

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

VIABILIDADE E FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS
BOVINOS APÓS VITRIFICAÇÃO EM SOLUÇÃO 6 M DE
DMSO

SÉRGIO GALBINSKI

ORIENTADOR: PROF. Dr. ARNALDO NICOLA FERRARI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2001

SÉRGIO GALBINSKI

VIABILIDADE E FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS BOVINOS APÓS VITRIFICAÇÃO EM SOLUÇÃO 6 M DE DMSO

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

Orientador:

Prof. Dr. Arnaldo Nicola Ferrari

Co-Orientadora:

Dra. Adriana Bos-Mikich

Porto Alegre
Agosto, 2001

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Arnaldo Nicola Ferrari**, Professor Titular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Diretor da Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade, pela amizade, confiança, orientação e incentivo durante todos os momentos da realização deste trabalho.

À Doutora **Adriana Bos-Mikich**, Bióloga da Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade, pela amizade, ensinamentos, orientação e incentivo durante todos os momentos da realização deste trabalho. E, acima de tudo, por ter sido exemplo de profissional e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. **Alceu Mezzalira**, médico veterinário, Professor da Universidade Estadual de Santa Catarina, em Lages, SC, pelo incansável apoio técnico e pessoal na técnica de laboratório utilizada durante a realização deste trabalho. A completa dedicação e amizade dele recebidas, servirão de exemplo para meu desenvolvimento pessoal e profissional

À Doutora **Mara Iollanda Batistella Rubin**, médica veterinária, Professora da Universidade Federal de Santa Maria, pelo hábil apoio científico e por ter viabilizado a realização deste trabalho no Laboratório de Reprodução de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria.

Aos Professores Doutores **Jorge Pinto Ribeiro** e **Ellis D'Arrigo Busnello**, pela oportunidade de poder estudar no Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos **Diretores, Médicos e Funcionários da Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade**, que muito cooperaram na realização deste trabalho.

À **CAPES** pela bolsa de estudos concedida durante o período de realização do curso.

DEDICATÓRIAS

Ao meu querido filho, **Fabício Gus Galbinski**, exemplo de vida.

À minha amada esposa e maior estimuladora dos meus estudos,
Patrícia Ioschpe Gus.

Ao meu sogros e incentivadores,
Mauro Gus e Ida Ioschpe Gus.

Aos meus pais, familiares e amigos.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Oogênese.....	14
2.1.1 Origem das células germinativas.....	14
2.1.2 Crescimento do oócito e foliculogênese.....	16
2.1.3 Maturação meiótica.....	18
2.1.4 Revestimentos.....	24
2.1.4.1 <i>Zona pellucida</i>	24
2.1.4.2 Células do <i>cumulus oophorus</i>	24
2.1.5 Maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	25
2.1.5.1 Seleção dos folículos e dos oócitos.....	25
2.1.5.2 Meios e condições de cultivo.....	27
2.2 Fertilização.....	28
2.2.1 Da ativação do oócito à primeira clivagem embrionária.....	29
2.2.2 Fertilização <i>in vitro</i>	31
2.2.3 Capacitação espermática.....	32
2.2.4 Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	32
2.3 Criopreservação.....	34
2.3.1 Introdução.....	34
2.3.2 Criopreservação de oócitos.....	36
2.3.3 Problemas associados à criopreservação de oócitos.....	37
2.3.4 Conceitos criobiológicos associados à criopreservação de oócitos.....	40
2.3.4.1 Adição de crioprotetores.....	41
2.3.4.2 Velocidade de resfriamento.....	41
2.3.4.3 Enucleação ou " <i>seeding</i> ".....	42
2.3.4.4 Descongelamento.....	43
2.3.4.5 Diluição do crioprotetor.....	44
2.3.5 Armazenamento.....	45
2.3.6 Técnicas de criopreservação.....	45
2.3.6.1 Congelamento lento/descongelamento lento.....	45
2.3.6.2 Congelamento lento/descongelamento rápido.....	46
2.3.6.3 Vitrificação.....	46

2.3.6.4 Congelamento ultra-rápido.....	48
3. OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
5. ARTIGO EM INGLÊS	71
6. ARTIGO EM PORTUGUÊS	91

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Resultados da fertilização <i>in vitro</i> e desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos frescos.....	111
Tabela 2 Resultados de viabilidade e fertilização <i>in vitro</i> após vitrificação de oócitos bovinos utilizando diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação	112
Tabela 3 Resultados de viabilidade e fertilização <i>in vitro</i> de oócitos bovinos após exposição às soluções de vitrificação, mas sem vitrificação.....	113

1. INTRODUÇÃO

A rápida expansão e disseminação das técnicas de reprodução assistida para o tratamento de infertilidade humana, nos últimos 20 anos, tem propiciado uma participação e crescimento paralelos da criobiologia como tecnologia acessória.

O desenvolvimento de métodos que permitem o armazenamento de sêmen, oócitos e embriões por longo períodos de tempo e sua utilização para fins reprodutivos tem importantes aplicações não só em programas de reprodução humana, mas também na pecuária e na conservação de espécies animais ameaçadas de extinção. A criopreservação de embriões humanos tem representado uma peça acessória fundamental em programas de reprodução assistida, permitindo a transferência de um pequeno número de embriões a cada ciclo e o armazenamento dos remanescentes para transferência posterior, ajudando a evitar a ocorrência de gestações múltiplas e a aliviar possíveis complicações decorrentes da hiperestimulação ovariana, enquanto mantendo taxas de gestação aceitáveis.

Embora o congelamento de embriões humanos tenha taxas de sucesso, em termos de gestação pós-descongelamento, razoáveis, associados a ela existem sérios problemas éticos e legais que tornam a tecnologia menos atraente a diversos centros de reprodução assistida. Um dos mais graves dilemas encontrados pelos centros que oferecem a criopreservação de embriões supranumerários de ciclos de tratamentos de infertilidade é o destino deles, visto que embriões são estruturas celulares que têm potencial de gerar um novo ser, e não podem ser tratados de maneira semelhante a outros sistemas celulares somáticos quando criopreservados e armazenados. Em países como a Austrália, a lei é mais poderosa até mesmo que os desejos dos pacientes e proíbe totalmente a eliminação dos embriões criopreservados, mesmo que este seja o desejo de

seus progenitores biológicos. Esta situação cria um quadro claramente insustentável de armazenamento indefinido de centenas, ou até milhares de embriões supranumerários.

Uma maneira racional de contornar o problema do armazenamento de embriões seria através do armazenamento do gameta feminino, o oócito. O congelamento e armazenamento de oócitos humanos teria várias aplicações clínicas imediatas, além de eliminar problemas associados ao armazenamento de embriões, como, por exemplo, garantir a fertilidade de mulheres e jovens portadoras de alguma forma de câncer pré-tratamento oncológico e a criação de bancos do gameta feminino para doação anônima e segura quanto ao aspecto sanitário.

