entretanto, segundo estes mesmos autores, maturação citoplasmática inadequada pode comprometer seriamente a viabilidade do ovócito.

Neste contexto, o conhecimento da maturação “in vitro” (MIV) é crucial para que ocorra maturação citoplasmática e nuclear adequadas. Tal fato é preponderante para o sucesso das etapas posteriores, possibilitando assim o incremento na proporção de embriões clivados produzidos “in vitro”.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite a investigação de eventos citoplasmáticos e tem sido utilizada para elucidar detalhes referentes à morfologia do ovócito. Grande parte dos ovócitos sofre consideráveis danos morfológicos e funcionais no decorrer do processo de criopreservação (Morato et al., 2008a), sendo a microscopia eletrônica uma importante ferramenta para a avaliação da integridade celular.

O ovócito apresenta danos nucleares após o processo de vitrificação (Men et al., 2003a; Men et al., 2003b), bem como outras alterações ultra-estruturais (Diez et al., 2005) responsáveis pelo comprometimento da competência para o desenvolvimento ovocitário.

Assim, é importante a avaliação ultraestrutural de ovócitos maturados “in vitro”, após o processo de vitrificação, tendo em vista o comprometimento da capacidade de sobrevivência do ovócito, e o consequente potencial de desenvolvimento embrionário. Diante disto, objetivou-se neste trabalho avaliar parâmetros celulares de integridade funcional e estrutural de ovócitos bovinos

previamente expostos a duas soluções crioprotetoras de equilíbrio, vitrificados e posteriormente submetidos à maturação “in vitro”.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da UFV (vitrificação, maturação “in vitro” e acondicionamento das amostras), e no Núcleo de Microscopia e Microanálise-UFV.

Os ovários foram coletados no frigorífico imediatamente após o abate e evisceração. Após a coleta, foram imersos em garrafa térmica com solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C. Em seguida ao término da coleta, foram transportados até o laboratório, num tempo máximo de duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina e colocados em banho Maria a 38°C. Imediatamente, os folículos ovarianos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados por agulhas 25x7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado num cálice cônico.

Ao término da aspiração, foi respeitado um tempo de aproximadamente cinco minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o pelete contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice com auxílio de pipeta de Pasteur. Estes ovócitos foram transferido para uma placa de Petri contendo Talp-Hepes, segundo Bavister et al. (1983). Com auxílio de microscópico estereoscópico e micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo Talp-Hepes, que foi mantida em placa aquecedora a 38°C, e então classificados morfológicamente de acordo com Costa et al. (1997a). Apenas os ovócitos imaturos

classificados como *cumulus oophorus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus* foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo Talp-Hepes.

Foram utilizados ovócitos imaturos, distribuídos em dois tratamentos, com três repetições para cada tratamento. O meio base utilizado para a manipulação e para as soluções de equilíbrio, vitrificação e reidratação foi o Talp-Hepes, acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ajustado para 285 mOsm/kg (Bavister et al., 1983). Os ovócitos do grupo testemunha foram submetidos à maturação “*in vitro*” logo após a aspiração.

Para o processo de equilíbrio, foi utilizada uma placa com nove escavações. Os ovócitos foram transferidos para uma das escavações contendo a solução de equilíbrio com três ou 16% de EG. Os ovócitos foram mantidos imersos na SE por um tempo de equilíbrio (TE) de cinco minutos. Após esse período os ovócitos foram transferidos para outra escavação com a solução de vitrificação contendo 40% de EG e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose.

Os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25mL durante o tempo que estiveram expostos a solução de vitrificação, sendo a seguir vedadas e imersas em nitrogênio líquido. Aproximadamente metade da palheta foi colocada rapidamente no nitrogênio e o restante foi colocado lentamente.

Os ovócitos foram descongelados por meio de exposição das palhetas por cinco segundos ao ar, seguidos de imersão em banho Maria a 37°C por 30 a 45 segundos. Após a imersão, os ovócitos foram reidratados gradativamente em soluções de sacarose.

Os ovócitos descongelados foram depositados em 300µl de meio-base com $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose, permanecendo nesta solução por no máximo um minuto. Em seguida, os ovócitos foram transferidos sucessivamente para 500µl de meio-base com 0,5; 0,33 e $0,17 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose, permanecendo em cada solução por um

minuto. Ao término da última reidratação, os ovócitos foram lavados sucessivamente em meio Talp-Hepes e submetidos à MIV.

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 10µg/ml de FSH (Costa, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo aproximadamente 15 ovócitos em 400µL de meio de maturação em cada poço, equilibrado por no mínimo duas horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas.

Após a maturação, ovócitos de cada grupo tiveram as células do *cumulus oophorus* removidas segundo metodologia proposta por Costa et al. (1997b). Em seguida, foram divididos em dois grupos, sendo uns fixados em glutaraldeído, até o momento do processamento e outros processados para avaliação da taxa de maturação nuclear (MN).

Na avaliação da MN, após a remoção das células do *cumulus oophorus*, os ovócitos foram hipotonizados, fixados em lâmina e corados com orceína a 2%, segundo Costa et al. (1997c). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz com aumento de 1000X, para avaliar o estágio do ciclo celular meiótico. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração dos cromossomos em MII. Foi considerado como maturação nuclear o ovócito que apresentasse configuração cromossômica em MII e também o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar, quando presente.

A fixação dos ovócitos para estudo em microscopia eletrônica de transmissão foi realizada utilizando uma solução de glutaraldeído a 1% em tampão fosfato 0,15 mol.L⁻¹ e pH 7,6. Após a fixação, foram lavados três vezes no mesmo tampão, durante 15 minutos cada banho, e submetidos à pós-fixação em tetróxido de ósmio a

1% por uma hora e 30 minutos em temperatura de 4°C. Posteriormente, foram realizadas três lavagens sucessivas de cinco minutos cada em tampão fosfato. Após a lavagem, foi realizada a desidratação em soluções crescentes de álcool PA (50, 70, 80, 90 e 100%) durante dez minutos cada, repetindo-se por três vezes a lavagem em álcool PA em concentração 100%.