Os primeiros estudos envolvendo a criopreservação do gameta feminino iniciaram-se a quase duas décadas, sem ter havido, entretanto, grandes avanços em termos de aplicação clínica de alguma das tantas metodologias investigadas. Alguns relatos de nascimentos após fertilização *in vitro* de oócitos pós-congelamento¹ deram ímpeto à continuidade das investigações nesta área. A técnica de congelamento lento, utilizando dimetilssulfóxido (DMSO) como crioprotetor, utilizada por Chen e colegas¹ no primeiro congelamento de oócitos humanos bem sucedido, baseia-se, pelo menos em parte, naquelas utilizadas para o congelamento de embriões murinos². Outros autores não puderam, entretanto, repetir o sucesso deste primeiro relato e, ao longo do tempo, buscou-se o desenvolvimento e o aprimoramento das técnicas de crioconservação do gameta feminino, não só humano, mas de outras espécies mamíferas, de forma a diminuir-se os danos causados aos componentes celulares que prejudicam a sobrevivência e a viabilidade gamética pós-descongelamento. Em animais experimentais, danos à *zona pellucida* foram contornados a partir do uso de soro fetal bovino como macromolécula na solução de congelamento, e distúrbios ao citoesqueleto dos cromossomos foram eliminados a partir da constatação das condições ideais de manipulação dos gametas a temperaturas elevadas (não sub-zero). De uma maneira

geral, pode-se dizer que a principal diferença entre as dificuldades de criopreservação de oócitos e a relativa facilidade em criopreservar embriões, reside no fato de que o gameta deve manter sua capacidade de ser fertilizado, ativado e dar início ao processo de desenvolvimento embrionário, além de ser ele o responsável pelos primeiros estágios deste desenvolvimento. Estas diferentes funções exigidas dos oócitos, para que ocorra fertilização e desenvolvimento embrionário, dependem da integridade de suas membranas e de seu citoesqueleto, assim como de sua fisiologia e metabolismo intactos.

A vitrificação é uma alternativa bastante atraente de criopreservação, visto que ela evita os efeitos potencialmente deletérios causados pela formação de gelo intracelular. O primeiro relato sobre vitrificação de oócitos humanos descreve um sucesso limitado desta metodologia para o gameta feminino humano. Entretanto, raras outras tentativas foram feitas, em função do risco de alterações cromossômicas causadas por distúrbios ao citoesqueleto. Tais preocupações foram, em parte, elucidadas com o relato de que, seguindo-se condições ideais de exposição e concentração das soluções, os índices de anomalias cromossômicas em zigotos murinos fecundados ou ativados partenogeneticamente a partir de oócitos previamente vitrificados em DMSO 6M, não são diferentes do que aqueles dos controles não expostos ao crioprotetor e/ou a baixas temperaturas³.

A criopreservação de oócitos maturados é potencialmente um importante recurso na medicina humana, na indústria pecuária e na preservação do genoma de espécies ameaçadas de extinção. A técnica de criopreservação de oócitos por vitrificação é uma alternativa rápida e econômica, que tem sua viabilidade bem estabelecida em camundongos, conforme exposto anteriormente. A criopreservação de oócitos bovinos, além de modelo experimental de mamífero de grande porte com semelhanças criobiológicas com os humanos, tem utilidade na pecuária para o melhoramento genético de raças e no aumento da produtividade de rebanhos. A técnica de vitrificação de oócitos

bovinos utilizando solução 6M de DMSO ainda não tem relatos descritos na literatura, representando uma relevante investigação científica de cunho inédito (Medline[®], 1980 até fevereiro de 2001).

Este trabalho foi idealizado visando objetivamente avaliar a viabilidade da aplicação da técnica de vitrificação em DMSO 6M a oócitos bovinos como um modelo experimental que mais se aproxima ao sistema humano por suas características fisiológicas e morfológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OOGÊNESE

2.1.1 Origem das células germinativas

Oogênese é definida como o processo celular, molecular e fisiológico envolvendo a formação, o crescimento e a maturação do oócito que tem início na vida fetal, oócito que, anos depois, será capaz de ser fertilizado e de ter um desenvolvimento embrionário normal. Na maioria dos mamíferos, a oogênese começa com a formação das células germinativas primordiais, cuja origem é extragonadal, do endoderma primitivo, sendo oriundas da porção caudal do cordão primitivo e do saco vitelino adjacente⁴. Em cobaias, elas podem ser primeiramente identificadas por sua intensa atividade de fosfatase alcalina no mesoderma, na base da alantóide e na extremidade posterior do cordão primitivo^{5,6}, cerca de oito dias após o coito, quando migram para o endoderma e então ao longo do mesentério dorsal das cristas genitais⁷. No embrião murino de oito dias, no início da migração são reconhecidas cerca de 100 células germinativas primordiais, chegando ao número máximo de 20.000 a 25.000 no ovário diferenciado entre 13 e 14 dias após o coito^{8,9}.

Em bovinos, as células germinativas formam-se em embriões de 40 dias¹⁰ e migram para as cristas genitais, onde se desenvolvem as gônadas. As células germinativas primordiais transformam-se em oogônias, que se diferenciam das demais células por possuírem citoplasma claro devido a pouca quantidade de organelas e por apresentarem alta frequência de atividade mitótica¹¹. Ocorre uma média de 4 divisões mitóticas antes das oogônias entrarem em meiose¹⁰, atingindo cerca de 2.700.000 oogônias no 110º dia da gestação¹².

Com seis a oito semanas, aparecem os primeiros sinais de diferenciação ovariana em humanos, havendo então uma rápida multiplicação mitótica de células

germinativas, que alcançam um total de 6 a 7 milhões de oogônias em torno de 16 a 20 semanas¹³. A partir de então, a quantidade de células germinativas do ovário diminuirá inexoravelmente até cerca dos 50 anos de idade e, mais tarde, o estoque de oócitos terá se exaurido totalmente. O conteúdo total de células germinativas cai para 1 a 2 milhões por ocasião do nascimento, como resultado da atresia folicular. No início da puberdade, o número de células germinativas já foi reduzido a 300.000¹³.

Durante o estágio de pré-leptoteno que segue a última divisão mitótica, ocorre a replicação final do ácido desoxirribonucleico (DNA) em preparação para a meiose. Esta atividade de síntese marca a transformação da oogônia em oócito, que é denominado de oócito primário no estágio seguinte à mitose, por apresentar duplo complemento de seu material genético, o DNA¹⁴.

Pouco antes do nascimento, os oócitos encontram-se no estágio de diploteno da primeira prófase meiótica, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa, devido à aparência vesicular do núcleo, com cromossomos altamente difusos. Neste estágio ocorre o primeiro bloqueio da meiose, sendo a primeira divisão meiótica reiniciada e concluída somente pouco antes da ovulação, após a puberdade. Esta população de oócitos constitui a única fonte de gametas para a vida reprodutiva da fêmea.

Diferentemente da espermatogênese, onde a primeira e a segunda meiose ocorrem por uma sucessão de estágios que culminam com o espermatozóide haplóide, a oogênese é interrompida duas vezes. Primeiramente, no estágio de dictióteno da primeira prófase meiótica e, depois, subseqüentemente à ovulação, na segunda metáfase meiótica (metáfase II), até o gameta feminino ser ativado pelo espermatozóide fertilizante a reiniciar a meiose. O excesso de material genético é expelido na forma de um corpúsculo polar a cada divisão meiótica¹³.

A seqüência de eventos nucleares que ocorre nos estágios finais da maturação meiótica é caracterizada pela ruptura do núcleo do oócito, formação da primeira placa de metáfase, segregação dos cromossomos homólogos na anáfase e divisão citoplasmática após a telófase, que leva à formação do primeiro corpúsculo polar, com um grupo de cromossomos, e um oócito maior, com o outro conjunto de cromossomos alocados na segunda placa meiótica. Os oócitos permanecerão neste estágio até fertilização ou ativação artificial.