Após a desidratação foi realizada a etapa de embebição e inclusão com resina EPON-812, preparado na proporção de 47,05% de EPON-812; 24,70% de DDSA e 28,25% de NMA. Estas substâncias foram homogeneizadas com agitador magnético por 20 minutos durante a preparação. A embebição foi realizada em concentrações crescentes de resina (50, 75, 100%), durante 12 horas cada. Os ovócitos foram incluídos na resina utilizando moldes como suporte e mantidos em estufa à 60°C por 72 horas, para a polimerização.

Posteriormente, os blocos foram desbastados em ultramicrotomo (MT2-B Ultra Microtome, SORVALL®) utilizando-se navalha de vidro para aproximar os ovócitos da superfície de corte, e então dar início aos cortes semi-finos. Os cortes obtidos foram montados em lâminas histológicas, corados com azul de toluidina a quente, e depois avaliados em microscópio de luz para confirmação da presença de ovócitos. Depois de retirados os cortes semifinos, a navalha foi trocada para navalha de diamante, e então realizados os cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos foram coletados em gradículas de cobre e contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila e por cinco minutos em citrato de chumbo. Após a contrastação, os cortes foram examinados em MET (Zeiss, modelo EM 109).

Os resultados da taxa de maturação nuclear pós cultivo foram comparados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade (Sampaio, 2002). Para análise ultraestrutural, foi realizada a caracterização das organelas citoplasmáticas e avaliado o aspecto de distribuição e

associação entre as organelas, como também a zona pelúcida e o espaço perivitelínico.

Resultados e Discussão

Os resultados relacionados à taxa de maturação nuclear encontram-se apresentados na Tabela 1. Os tratamentos aplicados aos ovócitos influenciaram negativamente a taxa de maturação nuclear, quando comparados ao grupo testemunha.

Tabela 1: Taxa de maturação nuclear após o descongelamento e reidratação, para ovócitos imaturos vitrificados com a solução de vitrificação contendo 40% de Etilenoglicol e 1 mol.L⁻¹ de Sacarose

Tratamento	N	%MII
CONTROLE	133	73,7 ^a
SE3	109	19,3 ^b
SE16	91	23,1 ^b

Taxas com letras diferentes sobrescritas diferem (P<0,05) pelo teste qui-quadrado. SE3 e 16 refere-se a SE de 3% e 16% de EG no tempo de 5 minutos.

A taxa de maturação nuclear do tratamento testemunha (73,7%), encontrada neste experimento, foi superior a taxa encontrada por Prentice et al. (2011), que registrou 61% de metáfase II. Resultados semelhantes foram reportadas por Martins et al. (2005), Yamada et al. (2006) e Santos (2008), os quais obtiveram 74,6, 75,9 e 80,1%, respectivamente. Costa et al. (2002) relataram que ligeiras diferenças observadas por diferentes pesquisadores podem ser atribuídas, possivelmente, às particularidades dos meios de maturação e a qualidade geral dos ovócitos obtidos em função da época do ano em que foram coletados, este último influenciado pelo fator nutricional. No entanto, o resultado do tratamento testemunha confirma que os

procedimentos e meios adotados para a maturação “in vitro” dos ovócitos foram adequados.

Resultados de maturação nuclear pós-vitrificação em palhetas de 0,25 mL são superiores aos trabalhos de Fagundes et al. (2004) e Prentice et al. (2011), inferiores aos resultados de Martins et al. (2005). A principal vantagem da vitrificação em palhetas de 0,25 mL seria a praticidade, tendo em vista o custo benefício. Porém, devemos ressaltar a necessidade em lacrar essas palhetas para evitar o contato direto com o nitrogênio líquido (N₂L), conforme foi realizado neste experimento. Ao vedar as palhetas, evita-se o risco hipotético de contaminação com patógenos que podem estar presentes no nitrogênio líquido (Cobo & Diaz, 2011).

Os métodos de vitrificação com sistemas abertos (OPS, cryolop, grades de microscopia eletrônica, microgotas) apresentam eficiência maiores quando comparado ao método de palheta de 0,25 mL, por usarem taxas de resfriamentos extremamente altas com redução na concentração dos crioprotetores (Cobo & Diaz, 2011). Entretanto, o risco de contaminação pelos sistemas abertos, limitou o uso em larga escala (Vajta e Kuwayama, 2006). Adicionalmente, Morato et al. (2008b) descrevem que a vitrificação em palhetas de 0,25 mL promove uma recristalização intracelular durante o reaquecimento, levando assim a danos ultraestruturais.

É reportado que no decorrer da maturação do ovócito, após o procedimento de vitrificação, ocorrem modificações nas características morfológicas ultraestruturais (Diez et al., 2005). Com base nestas descrições, o presente trabalho buscou descrever modificações na morfologia e redistribuição das organelas de ovócitos vitrificados imaturos e posteriormente maturados “in vitro”.

No grupo controle foram verificadas as seguintes características ultraestruturais: grande quantidade de grânulos corticais distribuídos ao longo da periferia do citoplasma, bem como as mitocôndrias, evidenciando desta forma a fase

de metáfase II, corroborando com achados de Costa (1994), sendo que as condições e os meios utilizados por este autor foram os mesmos usados no presente experimento.

Observou-se, também, grande quantidade de mitocôndrias, distribuídas, principalmente ao longo da periferia do ovócito, com delimitação bastante nítida, corroborando aos achados de Costa (1994). Sabe-se que a abundância de mitocôndrias está intimamente correlacionada com áreas de maior consumo de energia, conforme mencionado por Máximo (2009). Este autor ressalta que as mitocôndrias exercem um papel de extrema importância, pois são responsáveis pelo suprimento energético no processo de maturação, sendo crucial para o desenvolvimento do ovócito a sua movimentação para áreas de alto consumo. Adicionalmente, um número reduzido de mitocôndrias no decorrer do metabolismo ovocitário, pode influenciar posteriormente na embriogênese inicial, por causar uma distribuição anormal de organelas (Shoubridge et al., 2007).

Observou-se a presença de vesículas de tamanhos variados distribuídas pelo citoplasma. No interior da zona pelúcida (ZP) não foi possível observar a presença de projeções citoplasmáticas, condizente com Costa (1994), que observaram que as células da *corona radiata* emitiam poucos prolongamentos na ZP e nas invaginações da membrana plasmática, após 24 horas de maturação.

Foi possível detectar mitocôndrias no formato *hooded*, também observadas por Costa (1994) e Máximo (2009), e que são caracterizadas pela projeção de um pequeno apêndice sobre as mesmas formando um arco ou capuz (Máximo, 2009). Esse mesmo autor descreve que capuz pode estar relacionado a um incremento da atividade metabólica mitocondrial durante o período de migração das organelas, que caracteriza a maturação nuclear e citoplasmática.

No estágio de vesícula germinativa os grânulos corticais (GC) se distribuem em grupos dispostos pelo citoplasma e, no término da maturação, quando o ovócito

atinge o estágio de MII, os GC encontram-se distribuídos em íntimo contato com a membrana plasmática, uma forma estratégica de arranjo, preparando para penetração espermática (Wang et al., 1997).

Quanto aos ovócitos tratados SE 3%, verificou-se que as mitocôndrias estavam com a integridade comprometida, sendo difícil até mesmo avaliar o limite da estrutura. Esta condição sugere uma degeneração de estruturas citoplasmáticas, proporcionando desta forma danos irreversíveis aos ovócitos. Corroborado aos achados da maturação nuclear, tendo em vista uma baixa taxa de maturação dos ovócitos vitrificados quando comparados aos não vitrificados. Entretanto, vale ressaltar que o procedimento de preparo dos ovócitos foi o mesmo para o grupo controle e para os tratamentos.

Conforme demonstrado na Figura 1, pode-se observar que as mitocôndrias encontram-se posicionadas equidistantes, característico de uma maturação citoplasmática incompleta. Adicionalmente, esta maturação incompleta pode estar associada com o rompimento da zona pelúcida, como é possível de observar na imagem. Esta solução de continuidade da ZP poderá comprometer o desenvolvimento deste ovócito. Segundo Fabbri et al. (2000), a criopreservação causa a ruptura da ZP, além de contribuir para a desorganização das células do *cumulus oophorus*, promovendo assim interrupção das junções comunicantes, contribuindo negativamente para o desenvolvimento subsequente do ovócito após a vitrificação.

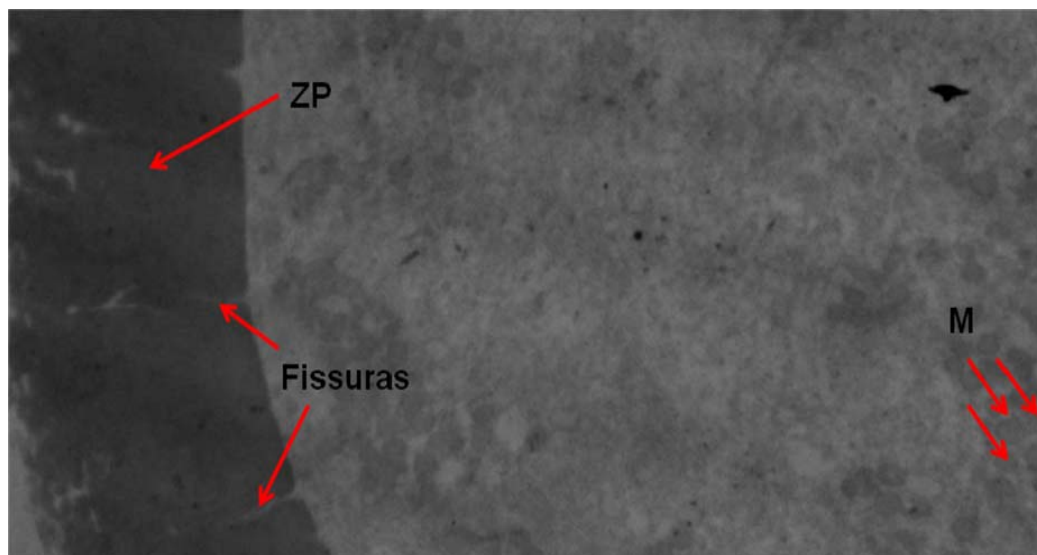


FIGURA 1 - Micrografia eletrônica de ovócito bovino vitrificado imaturo com solução de equilíbrio de 3% de EG, após a maturação *in vitro*. M = Mitocôndrias; ZP = Zona Pelúcida; 3000 X

Na Figura 2 foi observado espaço perivitelínico (EPV) bem delimitado. As mitocôndrias no citoplasma do ovócito não estão nítidas. Este fato é sugestivo de uma desidratação insuficiente da célula, impedindo assim seu desenvolvimento. Segundo Costa (1994), o desenvolvimento do EPV ocorre na maturação, sendo que no ovócito imaturo observa-se a ausência ou pequeno EPV.

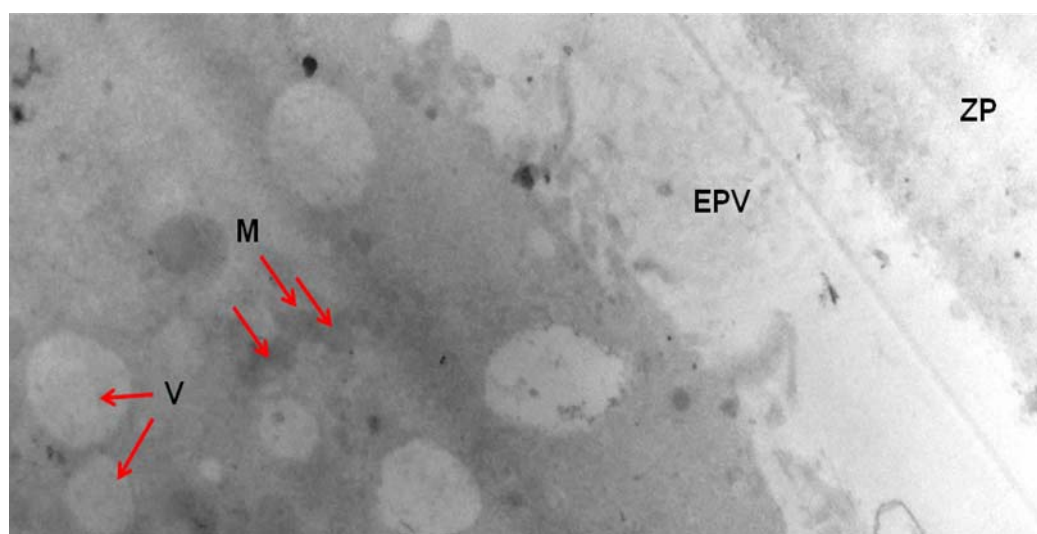


FIGURA 2 - Micrografia eletrônica de ovócito bovino vitrificado imaturo com solução de equilíbrio de 16% de EG, após a maturação *in vitro*. M = Mitocôndrias; V = Vesículas; EPV = Espaço Perivitelínico; ZP = Zona Pelúcida; 12000 X