2.1.2 Crescimento do oócito e foliculogênese

Em torno do dia 170 da gestação bovina, uma camada simples de células epiteliais planas, originárias do celoma que cobre o ovário, circunda os pequenos oócitos primários em estágio de dictióteno, formando o conjunto de folículos primordiais¹⁵. O início do crescimento do oócito é aparentemente regulado pelo ovário, sendo o número de oócitos que entram em fase de crescimento dependente da dimensão do conjunto de oócitos primordiais¹⁶. As células epiteliais planas (células da pré-granulosa) progressivamente transformam-se em células cubóides, multiplicam-se e envolvem todo o oócito, constituindo o folículo primário – um oócito estacionado na fase de prófase da meiose, cercado por uma camada única de células da pré-granulosa, circundada por uma membrana basal.

As células da granulosa multiplicam-se por divisões mitóticas, envolvendo o oócito por múltiplas camadas, constituindo o folículo secundário. Com o incremento das células foliculares, capilares sangüíneos invadem o revestimento fibroso ao redor do folículo e formam uma camada vascular, a teca interna, a qual é rodeada por fibroblastos da teca externa. Ao atingir um diâmetro de 400 a 800 μ , em resposta a estímulos hormonais, inicia-se um acúmulo de fluido entre as células da granulosa, formando o antro folicular observado no folículo terciário¹⁷. A composição do líquido folicular é similar

à do soro sanguíneo, sendo derivado diretamente dos capilares e de secreções das células da granulosa¹¹.

O crescimento do oócito é um processo contínuo que culmina com a ovulação ou com a atresia do oócito e seu folículo. Apenas oócitos completamente crescidos reassumem a meiose e são ovulados em cada ciclo menstrual. Durante o desenvolvimento folicular, a proliferação das células da granulosa e o crescimento do oócito ocorrem simultaneamente. Ao final da fase de crescimento, com a expansão do antro, o oócito é parcialmente separado das células da granulosa, que se diferenciam em duas subpopulações distintas: células da granulosa que envolvem o oócito formam o *cumulus oophorus* e a parte mais interna do *cumulus* adota uma forma colunar e constitui a *corona radiata*. As células do *cumulus oophorus* e da *corona radiata* e o oócito intercomunicam-se por uniões celulares denominadas junções intercomunicantes¹⁸.

Durante a fase de crescimento do oócito surgem algumas estruturas pela primeira vez, como os grânulos corticais e *zona pellucida*, enquanto outras, como nucléolo, mitocôndria e complexo de Golgi, passam por transformações ultraestruturais, que sugerem que o oócito em crescimento esteja ativamente sintetizando produtos para uso intracelular ou secretáveis¹⁹. Oócitos em todos estágios de desenvolvimento sintetizam e acumulam proteínas²⁰ e todas as classes do ácido ribonucleico (RNA) (ribossomal, transportador e mensageiro), os quais têm um papel fundamental nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, pelo menos até o estágio de duas células, quando a primeira atividade de transcrição de genoma embrionário pode ser detectada em ratos^{21,22}.

Uma vez que o oócito esteja completamente crescido, seu tamanho permanece constante. As células foliculares sofrem rápidas divisões resultando no folículo de Graaf maduro. O desenvolvimento folicular até o estágio pré-antral não parece requerer estimulação hormonal, enquanto que, deste ponto até o folículo antral de Graaf pré-ovulatório, o crescimento é controlado por gonadotrofinas²³.

Os oócitos aumentam progressivamente de tamanho durante todo o período de crescimento folicular, atingindo, em bovinos, um diâmetro máximo de 150 μ ²⁴. O crescimento do oócito completa-se no bovino logo após a formação do antro, quando o folículo atinge um diâmetro de 1,7 a 2,0 mm. Em bovinos, estão presentes, em cada ovário, cerca de 100.000 folículos no momento do nascimento, sendo este o estoque total de folículos e células germinativas disponíveis para toda a vida reprodutiva das vacas²⁴.

2.1.3 Maturação meiótica

O processo de mudanças que ocorrem no oócito totalmente crescido, presente em um folículo antral, incluindo a progressão do estágio de dictióteno da primeira prófase meiótica até a metáfase II, concluindo a primeira redução meiótica e passando a ser denominado oócito secundário, é entendido como maturação nuclear (meiótica). A aquisição da capacidade de reiniciar e completar a meiose, aparentemente, ocorre em duas etapas: primeiro os oócitos em crescimento adquirem a habilidade de iniciar o processo de dissolução da membrana nuclear e continuar até o estágio de metáfase I e, posteriormente, os oócitos adquirem a capacidade de progredir até metáfase II, completando a maturação nuclear²⁵.

Os oócitos devem apresentar competência meiótica para serem capazes de completar a maturação nuclear²⁶, a qual está relacionada ao aparecimento da cavidade antral no folículo e ao tamanho do oócito. Os folículos terciários menos desenvolvidos contém oócitos incapazes de completar a meiose²⁶.

Nos bovinos, como na maioria das espécies de mamíferos, os folículos maduros antrais ou de Graaf são estimulados a se desenvolver e a entrar em maturação meiótica em cada ciclo menstrual como consequência direta da liberação dos hormônios pituitários: o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH)^{27, 28, 29}. Os efeitos combinados do FSH e do LH determinam o número de folículos que se desenvolverão a folículos de Graaf maduros, bem como à ovulação e à atresia. A fase final do crescimento folicular e da formação do folículo de Graaf maduro é estimulada pelo FSH. Ao mesmo tempo, o FSH induz a formação de receptores de LH nas células foliculares. No momento da ovulação, ocorre uma massiva descarga pituitária de LH, que leva às mudanças finais do folículo de Graaf e ao reinício da meiose^{28, 30, 31}. Isto envolve a progressão de dictióteno da primeira prófase meiótica à metáfase II. As células foliculares respondem ao pico de LH com o recolhimento dos processos citoplasmáticos que passam através *da zona pellucida* e das junções intercomunicantes³².

O reinício da meiose também pode ter como consequência a atresia, quando a saúde do folículo e o controle meiótico tornam-se comprometidos²⁵. Em mamíferos, a maturação meiótica ocorre espontaneamente ao removerem-se os oócitos dos folículos colocando-os em condições adequadas de cultura *in vitro*, o que facilita o estudo da progressão^{33, 27, 34}.

O oócito, antes do reinício da meiose, possui um núcleo grande que ocupa um terço do citoplasma, contendo uma cromatina em forma de filamentos finos, um nucléolo grande e uma membrana nuclear claramente visível. Tal configuração nuclear é chamada de vesícula germinativa. No reinício da meiose, o oócito passa do estágio de dictióteno ao de diacinese. Em bovinos, o rompimento da vesícula germinativa ocorre *in vivo*, 4 a 8 horas após a onda ovulatória do hormônio luteinizante²⁸ e, *in vitro*, entre 6 a 9 horas após o início do cultivo do oócito em meios adequados²⁸. Este processo ocorre em nível nuclear, envolvendo a condensação da cromatina e a dissolução da membrana nuclear.

Começam, então, a ser visualizados os cromossomos bivalentes, dispostos em forma circular. Na metáfase I, os cromossomos estão ordenados no mesmo plano, chamado de plano equatorial. Em anáfase I, ocorre a separação dos cromossomos homólogos, com a formação de dois agrupamentos de cromossomos em forma triangular. No início da telófase I, inicia-se a divisão assimétrica do citoplasma, a qual se completa na metáfase II, com a separação total de uma porção do citoplasma, constituindo o primeiro corpúsculo polar. O oócito passa a ser chamado de oócito secundário, ficando com metade do número de cromossomos e contendo duplo complemento de DNA. Em bovinos, a primeira divisão meiótica *in vitro* completa-se em 18 a 24 horas^{15, 28}. A metáfase II representa o segundo período de repouso da divisão meiótica, que é reiniciada quando o oócito é fecundado ou ativado partenogeneticamente⁴.