A presença de estruturas com delimitações inespecíficas, como foi possível observar nas mitocôndrias dos grupos tratados, sugere ocorrência de degeneração das organelas. Adicionalmente, pode-se ressaltar a ausência de grânulos corticais presentes na superfície do citoplasma. Segundo Costa (1994) a principal característica a nível ultra-estrutural de ovócitos maturados é a dispersão de grande quantidade de GC na superfície do citoplasma. Portanto, os achados de maturação citoplasmática não foram condizentes com a maturação nuclear, sugere-se que apesar de encontrarmos baixa taxa de maturação nuclear nos tratados conforme Tabela 1, na maturação citoplasmática observaram-se ovócitos com características de degeneração.

O fato de não ter visto cromossomos na maturação citoplasmática não indica que elas não estejam presentes, tendo em vista que os ovócitos processados para MET não foram submetidos à técnica para avaliar a maturação nuclear, evidentemente. Adicionalmente, a posição do corte, principalmente na realização dos semifinos pode ser oposta à posição dos cromossomos. Outra possibilidade é também o conjunto de cromossomos terem sido eliminados durante a realização dos semifinos. Entretanto, sugere-se haver tido a maturação nuclear sem, contudo ser acompanhado pela citoplasmática. Isso demonstra que a capacidade de completar a maturação citoplasmática se desenvolve posteriormente a maturação nuclear (Dode et al., 2000).

Conclusões

Soluções de equilíbrio contendo três ou 16% de EG com tempo de equilíbrio de cinco minutos e com a solução de vitrificação contendo 40% de etilenoglicol + 1,0 mol.L-1 de sacarose, para a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos

proporcionou baixas taxas de maturação nuclear. Porém, quando avaliada a ultraestrutura desses ovócitos, foi possível observar uma ineficiência na maturação citoplasmática, indicando assim um comprometimento subsequente na fecundação “in vitro”.

Agradecimento

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a execução deste experimento.

Referências

- BAVISTER, B.D.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L. et al. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology Reproduction**, v.28, p.717-725, 1983.
- COBO, A.; DIAZ, C. Clinical application of oocytes vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Fertility and Sterility**, Article in Press, 2011.
- COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. 1994. 155f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.417-424, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997b.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; et al. Técnica para a avaliação do estágio de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.433-440, 1997c.
- COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; TORRES, C.A.A. et al. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1122-1129, 2002.
- DIEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E. et al. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v.64, p.317-333, 2005.

- DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G. et al. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p. 207-214, 2000.
- FABBRI, R., PORCU, E., MARSELLA, T. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.169, p.39-42, 2000.
- FAGUNDES, L.M.; COSTA, E.P.; TORRES, C.A.A. et al. Congelação de ovócitos desnudados ou não, maduros e imaturos de bovinos, utilizando o etilenoglicol pelo método convencional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.2026-2036, 2004.
- MARTINS, R.D.; COSTA, E.P.; CHAGAS, J.S.C. et al. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Animal Reproduction**, v.2, p.128-134, 2005.
- MÁXIMO, D.M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação “in vitro”**. 2009. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade de Brasília, Brasília.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J. et al. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v.47, p.73-81, 2003a.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J. et al. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.245-250, 2003b.
- MORATO, R., MOGAS, T., MADDOX-HYTTEL, P. Ultrastructure of Bovine oocytes exposed to Taxol prior to OPS vitrification. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.1318-1326, 2008a.
- MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. et al. Embryo development and structural analysis of *in vitro* matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. **Theriogenology**, v.70, p.1536-1543, 2008b.
- PRENTICE, J.R.; SINGH, J.; DOCHI, O. et al. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.75, p.602-609, 2011.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SANTOS, G.M. **Diferentes tempos de exposição e meios para o transporte na taxa de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos**. 2008, 33f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SIRARD, M. A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 777-783, 1990.

- SHOUBRINDGE, E.A.; WAI, T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.87-111, 2007.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236-244, 2006.
- YAMADA, C.; CAETANO, H.V.A.; SIMÕES, R.; et al. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, 2006.
- WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R. et al. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Development Growth Differentiation**. v.39, p.607–615, 1997.

CAPÍTULO IV

Diferentes soluções de vitrificação na abundância de mRNA em ovócitos bovinos imaturos

Artigo Submetido à Pesquisa Agropecuária Brasileira (Protocolo 11088)

Resumo - A quantificação de transcritos ovocitários pode auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem a resposta celular ao processo de vitrificação. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes soluções vitrificantes de equilíbrio (SE) de Etilenoglicol (EG), sobre a abundância relativa de transcritos relacionados ao estresse celular (HSP70.1, PRDX), transição materno-zigótica (ZAR1, MATER), maturação (GDF9) e transporte de água (AQP3) em ovócitos imaturos de bovinos. Após exposição de duas soluções de equilíbrio (SE3% e SE16%). Avaliou-se a abundância de transcritos armazenados no citoplasma ovocitário por PCR em tempo real. Observou-se uma sobre-regulação ($P<0,05$) de HSP70.1 e sub-regulação ($P<0,05$) de MATER e ZAR1 em ovócitos imaturo submetidos ao tratamento com SE16%, quando comparado ao grupo não vitrificado. Para esta mesma comparação não houve diferença ($P>0,05$) na expressão dos outros transcritos. Quando foi comparado o grupo SE3% com o grupo não vitrificado, também não foi observada alteração na quantidade dos mRNA estudados. Conclui-se que o sistema de vitrificação SE3% não influencia na quantidade de transcritos armazenados no citoplasma de ovócitos bovinos imaturos. Por outro lado, a exposição de ovócitos imaturos a SE16% aumenta a expressão do gene de estresse HSP70.1 e diminui a dos genes ZAR1 e MATER, importantes para o desenvolvimento ovocitário pós-fertilização.

Termos para indexação: reprodução animal, produção *in vitro*, etilenoglicol, expressão gênica

Different vitrification solutions on the abundance of mRNA in immature bovine oocytes

Abstract – The quantification of the oocyte transcripts may help understand the molecular mechanisms that evolve the cellular response to vitrification process. The objective of this study was to evaluate the effect of different equilibrium solutions constituted by vitrification (ES) of ethylene glycol (EG) on the relative abundance of transcripts related to cellular stress (HSP70.1, PRDX), maternal-zygotic transition (ZAR1, MATER), maturation (GDF9) and water transport (AQP3) in immature bovine oocytes. After exposure of two equilibrium solutions (SE3 and SE16%), was evaluated the abundance of transcripts stored in the oocyte cytoplasm by PCR in real-time. There was an up-regulation ($P < 0.05$) of HSP70.1 and down-regulation ($P < 0.05$) of MATER and ZAR1 in immature oocytes submitted to treatment with SE16%, when compared to the unglazed. For this same comparison there was no difference ($P > 0.05$) in the expression of other transcripts. When the group SE3% was compared with the group unglazed, there was also no change in the amount of mRNA studied. We conclude that the SE3% glazing system does not influence the amount of stored transcripts in the cytoplasm of immature bovine oocytes. On the other hand, exposure of immature oocytes to SE16% increases the expression of stress gene HSP70.1 and decreases the gene ZAR1 and MATER, important for oocyte development after fertilization.

Index terms: Animal reproduction, *in vitro* production, ethylene glycol, gene expression

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotecnologia reprodutiva que pode ser usada para uma rápida multiplicação de genótipos superiores e uma diminuição no intervalo de gerações. Porém, um fator limitante na aplicação da PIVE é a baixa eficiência da criopreservação de ovócitos e embriões, uma vez que esse processo é importante para o transporte e armazenamento dessas estruturas. Desta forma, a baixa eficiência do processo continua sendo uma barreira para difusão desta biotécnica reprodutiva.

Dentre as técnicas de criopreservação, destaca-se a vitrificação que consiste no congelamento rápido do material biológico. Este procedimento permite a mudança de estado líquido diretamente para o vítreo, sem exposição ao estado cristalino, evitando assim a formação de gelo intracelular (Hong et al., 2009; Zhou et al., 2010). Assim, a vitrificação tem mostrado ser um sistema apropriado para a criopreservação de ovócitos e embriões (Martinez et al., 2002). Contudo, esse processo de congelamento envolve a exposição a condições não-fisiológicas de baixa temperatura (Visintin et al., 2002), provocando estresse celular e comprometendo a viabilidade ovocitária pós-vitrificação.

Neste contexto, a quantificação de transcritos ovocitários por PCR em tempo real pode ser utilizada no monitoramento do processo de vitrificação. Dentre os genes envolvidos com resposta ao estresse celular, destacam-se o *Heat Shock Protein 70.1* (HSP70.1) e a Peroxirredoxina 1 (PRDX1). O citoplasma ovocitário possui genes de efeito materno que codificam mRNA e proteínas importantes para o

desenvolvimento inicial do embrião, geralmente até a fase de transição-materno-zigótica (TMZ) (Lindeman & Pelegri, 2010). Entre esses genes encontra-se o *Zygote Arrest 1* (ZAR1) e *Maternal Antigen That Embryo Requires* (MATER). Outro gene que atua no desenvolvimento ovocitário é o *Growth Differentiation factor* (GDF9) (Eppig, 2001). A vitrificação é influenciada pelo trânsito de água pela membrana plasmática, que pode ser facilitado por meio de canais formados por proteínas transmembranas e especializados nesta função, denominadas aquaporinas (AQPs) (Liu et al., 2008). Mudanças no padrão de expressão gênica podem relacionar-se com as baixas taxas de sobrevivência pós-criopreservação. Portanto, a quantificação desses transcritos pode auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem a resposta celular ao processo de vitrificação.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes soluções de equilíbrio (SE) de Etilenoglicol (EG) na vitrificação sobre a abundância relativa dos transcritos de HSP70.1, PRDX, ZAR1, MATER, GDF9 e AQP3 em ovócitos imaturos de bovinos.

Material e métodos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (vitrificação, maturação “in vitro” e acondicionamento das amostras), e no Laboratório de Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite (EMBRAPA/CNPGL) em Juiz de Fora/MG (expressão gênica).

Os ovários foram coletados no frigorífico imediatamente após o abate e evisceração. Após a coleta, foram imersos em garrafa térmica com solução

fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990), em temperatura variando de 35 a 38°C. Em seguida ao término da coleta, foram transportados até o laboratório, num tempo máximo de duas horas.

No laboratório, os ovários foram transferidos para uma nova solução fisiológica 0,9% acrescida de sulfato de estreptomicina e colocados em banho Maria a 38°C. Imediatamente, os folículos ovarianos entre 2 a 8 mm de diâmetro foram puncionados por agulhas 25x7 gauge, acopladas a seringas de cinco mililitros. O líquido folicular contendo os ovócitos foi depositado num cálice cônico.

Ao término da aspiração, foi respeitado um tempo de aproximadamente cinco minutos para que ocorresse a decantação dos ovócitos. Posteriormente, o pelete contendo os ovócitos foi recuperado do fundo do cálice com auxílio de pipeta de Pasteur. Estes ovócitos foram transferidos para uma placa de Petri contendo Talp-Hepes, segundo Bavister et al. (1983). Com auxílio de microscópico estereoscópico e micropipeta, os ovócitos foram transferidos para outra placa de Petri contendo Talp-Hepes, que foi mantida em placa aquecedora a 38°C, e então classificados morfológicamente de acordo com Costa et al. (1997a). Apenas os ovócitos imaturos classificados como *cumulus oophorus* compacto e com até três camadas de células do *cumulus oophorus* foram transferidos para uma terceira placa de Petri contendo Talp-Hepes.

Foram utilizados ovócitos imaturos, distribuídos em dois tratamentos, com três repetições para cada tratamento. Cada repetição continha cerca de 30 a 40 ovócitos, perfazendo uma média de 100 ovócitos por tratamento, da mesma forma que o grupo controle.