Para que a maturação meiótica ocorra normalmente, é necessária uma série de eventos citoplasmáticos. A fecundação e o desenvolvimento embrionário podem ser prejudicados ou até impedidos pela assincronia entre maturação nuclear e citoplasmática²⁸. Durante o crescimento dos oócitos ocorrem mudanças em número, tamanho e posição das organelas citoplasmáticas. As mitocôndrias aumentam em número e transformam-se de alongadas para ovais nos oócitos maduros. O complexo de Golgi aumenta progressivamente sua atividade, o que é evidenciado por um aumento do número de membranas de Golgi envolvidas na secreção de glicoproteínas para a formação da *zona pellucida* e dos componentes dos grânulos corticais⁴. Nos oócitos bovinos imaturos as organelas estão na periferia do citoplasma, migrando para o centro no início da maturação, indicando uma modulação espacial do metabolismo²⁸.

Durante a maturação meiótica ocorrem mudanças significativas no citoplasma. O processo é influenciado por modificações nos níveis de proteínas, como por outros fatores promotores da maturação presentes no citoplasma^{35, 29}.

A maturação meiótica também requer síntese de RNA. A inibição da síntese de RNA reduz significativamente a porcentagem de complexos *cumulus*-oócito (CCO) bovinos que reiniciam a meiose, mas não afeta os oócitos sem células do *cumulus*, demonstrando que um evento de transcrição é necessário para o início da maturação nuclear^{26,29}. Concomitantemente, ocorre uma compactação nos nucléolos totalmente crescidos, o que indica que armazenaram RNA durante a fase final de crescimento do oócito, controlando a síntese de algumas proteínas necessárias para a maturação nuclear.

As primeiras tentativas de fertilização *in vitro* de oócito mamíferos fracassaram, basicamente porque o esperma era incapaz de formar pronúcleos³⁵. A falha em formar pronúcleos foi atribuída à maturação incompleta do ooplasma *in vitro*. A adição de soro ao meio de maturação permitiu a oócitos de ratos uma maturação e fertilização *in vitro* normais e gestações a termo³⁶.

Os mecanismos que propiciam a evolução do oócito ao estágio de vesícula germinativa e, subseqüentemente, o liberam do repouso, são em grande parte ainda desconhecidos. Muitos fatores parecem influenciar a regulação da meiose: interação entre células foliculares e oócito, gonadotrofinas, adenosina mono fosfato (AMP)- cíclico, purinas, cálcio, colmodulina e fatores de crescimento^{37, 38}.

O decréscimo nas junções intercomunicantes entre células do *cumulus oophorus* e oócito pode ser responsável pela reativação da meiose. Entretanto, existem evidências que demonstram que a ruptura da vesícula germinativa ocorreria antes da detecção da redução em junções intercomunicantes³⁹, sugerindo que o bloqueio da meiose seja controlado por um mecanismo diferente. Existe a hipótese de que a inibição meiótica possa ser mantida por substâncias transferidas diretamente das células da granulosa às células do *cumulus* e ao oócito pelas junções intercomunicantes, ou através da secreção

dessas substâncias pelas células da granulosa no líquido folicular e incorporação ao oócito pelas células do *cumulus*⁴⁰. Demonstrou-se ainda em várias espécies, incluindo a bovina, que, no cultivo de oócitos com grandes quantidades de células da granulosa ou com fragmentos da parede folicular, ocorre inibição da progressão da meiose⁴¹.

O AMP cíclico parece ter um papel fundamental na manutenção do bloqueio da meiose, uma vez que a maturação espontânea de CCO isolados é inibida pela presença de análogos permeáveis do AMP cíclico ou de agentes promotores do aumento do nível intracelular do AMP cíclico^{4, 42}. No entanto, as substâncias que provocam um aumento intracelular de AMP cíclico não afetam a meiose de oócitos cultivados logo após o rompimento da vesícula germinativa⁴³. Foi demonstrado tanto *in vivo*, como *in vitro*, que, previamente ao rompimento da vesícula germinativa, ocorre uma diminuição nos níveis de AMP cíclico⁴³. A adição de uma substância antagonista do AMP cíclico reverteu o efeito inibitório no reinício da meiose em oócitos de camundongos⁴⁴. Vários estudos demonstram que o oócito bovino também é capaz de sintetizar AMP-cíclico²⁵.

O complexo cálcio-calmodulina participa da maturação nuclear em oócitos de camundongos. A calmodulina é uma proteína presente nos oócitos de camundongos ativada pelo Ca^{2+} intracelular⁴³. Ocorre uma inibição do rompimento da vesícula germinativa quando se adiciona quelante de cálcio intracitoplasmático, enquanto a ausência de cálcio no meio não influencia o reinício da meiose, sugerindo que a mobilização do cálcio dos depósitos intracelulares é o pré-requisito para que este processo se realize³¹. Além disto, dado o papel central do sinal de cálcio durante a fertilização para retomada meiótica e início do desenvolvimento embrionário subsequente, é essencial que o oócito desenvolva a capacidade de responder ao espermatozóide fertilizador durante a maturação⁴⁵. Recentemente, ficou demonstrado em murinos que a capacidade de gerar

as ondas de cálcio em resposta ao espermatozóide aumenta gradativamente desde os estágios finais de desenvolvimento do oócito e durante a fase de maturação, sendo esta transformação responsável também pela capacidade de desenvolvimento embrionário posterior⁴⁶.

Como referido anteriormente, o reinício da meiose *in vivo*, ocorre em consequência ao pico pré-ovulatório de LH. O rompimento da vesícula germinativa *in vitro*, ocorre na presença de LH em oócitos⁴ ou em CCO crescidos *in vitro* e previamente estimulados por FSH⁴⁴. Os receptores de FSH encontram-se nas células da granulosa desde estágios iniciais do desenvolvimento folicular, mas não estão presentes no oócito. Em bovinos observou-se que a adição de FSH ao meio de cultivo retarda o reinício da meiose em 3 horas⁴⁷. Por outro lado, em camundongos, observou-se que o FSH inibe o reinício da meiose em CCO, mas não em oócitos sem as células do cumulus⁴⁸.

A concentração de hormônios esteróides no líquido folicular aumenta significativamente após o pico de LH, diminuindo com a redução de LH. O rompimento da vesícula germinativa não é influenciado pela inibição *in vitro* da síntese de esteróides, mas a progressão da meiose é bloqueada em metáfase I⁴⁹. A suplementação do meio de cultivo com hormônios esteróides não afeta o reinício da meiose em CCO⁵⁰. Assim, a ação do LH no início da meiose não seria induzida pela síntese de hormônios esteróides, que seriam necessários para a progressão da meiose de metáfase I à metáfase II.

Os fatores de crescimento podem estar relacionados com a regulação da maturação meiótica. Os fatores de crescimento, *Epidermal Growth Factor* (EGF) e os *Insulin-like Growth Factor I e II* (IGF-I e II) relacionam-se com a maturação nuclear. O EGF possui receptores e atividade mitogênica nas células da granulosa em diversas espécies, incluindo a bovina⁵⁰. Estudos realizados em camundongos demonstraram que o EGF estimula o rompimento da vesícula germinativa e induz a expansão do *cumulus*⁵¹. Foi observado, em bovinos, que o EGF estimula a maturação meiótica apenas em CCO e

não em oócitos sem células do *cumulus*⁵². Os IGFs têm sido relacionados com o estímulo da maturação meiótica em oócitos de diferentes espécies, incluindo a bovina^{52, 53}.