O meio base utilizado para a manipulação e para as soluções de equilíbrio, vitrificação e reidratação foi o Talp-Hepes, acrescido de 0,4% de Albumina Sérica

Bovina (BSA) e ajustado para 285 mOsm/kg (Bavister et al., 1983). Os ovócitos do grupo testemunha foram submetidos à maturação “*in vitro*” logo após a aspiração.

Para o processo de equilíbrio, foi utilizada uma placa com nove escavações. Os ovócitos foram transferidos para uma das escavações contendo a solução de equilíbrio com três ou 16% de EG. Os ovócitos foram mantidos imersos na SE por um tempo de equilíbrio (TE) de cinco minutos. Após esse período os ovócitos foram transferidos para outra escavação com a solução de vitrificação contendo 40% de EG e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose.

Os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25mL, durante o tempo que estiveram expostos a solução de vitrificação, as quais foram vedadas e imersas em nitrogênio líquido (N_2L). Aproximadamente a metade da palheta foi colocada rapidamente no N_2L e o restante foi colocado lentamente.

Os ovócitos foram descongelados por meio de exposição das palhetas por 5 seg. ao ar, seguindo de imersão em banho Maria a 37°C por 30 a 45 segundos. Após a imersão, os ovócitos foram reidratados gradativamente em soluções de sacarose.

Os ovócitos descongelados foram depositados em $300\mu\text{L}$ de meio-base com $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose, permanecendo nesta solução por no máximo um minuto. Em seguida, os ovócitos foram transferidos sucessivamente para $500\mu\text{L}$ de meio-base com 0,5; 0,33 e $0,17 \text{ mol.L}^{-1}$ de sacarose, permanecendo em cada solução por um minuto. Ao término da última reidratação, os ovócitos foram lavados sucessivamente em meio Talp-Hepes e submetidos à maturação “*in vitro*”.

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em estro e $10\mu\text{g/mL}$ de FSH (Costa, 1994). A maturação foi realizada em placas Nunc (Nunc A/S; Cat.176740) de quatro poços, contendo aproximadamente 15 ovócitos em $400\mu\text{L}$ de meio de maturação em cada poço, equilibrado por no mínimo duas horas a $38,5^\circ\text{C}$, em atmosfera de 5% de CO_2 , 95% de ar atmosférico e

95% de umidade em estufa incubadora. Os ovócitos foram cultivados nestas condições de temperatura e atmosfera durante 24 horas.

Para a extração do RNA total e transcrição reversa, três pools de 10 ovócitos de cada tratamento foram submetidos ao procedimento de remoção do *cumulus oophorus* (Costa et al., 1997b). Em seguida, foram congelados em N₂L e mantidos armazenados em *freezer* -80°C até o momento da extração do RNA total.

A extração do RNA foi realizada com o *RNeasy Micro kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. O RNA foi eluído em água RNase-free, gerando um volume final de 11 µL (~55 ng de RNA). A transcrição reversa foi obtida com o kit *QuantiTect Rev. Transcription* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. O volume final foi de 20µL (~14.000 ng) de DNA complementar (cDNA).

A quantificação relativa foi realizada em triplicata utilizando o aparelho *Real-Time PCR* (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Foster City, CA, USA). As reações foram feitas com *QuantiTect SYBR Green PCR* (Qiagen) e 800 ng de cDNA para o gene HSP70.1 e PRDX1, 400 ng de cDNA para ZAR1, MATER, GDF9 e AQP3, e 200 ng para β-actina. O cDNA foi desnaturado a 95°C por 2 minutos; seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 53°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Após PCR, foi realizada análise da curva de *melting* para confirmar a especificidade do produto gerado. O gene da β-actina foi utilizado com controle endógeno e os ovócitos imaturos não vitrificados como calibradores de comparação. Os *primers* para os transcritos alvo deste estudo estão descritos na tabela 1. A eficiência dos *primers* foi calculada usando o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) e utilizada na quantificação relativa dos produtos dos genes.

Os resultados foram analisados pelo software REST ® (Pfaffl et al., 2002), usando teste aleatório de realocação fixa em combinações duplas. Considerou-se $P < 0,05$ como nível de significância.

Resultados e discussão

O transcrito do gene HSP70.1 foi sobre-regulado no grupo SE16% ($P < 0,05$; Fig. 1) quando comparado ao grupo de ovócitos não-vitrificados. As HSP70.1 são chaperonas que, dentre outras funções, atuam na manutenção da estrutura protéica em condições fisiológicas adversas (Christians et al., 2003), e seus níveis de expressão podem auxiliar no estudo da resposta celular ao estresse celular. O estresse celular no ovócito pode diminuir a sua viabilidade, uma vez que Pereira et al. (2010) observaram que ovócitos bovinos com alta expressão do gene HSP70.1 produziram embriões com maior índice apoptótico. Além disso, Anchamparuthy et al. (2010) encontraram uma maior abundância de genes de apoptose em ovócitos bovinos vitrificados em solução de 4,5% de EG. Desta forma, uma maior quantidade de HSP70.1 nos ovócitos expostos a SE16%, sugere que essa solução pode ter sido tóxica, diminuindo assim a viabilidade desses gametas.

Os transcritos dos genes ZAR1 e MATER apresentaram-se sub-regulados no grupo SE16% ($P < 0,05$; Fig. 1) quando comprado aos ovócitos não-vitrificados. ZAR1 e MATER são genes de efeito materno (Wu et al., 2003) que estão envolvidos na TMZ, pois foi demonstrado que ovócitos de fêmeas de camundongos nocautes para o gene ZAR1 e MATER, geralmente não se desenvolvem além do estágio de 2 células (Tong et al., 2000; Wu et al., 2003). Tong et al., 2004 demonstraram que a ausência da proteína de MATER parece ter um efeito prejudicial durante a TMZ, sugerindo que a mesma possa ter papel importante na ativação do genoma

embrionário. Portanto, o presente resultado sugere que transcritos dos genes ZAR1 e MATER podem ser afetados pelas condições de vitrificação, quando os ovócitos são expostos a solução de 16%, fato que pode prejudicar o desenvolvimento ovocitário pós-fertilização. De forma semelhante, foi observada uma diminuição da expressão do gene MATER em ovócitos imaturos de camundongos vitrificados (Habibi et al., 2010). Outros trabalhos também observaram que o processo de vitrificação diminui a abundância de transcritos de ovócitos ovinos e a taxa de desenvolvimento pós-fecundação *in vitro* (Succu et al., 2008; Chamayou et al., 2011).

Por outro lado, a expressão dos genes PRDX1, GDF9 e AQP3 nos ovócitos do grupo SE16% foi semelhante ($P>0,05$) aos dos ovócitos imaturos não-vitrificados (Fig. 1). Deste modo, o grupo S16% não alterou a expressão desses transcritos. Quando foi comparado o grupo SE3% com o grupo controle, não houve alteração na abundância de todos os genes avaliados (Fig.2). A PRDX1 pertence a uma família de seis membros das peroxidases que atuam principalmente na decomposição de H_2O_2 produzidos nas células (Leyens et al., 2004), reduzindo o estresse celular. O GDF9 está associado ao desenvolvimento ovocitário pela expansão das células do *cumulus* (Eppig, 2001), e também maior competência do ovócito (Hussein et al., 2006). As aquaporinas são proteínas canais que permitem a passagem rápida de água pelas membranas em direção ao gradiente osmótico (Barcroft et al., 2003; Watson et al., 2004). Portanto, além de água pequenas moléculas como o etilenoglicol podem ter sua passagem facilitada, auxiliando a movimentação de crioprotetores nos processos de criopreservação. Pelo exposto acima, os resultados do presente estudo sugerem que a solução de vitrificação SE3% pode ser menos tóxica aos ovócitos.

Conclusões

1. O sistema de vitrificação SE3% não influencia na quantidade de transcritos armazenados no citoplasma de ovócitos bovinos imaturos.
2. A exposição de ovócitos imaturos a SE16% aumenta a expressão do gene de estresse HSP70.1 e diminui a dos genes MATER e ZAR1, os quais são importantes para o desenvolvimento ovocitário pós-fertilização.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela concessão do auxílio financeiro.

Referências

- ANCHAMPARUTHY, V.M.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Expression Pattern of Apoptotic Genes in Vitrified-Thawed Bovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.83-90, 2010.
- BARCROFT, L.C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A.J. Aquaporin proteins in murine trophoctodermmediate transepithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, v.256, p.342-354, 2003.
- BAVISTER, B.D.; BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; LENZ, R.; AX, R.L.; FIRST, N.L. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology Reproduction**, v. 28, p.717-725, 1983.

CHAMAYOU, S.; BONAVENTURA, G.; ALECCI, C.; TIBULLO, D.; DI RAIMONDO, F.; GUGLIELMINO, A.; BARCELLONA, M.L. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. **Cryobiology**, v.62, p.130-134, 2011.

CHRISTIANS, E.S.; ZHOU, Q.; RENARD, J.; BENJAMIN, I.J. Heat shock proteins in mammalian development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.14, p.283-290, 2003.

COSTA, E. P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”**. 1994. 155 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal, área Reprodução Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Tipos morfológicos de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.417-424, 1997a.

COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; COSTA, A.H. Técnicas para desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, p.425-432, 1997b.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v.122, p.829-838, 2001.

HABIBI, A.; FARROKHI, N.; SILVA, F.M.da; BETTENCOURT, B.F.; BRUGES-ARMAS, J.; AMIDI, F.; HOSSEINI, A. The effects of vitrification on gene expression in mature mouse oocytes by nested quantitative PCR. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.27, p.599-604, 2010.

HONG, S.W.; SEPILIAN, V.; CHUNG, M.H.; KIM, J.T. Cryopreserved human blastocysts after vitrification result in excellent implantation and clinical pregnancy rates. **Fertil Steril**,XXX p.1-3, 2009.

HUSSEIN, T.S.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v.296, p.514-521, 2006.

LEYENS, G.; KNOOPS, B; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.69, p.243-251, 2004.

LINDEMAN, R.E.; PELEGRI, F. Vertebrate maternal-effect genes: insights into fertilization, early cleavage divisions, and germ cell determinant localization from studies in the zebrafish. **Molecular Reproduction and Development**, v.77, p.299-313, 2010.

LIU, H.; ZHENG, Z.; WINTOUR, E.M. Aquaporins and Fetal Fluid Balance. **Placenta**, v.29, p.840–847, 2008.

MARTINEZ, A.G.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G. Vitrication of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.11-21, 2002.

PEREIRA, M.M.; MACHADO, M.A.; COSTA, F.Q.; SERAPIAO, R.V.; VIANA, J.H.; CAMARGO, L.S. Effect of oxygen tension and serum during IVM on developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1074-1082, 2010.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.26-36, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.43, p.777-783, 1990.

SUCCU, S.; BEBBERE, D.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; LEONI, G.G.; BERLINGUER, F.; NAITANA, S.; LEDDA, S. Vitrication of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pré-implantation development and mRNA abundance. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.538-46, 2008.

TONG, Z.B.; GOLD, L.; PFEIFER, K.E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C.A.; DEAN, J.; NELSON, L.M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, v.26, p.267-268, 2000.

TONG, Z.B.; GOLD, L.; DE POL, A.; VANEVSKI, K.; DORWARD, H.; SENA, P.; PALUMBO, C.; BONDY C.A.; NELSON, L.M. Developmental expression and subcellular localization of mouse MATER, an oocyte-specific protein essential for early development. **Endocrinology**, v.145, p.1427-1434, 2004.

VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILAQUA, E.M.; MELO, M.R.B.; NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of Bos taurus vs Bos indicus embryos: Are they really diferent?. **Theriogenology**, v.57, p.345-359, 2002.

WATSON, A.J.; NATALE, D.R.; BARCROFT, L.C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.583-592, 2004.

WU, X.; VIVEIROS, M.M.; EPPIG, J.J.; BAI, Y.; FITZPATRICK, S.L.; MATZUK, M.M. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. **Nature Genetics**, v.33, p.187-191, 2003.

ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W. et al. Bovine oocyte vitrication using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrication protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66–72, 2010.