A maturação meiótica, seqüência de eventos nucleares e citoplasmáticos que resultam no oócito maduro não fertilizado, é fundamental para o desenvolvimento embrionário subsequente dos mamíferos, uma vez que, somente após atingir metáfase II, o oócito de mamíferos é competente para gerar embriões viáveis após a fertilização⁵⁴.

2.1.4 Revestimentos

2.1.4.1 Zona Pellucida

A *zona pellucida* é uma camada extracelular que cerca os óvulos dos mamíferos. Ela se forma ao redor dos oócitos, que são cercados por uma camada completa de células cuboidais da granulosa. Por muitos anos acreditou-se que o local da síntese da *zona pellucida* era as células foliculares, mas atualmente sabe-se que esta estrutura é sintetizada pelo oócito. Uma vez que a *zona pellucida* esteja completamente formada, o contato entre o oócito e a camada mais interna das células foliculares continua via junções intercomunicantes formadas entre as microvilosidades do oócito e as extensões das células foliculares que penetram na *zona pellucida*.

Os componentes protéicos da *zona pellucida* são sintetizados e secretados pelo oócito em crescimento⁵⁵, representando cerca de 5 a 10% de toda a atividade de síntese proteica do oócito³⁷. O surgimento da *zona pellucida* correlaciona-se com o início do crescimento do oócito; oócitos que não crescem não têm *zona pellucida*⁵⁶.

A *zona pellucida* é constituída por três glicoproteínas, a ZP1, a ZP2 e a ZP3, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica acoplada lateralmente a cadeias de oligossacarídeos. Estas glicoproteínas formam uma estrutura de configuração tridimensional composta por diversas unidades de ZP2 e ZP3, alternadas e intercaladas

em filamentos com a ZP1. As glicoproteínas da *zona pellucida* participam da reação acrossômica e da fertilização⁵⁷. As modificações que ocorrem na *zona pellucida* subseqüentemente à penetração espermática bloqueiam a poliespermia e parecem ser mediadas pela exocitose dos grânulos corticais⁵⁸.

2.1.4.2 Células do *cumulus oophorus*

As células da granulosa da parede do folículo e as que formam o *cumulus* são importantes para o crescimento, nutrição, divisão meiótica e fecundação do oócito, conforme exposto anteriormente.

Em resposta ao pico pré-ovulatório de LH, as células granulosas do *cumulus* expandem-se, representando uma intensa modificação morfológica causada pela produção e secreção de ácido hialurônico que dispersa estas células e as acomoda em uma matriz gelatinosa rica em ácido hialurônico, fenômeno conhecido como expansão do *cumulus* ou mucificação da células do *cumulus*^{39,51,59}. Foi demonstrado que oócitos completamente crescidos são aptos a secretar um fator de regulação da expansão do *cumulus in vitro*, o que permite às células do *cumulus* sintetizarem ácido hialurônico e a entrarem em expansão em resposta ao LH, além de estabilizar a matriz extracelular *in vitro*^{51,60}. O contato entre o oócito e as células do *cumulus* não é necessário para a expansão do *cumulus*, mas esta não ocorre em complexos oocitizados, sugerindo que a atividade de expansão seja especificamente controlada pelo oócito. Estes dois eventos, a diferenciação das células da granulosa em células funcionais do *cumulus* e a expansão do *cumulus*, são influenciados pelo oócito. Assim, uma interação coordenada entre as células do *cumulus* e o oócito durante o crescimento e maturação é um ponto importante na preparação de oócitos competentes para fertilização e subseqüente desenvolvimento embrionário^{51, 59}.

A expansão do *cumulus*, em bovinos, ocorre *in vivo* entre 9 a 12 horas após a onda de LH²⁸, e *in vitro* após 12 horas de cultivo⁶¹. Em CCO bovinos, foi demonstrado que o LH estimula a expansão do *cumulus*. Entretanto, no mesmo experimento foi detectado FSH na concentração de 1% nas preparações de LH. Na ausência de FSH, a eficácia do LH em promover expansão do *cumulus* foi menor, tendo como causa uma possível estimulação insuficiente para a formação de receptores ao LH⁶².

2.1.5 Maturação *in vitro* de oócitos bovinos

2.1.5.1 Seleção dos folículos e dos oócitos

As técnicas de maturação *in vitro* de oócitos produzem um número maior de oócitos com reduzida capacidade de desenvolvimento embrionário^{63,64}. Assim, são importantes os fatores que influenciem na maturação meiótica e expansão do *cumulus* durante o cultivo.

O processo inicia com a escolha dos folículos a serem aspirados. O tamanho e a aparência macroscópica dos folículos estão diretamente relacionados com as características dos oócitos contidos nos mesmos. Foi determinado que, em bovinos, folículos menores que 1,7 mm de diâmetro contêm oócitos incapazes de completar a meiose, enquanto folículos maiores que 8mm podem ser pré-ovulatórios e conter oócitos com *cumulus* expandido ou que já iniciaram a progressão da meiose^{63,65}. Assim, sugere-se a punção de folículos médios para obtenção de oócitos para maturação *in vitro*^{66,67}. Os folículos superficiais e visíveis contêm oócitos com maior capacidade de completar a meiose do que os profundos⁶⁸. Os folículos translúcidos contêm oócitos com menor capacidade de desenvolvimento, por estarem em estágios de atresia⁶⁹. O nível estrogênico da fêmea não tem influência da capacidade de desenvolvimento dos oócitos³⁰.

A seleção dos oócitos obtidos pela aspiração dos folículos possibilita melhores e mais constantes taxas de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário. Os melhores resultados de maturação *in vitro*, são obtidos com oócitos cobertos por 3 ou mais camadas completas e aderidas de células do *cumulus* ou com *cumulus* intacto, com citoplasma homogêneo, de coloração marrom e sem grânulos rugosos^{70,71}.

O transporte dos ovários do matadouro até o início da aspiração folicular pode ser realizado em solução fisiológica (NaCl 0,9%) ou em solução salina fosfatada (PBS), podendo permanecer em solução por até 11 horas em temperatura entre 24 e 25° C, sem alterar as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário. Se transportados em temperatura de 37°C, podem permanecer em solução por até 4 horas⁷².

2.1.5.2 Meios e condições de cultivo

Em bovinos, os oócitos reiniciam e completam a primeira divisão meiótica em diferentes meios, desde soluções salinas balanceadas até meios complexos^{27,63}, sendo os mais utilizados atualmente para maturação e fecundação *in vitro* o TCM 199 modificado e o TALP^{30,73}.

A maturação dos oócitos *in vivo* é precedida pela onda pré-ovulatória das gonadotrofinas. Alguns grupos utilizam FSH, LH e 17 β-estradiol no meio de cultivo para reproduzir *in vitro* as condições de maturação *in vivo* e melhorarem as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário^{30,62,64,74,75}.

A presença de soro fetal bovino ou soro de vaca em estro, como fontes protéicas para oócitos cultivados *in vitro*, determina melhores taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário⁶⁴. O soro de vacas em estro é superior ao soro fetal bovino nas taxas de maturação e de fecundação por conter maior concentração de LH^{75,76}. Dentre as diferentes etapas do ciclo estral da vaca, os melhores resultados foram obtidos

com soro de vaca em estro⁷⁵. A albumina sérica bovina é outro suplemento de proteínas, entretanto, a taxa de fecundação dos oócitos é menor do que com soro fetal bovino⁶².

Considerando-se a importância das células somáticas na maturação dos oócitos, vários trabalhos investigaram oócitos incubados em co-cultivo com células da granulosa sem que fosse observada alteração na taxa de maturação dos oócitos^{77.78}.

A temperatura e a atmosfera gasosa de incubação de oócitos também influenciam as taxas de maturação dos oócitos e de desenvolvimento embrionário. Temperaturas entre 37°C e 39°C são ideais para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*⁷⁹. Atualmente, utiliza-se preferencialmente temperatura de 39°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 90% de umidade para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário, tendo sido demonstrado que níveis menores de 20% de oxigênio são prejudiciais para a maturação *in vitro* e para a fecundação *in vitro*⁸⁰.

2.2 FERTILIZAÇÃO

A fertilização nos mamíferos é um processo biológico que envolve uma série de eventos mediados por diversos mecanismos moleculares. O processo inicia com a penetração do espermatozóide fertilizante através dos envoltórios do oócito e culmina com a restauração do complemento diplóide dos cromossomos no núcleo do embrião de duas células. Em mamíferos, a fertilização ocorre na região ampular do oviducto. As etapas essenciais do processo incluem:

1. Preparo do espermatozóide fertilizante: maturação espermática no epidídimo; capacitação espermática e reação acrossômica no tracto genital feminino.
2. Penetração espermática através dos revestimentos do oócito: o ácido hialurônico ao redor das células do *cumulus* e a *zona pellucida*.

3. Fusão do espermatozóide com as membranas do oócito.
4. Ativação do oócito para completar a meiose.
5. Descondensação da cabeça do espermatozóide para formação do pronúcleo masculino.
6. Síntese de DNA em ambos os pronúcleos.
7. Condensação cromossômica.
8. Ruptura da membrana nuclear e formação do primeiro sulco de clivagem.
9. Primeira clivagem e formação de dois núcleos diplóides.

O presente capítulo fará uma breve descrição daquelas etapas do processo de fertilização e, a seguir, do desenvolvimento embrionário, passíveis de serem afetadas pela criopreservação dos oócitos.

2.2.1 Da ativação do oócito à primeira clivagem embrionária

Em mamíferos, o oócito, após ovulação, é mantido na segunda metáfase meiótica, até o momento da fertilização.

Após a fusão dos gametas, inicia-se uma nova etapa no processo de fertilização, conhecida como ativação do oócito. Os principais eventos que ocorrem quando o oócito é ativado incluem um considerável aumento do íon cálcio liberado de reservatórios intracitoplasmáticos, principalmente do retículo endoplasmático, a exocitose dos grânulos corticais (reação cortical), a descondensação da cabeça do espermatozóide, a extrusão do segundo corpúsculo polar e a formação dos pronúcleos masculino e feminino.

Os grânulos corticais são pequenas estruturas similares a lisossomas, encontradas no córtex do oócito maduro. Desde sua primeira visualização por microscopia eletrônica⁸¹, os grânulos corticais têm sido associados ao bloqueio da polispermia durante a fertilização em mamíferos.

A partir de estudos com óvulos de hamster, evidenciou-se o envolvimento dos grânulos corticais na reação da zona, fenômeno que impede a ocorrência de polispermia⁸².

A fusão das membranas do óvulo e do espermatozóide desencadeia a ativação do oócito e a reação cortical, com o posterior término da meiose. O segundo corpúsculo polar é liberado no momento da fertilização, deixando o oócito com um complemento haplóide de cromossomos. A adição dos cromossomos do espermatozóide restaura o número diplóide no gameta, agora fertilizado, dito zigoto¹³.

Logo após o espermatozóide ter sido incorporado ao citoplasma do oócito, desaparece sua membrana nuclear e inicia-se a descondensação do núcleo⁸³. A natureza do fator responsável pela rápida desintegração do envelope nuclear ainda é desconhecida. Assim que a cromatina espermática é diretamente exposta ao citoplasma do oócito, começa a perder protaminas, sendo estas rapidamente substituídas por histonas⁸⁴, mesmo antes de que a descondensação da cromatina torne-se evidente.

Após a descondensação do núcleo do espermatozóide, surge um novo envelope nuclear ao redor da cromatina descondensada⁸⁵. Os eventos morfológicos que levam à formação do envelope pronuclear masculino e feminino são similares. Vesículas agregam-se ao longo da periferia da cromatina espermática dispersada ou dos cromossomos femininos dispersos e progressivamente fusionam-se para formar um envelope nuclear bilaminar⁸⁶.

Qualquer que seja o fator de desenvolvimento pronuclear, este não parece ser específico de cada espécie, uma vez que o espermatozóide humano pode desenvolver-se em pronúcleos aparentemente normais quando incorporado a óvulos de hamster⁸⁷. Após formados, os pronúcleos engajam-se ativamente em um processo de migração um em direção ao outro, no qual o citoesqueleto exerce um papel fundamental. Os microfilamentos participam da migração através da actina submembranosa que recobre

ambos pronúcleos durante sua formação⁸⁸. Centros organizadores dos microtúbulos citoplasmáticos associam-se com os pronúcleos durante o processo de migração e, pouco antes da dissolução das membranas, forma-se a placa metafásica, sobre a qual acomodam-se os cromossomos⁸⁸. Assim, está completo o processo para a primeira divisão celular e início do desenvolvimento embrionário.

Como demonstrado acima, os eventos morfológicos que ocorrem durante a fertilização estão bem estabelecidos, mas o conhecimento molecular e bioquímico deste fenômeno é ainda pouco conhecido.

2.2.2 Fertilização *in vitro*

A fertilização *in vitro* (FIV) tornou possível o estudo de eventos que ocorrem durante o processo de fertilização *in vivo* dentro do oviducto mamífero. Estes estudos avaliam a influência de diferentes fatores no resultado do processo de fertilização através da manipulação das condições ambientais para fertilização. Acima de tudo, o potencial clínico e as aplicações comerciais da técnica de FIV para tratamento da infertilidade humana e na indústria pecuária têm sido extensivamente explorados nas últimas décadas.

Atualmente, o maior uso da FIV em pecuária é na produção de um grande número de embriões, que são utilizados tanto em pesquisa quanto em produção comercial de bovinos⁶³. A capacidade do sêmen de um touro em fecundar oócitos *in vitro* pode ser utilizada na determinação da sua fertilidade *in vivo*^{89,90}. Outra aplicação da técnica é em sistemas de melhoramento genético para reduzir o intervalo entre as gerações¹⁴.

Os primeiros resultados de FIV em mamíferos foram relatados por Chang (1959)⁹¹. Neste estudo, oócitos de coelhos fertilizados *in vitro*, desenvolveram-se em cultura até o estágio de 4 células, quando foram transferidos às receptoras, resultando

em nascimentos normais. Atualmente a FIV é uma técnica utilizada mundialmente, nas mais distintas espécies, incluindo camundongo^{92,93}, rato⁹⁴, bovino^{95, 96, 97, 98, 99}, ovelha¹⁷, e humano^{100, 101}.

Os índices de sucesso da FIV em termos de nascimentos vivos são muito variáveis entre as diferentes espécies. Nos camundongos, onde existe uma metodologia bem estabelecida, as taxas de sucesso em termos de embriões de duas células está entre 88 e 95%, dos quais cerca de 60% resultam em nascimentos vivos¹⁰². Na FIV humana, as taxas de fertilização oscilam entre 50 e 85%¹⁰³, com índices de gestação de 28 a 30% por ciclo¹⁰⁴. O incremento nas taxas de nativivos em humanos e em animais domésticos com a FIV depende de pesquisa em torno das necessidades específicas dos gametas e embriões de cada espécie às condições *in vitro*.