Tabela 1. Sequência dos *primers* específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank*

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/Referência
HSP70.1	F 5'AACAAGATCACCATCACCAACG3' R 5'TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG3'	59°C	275	NM174550
PRDX1	F 5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R 5'CCTTGTTTCTTGCGGTGTGTTG3'	53°C	224	Mourot <i>et al.</i> (2006)
Zar1	F 5'TGCCGAACATGCCAGAAG3' R 5'TCACAGGATAGGCGTTTGC3'	53°C	188	NM_001076203
MATER	F 5'TAATGACGACGCTGTGTTCTG3' R 5'GCGGTTCTCAGGTTCTTCAG3'	53°C	206	NM_001007814
GDF9	F 5'GACCCCTAAATCCAACAGAA3' R 5'AGCAGATCCACTGATGGAA3'	53°C	120	NM-174681
AQP3	F 5' ACCGATCTAGCCCCTCATCT 3' R 5' CCAACTCCACCGACAGAATC 3'	52°C	136	NM-001079794
β-ACTINA	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979

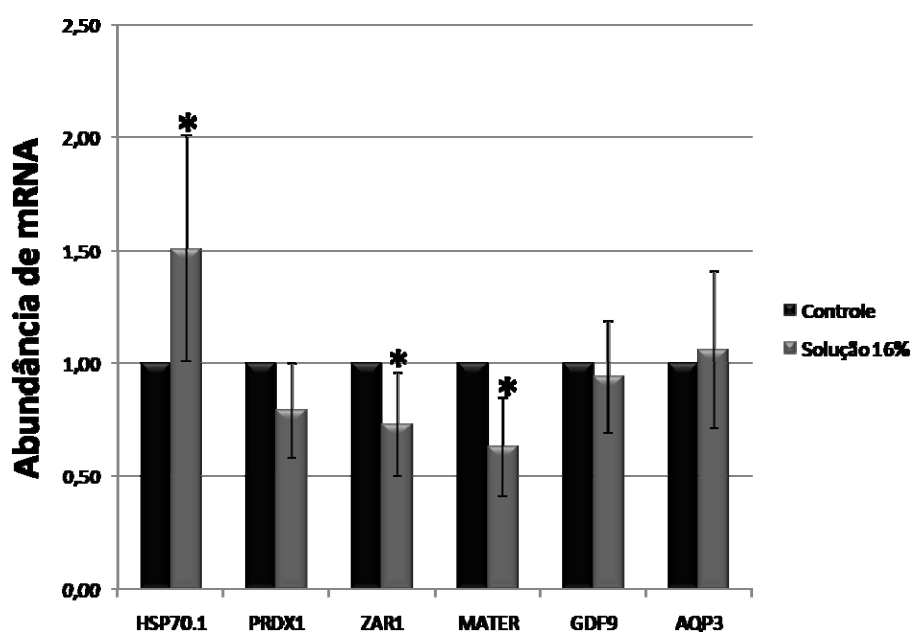


Figura 1. Abundância Relativa dos transcritos HSP70.1, PRDX1, ZAR1, MATER, GDF9 e AQP3 em ovócitos imaturos expostos a solução de equilíbrio de 16% comparado com ovócitos imaturos não-vitrificados (expressão relativa=1.00) (* $p < 0,05$).

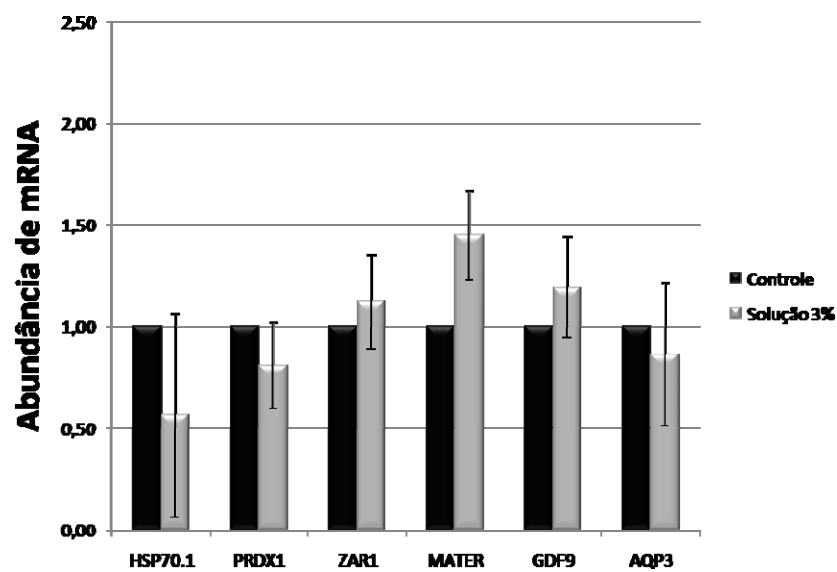


Figura 2. Abundância Relativa dos transcritos HSP70.1, PRDX1, ZAR1, MATER, GDF9 e AQP3 em ovócitos imaturos expostos a solução de equilíbrio de 3% comparado com ovócitos imaturos não-vitrificados (expressão relativa=1.00).

3. CONCLUSÕES GERAIS

1. A exposição a várias concentrações de EG (3, 8, 16, 20%) na solução de equilíbrio não afetam a taxa de maturação nuclear.
2. A exposição a vários tempos de equilíbrio associados a diferentes concentrações de EG não afetam a maturação nuclear ovocitária.
3. A associação de DMSO + EG na solução de vitrificação influenciou negativamente na maturação nuclear ovocitária após a reidratação.
4. Concentrações elevadas de EG (32 e 40%) não favorecem ao desenvolvimento ovocitário após a reidratação.
5. Soluções de equilíbrio com 3, 8, 16 e 20% de EG afetam negativamente na taxa de maturação nuclear após a vitrificação com 40% de EG + 1,0 mol.L⁻¹ de sacarose.
6. Soluções de equilíbrio (3 e 16% de EG) e vitrificação influenciam negativamente na maturação nuclear e citoplasmática, e também na ultraestrutura de ovócitos imaturos de bovinos após a maturação “in vitro”.
7. A solução de equilíbrio com 3% de EG não influencia na quantidade de transcritos armazenados no citoplasma de ovócitos bovinos imaturos.
8. A solução de equilíbrio com 16% de EG aumenta a expressão de HSP70.1 e diminui a dos genes MATER e ZAR1. Entretanto, influenciou negativamente na taxa de maturação nuclear e citoplasmática, além da ultraestrutura do ovócito após vitrificação.