A FIV tem seu sucesso diretamente vinculado a uma adequada maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos, às condições de cultura e à presença de espermatozóides viáveis, previamente capacitados.

2.2.3 Capacitação espermática

Os métodos de capacitação espermática em bovinos incluem o uso da heparina adicionada aos meios Sperm-talp e Fert-talp^{73,99,105}. A heparina une-se a proteínas da superfície do espermatozóide e as remove, promovendo modificação no pH e no cálcio intracelulares. As modificações iônicas intracelulares desencadeiam uma série de eventos, inclusive modificações da membrana espermática, habilitando o espermatozóide à reação acrossômica ao se unir com a *zona pellucida*.

Após completarem a capacitação, os espermatozóides tornam-se capazes de sofrer a reação acrossômica, fundamental para a penetração da *zona pellucida* e fusão

das membranas plasmáticas, processo este que resulta na fertilização do oócito, primeira divisão mitótica e desenvolvimento embrionário.

2.2.4 Desenvolvimento embrionário *in vitro*

A atividade genômica embrionária no ser humano parece começar após dois turnos de divisões celulares (estágios de 4 e 8 células). Antes disto, sinais embrionários precoces podem derivar de uma reserva de RNAm materno, chamado de “legado materno”¹⁰⁵. Muitos embriões cessam seu desenvolvimento neste estágio de clivagem pré-blastocisto, nem sempre devido a anomalias no embrião, e sim a falhas no momento de ativar o genoma embrionário. Acredita-se que o estabelecimento de condições mais apropriadas de FIV e cultivo embrionário *in vitro* possam, em grande parte, superar os baixos índices de desenvolvimento em cultura. Embriões bovinos apresentam um bloqueio no seu desenvolvimento *in vitro* no estágio de 8 a 16 células. Este bloqueio também coincide, *in vivo*, com a transição do controle genético materno ao embrionário¹⁰⁶. Entretanto, zigotos bovinos fecundados *in vitro* e transferidos a ovidutos de coelhas¹⁰⁷ ou de ovelhas¹⁰⁸ superam o bloqueio, atingindo o estágio de blastocisto. Este fato demonstra a importante contribuição do ambiente do oviduto ao desenvolvimento embrionário *in vivo* e que ela não é espécie-específica¹⁰⁹. As desvantagens do uso de animais vivos como hospedeiros intermediários, tais como perda de embriões, custo e manutenção dos animais, levaram ao desenvolvimento de métodos alternativos de cultivo para superar o bloqueio *in vitro*. Estes métodos incluem a co-cultura dos zigotos com células epiteliais do oviduto¹¹⁰, que secretam as proteínas importantes para a nutrição e para o desenvolvimento do embrião^{111, 112}.

Também, a adição de soro de vaca em estro aos meios de co-cultivo, melhorou as taxas de desenvolvimento, sendo este mais eficiente que o soro fetal bovino¹⁰⁷, provavelmente por estimular a produção de proteínas embriotróficas.

Para evitar a variabilidade biológica das co-culturas e dos soros, foram desenvolvidos os chamados meios quimicamente definidos. Estes permitem estudos mais precisos dos fatores envolvidos no desenvolvimento embrionário e excluem a possível contaminação dos materiais biológicos por agentes infecciosos. Estes meios utilizam como fonte protéica a albumina sérica bovina (ASB) ou a polivinilpirrolidona (PVP) e, como fonte energética, os aminoácidos essenciais e não essenciais¹¹³. A adição de glicose a estes meios é prejudicial para o desenvolvimento embrionário inicial, porém, deve ser adicionada após 120 horas de cultivo para incrementar a taxa de blastocistos¹¹⁴.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO

2.3.1 Introdução

Polge e colegas (1949)¹¹⁵ foram os primeiros a relatar sucesso na criopreservação de células de mamíferos, ao demonstrarem que o glicerol pode ser utilizado para proteger espermatozóides de aves dos danos causados pelo congelamento. Desde então, uma ampla variedade de células de importância biológica, médica e agropecuária têm sido criopreservadas em nitrogênio líquido a -196°C . Teoricamente, não existe limite de tempo para armazenamento de células a -196°C , sendo o acúmulo de danos causados pela radiação ionizante o único prejuízo potencial para a célula^{116, 117}.

A capacidade de congelar e manter embriões e oócitos em um estado viável a temperaturas abaixo de zero é um importante complemento às metodologias de reprodução assistida em várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Em 1972, avanços na compreensão dos fundamentos da criobiologia permitiram o primeiro congelamento e descongelamento de embriões murinos^{118, 119}. Desde então, embriões de

várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos, têm sido congelados com sucesso por procedimentos semelhantes aos descritos originalmente.

O armazenamento de embriões humanos a baixas temperaturas é utilizado em várias clínicas de reprodução assistida mundialmente, mas existe uma série de problemas éticos, morais e legais surgidos pelo acúmulo de embriões estocados que não serão utilizados terapêuticamente. Entre as situações problemáticas, inclui-se a propriedade de embriões em caso de divórcio, o limite de tempo legal para estocagem, a morte da paciente, e o desejo de não mais gestar.

O caminho alternativo seria o armazenamento de oócitos não-fertilizados, os quais poderiam vir a ser utilizados para gerar embriões, quando desejados. O estabelecimento de uma metodologia viável para a criopreservação do gameta feminino proporcionaria a criação de bancos de oócitos com diferentes indicações clínicas, dentre as quais:

1. Para a doação de oócitos após passado um período de quarentena, de forma a eliminar-se o risco da transmissão de doenças, para mulheres desprovidas de ovários ou quando estes são desprovidos de oócitos, como em menopausa precoce ou após tratamento oncológico e ainda para portadoras de doenças genéticas;

2. Para restabelecimento da fertilidade em mulheres expostas a tratamento quimioterápico ou radioterápico ou pós-menopausa;

3. Antes de ooforectomia;

4. Para evitar a produção de embriões excedentes em programas de reprodução assistida;

5. Para armazenamento dos oócitos excedentes em procedimentos de FIV ou de transferência intratubária de gametas (GIFT).

Embora tenham sido relatados índices de sobrevivência pós-descongelamento entre 20 e 80%, as taxas de gestação alcançadas com ócitos humanos previamente criopreservados ainda são muito baixas^{1, 120, 121, 122}.

Um dos principais problemas com o emprego clínico da criopreservação de oócitos é a ausência de protocolos de congelamento que possam ser traduzidos em uma técnica clinicamente viável e reproduzível em qualquer instituição.

Existem algumas dificuldades para o desenvolvimento de métodos viáveis para o armazenamento de oócitos humanos: em primeiro lugar, a escassez de oócitos excedentes em tratamentos de reprodução assistida que possam ser alocados à pesquisa; em segundo lugar, para testar a capacidade de fertilização dos oócitos congelados após o descongelamento seria necessária a autorização da Comissão Nacional de Pesquisa (Resolução 196/1996)¹²³. A alternativa é o desenvolvimento de procedimentos em outras espécies de mamíferos. A criopreservação de oócitos de hamster¹²⁴, por exemplo, tem sido utilizada na avaliação clínica da fertilidade masculina^{87, 125}.

2.3.2 Criopreservação de oócitos

Oócitos da maioria dos mamíferos, exceto alguns casos, como os eqüinos, caninos e porcinos, não contêm uma grande proporção de material lipídico¹²⁶. Isto, juntamente com as diferenças de dimensões e permeabilidade dos oócitos, gera requisitos específicos para congelamento e descongelamento dos oócitos das diferentes espécies.

As primeiras pesquisas em criopreservação de oócitos de mamíferos datam de cerca de 50 anos. Estes estudos relatam a sobrevivência de oócitos de ratos após o resfriamento até -10° C, utilizando-se glicerol como crioprotetor^{127, 128}. Não houve, entretanto, qualquer sobrevivência a temperaturas abaixo de -20° C. Resultados mais

significativos foram obtidos com o congelamento de pequenos fragmentos de ovários, os quais foram implantados subcutaneamente em fêmeas receptoras pós-descongelamento¹²⁹. Apesar de todos oócitos contidos em folículos de Graaf degenerarem, os folículos primordiais sobreviveram ao processo de criopreservação. Logo a seguir, foram obtidas ovulações e nativos a partir de tecido ovariano congelado e descongelado, o qual foi implantado sob a cápsula ovariana de ratas receptoras¹³⁰.

A viabilidade da preservação de oócitos maduros foi definitivamente demonstrada quando Whittingham (1977)², utilizando DMSO como crioprotetor, congelamento lento até -80°C ($-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e descongelamento lento ($8-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$), obteve taxas relativamente elevadas de sobrevivência (65-75%), fertilização *in vitro* (48-61%) e nativos (15-38%) após transferência de embriões gerados de oócitos congelados. Índices mais elevados (84%) de fertilização foram obtidos a partir do reconhecimento da importância da presença de macromoléculas no meio de congelamento e descongelamento¹⁰².

A criopreservação de oócitos tem sido possível em algumas espécies de mamíferos, entretanto, com nativos, foi possível apenas em: camundongos², coelhos¹³¹,¹³², bovinos¹³³ e humanos^{1, 120, 134, 135}.

2.3.3 Problemas associados à criopreservação de oócitos

Os fatores primariamente responsáveis pelo comprometimento celular durante o congelamento são a formação de gelo intracelular e o dano osmótico. A toxicidade do crioprotetor e o dano osmótico são influenciados pela concentração, pelo tempo e pela temperatura de exposição ao crioprotetor¹³⁶. Os agentes crioprotetores, que reduzem a concentração hidroeletrólítica na porção não congelada do líquido intracelular, protegem as células durante o resfriamento das altas concentrações de solutos. A placa metafásica, os grânulos corticais, o citoesqueleto, a membrana plasmática e a *zona pellucida* são

estruturas características dos oócitos maduros suscetíveis a danos durante o processo de congelamento e exposição aos agentes crioprotetores.

O citoesqueleto do oócito exerce um papel fundamental quando do eventual estabelecimento da constituição cromossômica normal do zigoto. Defeitos no sistema de actina do oócito são freqüentemente associados à expulsão anormal do segundo corpúsculo polar, levando à triploidia, enquanto defeitos no sistema de microtúbulos podem estar associados à perda ou ao ganho de um ou mais cromossomos, levando à aneuploidia^{137,138}. Em adição, os microfilamentos estão envolvidos na determinação da morfologia celular e assim exercem uma função vital na regulação da organização citoplasmática e na formatação celular¹³⁹.

Estudos da organização do citoesqueleto em oócitos de espécies mamíferas têm demonstrado diferenças que estariam relacionadas aos diferentes resultados nos procedimentos de criopreservação.

Microtúbulos são estruturas termosensíveis. O simples processo de resfriamento dos oócitos murinos e ovinos a 4° C, resulta em despolimerização do sistema^{140, 141}. Apesar de ocorrer a repolimerização e o reagrupamento dos microtúbulos após reaquecimento dos gametas, o potencial para anomalias cromossômicas devido a erros de segregação, durante a retomada da meiose, constitui a maior preocupação relacionada às técnicas de criopreservação de oócitos. Estudos citogenéticos da primeira divisão meiótica em embriões murinos obtidos após a fertilização de oócitos congelados e descongelados relataram resultados contraditórios. Enquanto alguns autores demonstraram que a freqüência de aneuploidia não se alterava em embriões obtidos de oócitos congelados e descongelados^{142,143}, outros relatavam um aumento significativo no nível de aneuploidia, sem haver qualquer aumento nos índices de poliploidia¹⁴⁴. Criou-se também a hipótese que a freqüência aumentada de poliploidia encontrada em embriões obtidos de oócitos congelados e descongelados devia-se à retenção do segundo

corpúsculo polar¹⁴⁵. Entretanto, estes estudos utilizaram fertilização *in vitro* para a análise do complemento cromossômico de embriões após primeira clivagem. Esta metodologia não permite diferenciar a origem materna ou paterna das anomalias cromossômicas detectadas. Tal dúvida foi definitivamente esclarecida a partir de análises citogenéticas da primeira divisão mitótica em embriões murinos obtidos a partir da ativação partenogênica de oócitos pós-criopreservação^{3,146}. Estes relatos demonstraram que nem o congelamento lento, nem a vitrificação levam a aumentos significativos nos índices de anomalias cromossômicas em embriões murinos obtidos a partir de oócitos previamente criopreservados.

Experimentos envolvendo diferentes períodos de exposição ao DMSO Omostraram que a desorganização do sistema de microtúbulos, provocada pela exposição ao crioprotetor, é um processo reversível em oócitos de murinos¹⁴⁷, de humanos¹⁴⁸ e coelhos¹³². Também foi descrita uma ruptura da malha cortical de actina após a exposição de oócitos de camundongos ao DMSO à temperatura de 37° C¹³⁹. Entretanto, estes efeitos ficavam muito menores se os oócitos eram expostos ao crioprotetor em temperaturas inferiores. Tais resultados sugeriram que as dificuldades na fertilização e desenvolvimento embrionário observadas após o congelamento de oócitos murinos poderiam estar mais relacionadas aos efeitos deletérios do resfriamento e da exposição ao crioprotetor do que ao processo de congelamento propriamente dito¹⁴⁷.

O efeito de outros crioprotetores não foi tão profundamente investigado. O propanodiol foi associado à ativação partenogênica de oócitos murinos^{149,150}, um efeito provavelmente relacionado à idade pós-ovulatória adiantada dos oócitos utilizados para o experimento, assim como a condições experimentais extremas. A ativação partenogênica pelo propanodiol pode ser evitada com a utilização de oócitos coletados mais próximo do momento da ovulação e reduzindo-se o tempo e a temperatura de exposição ao crioprotetor.

A adição de DMSO aos oócitos murinos a 37° C também levou a um “endurecimento” da *zona pellucida*, conforme verificado pelo aumento da resistência desta à quimiotripsina¹⁵¹. Esta modificação aparentemente estava associada a uma redução de grânulos corticais¹³⁹, o que levou os autores a sugerir que a ruptura da rede de actina permitiria aos grânulos corticais chegarem e fusionarem-se com a membrana superficial, um efeito que pode ser minimizado pela adição do crioprotetor em etapas.

Deve ser aqui enfatizado que muitas destas observações foram realizadas após a exposição dos oócitos a condições experimentais que não correspondem aos regimes empregados rotineiramente para criopreservação de oócitos e embriões. Quando são respeitadas as condições ótimas durante congelamento e descongelamento, estes efeitos são minimizados, sendo a fertilização e o desenvolvimento embrionário dos oócitos congelados e descongelados similares aos dos seus controles¹⁰². O resfriamento isoladamente, não parece comprometer seriamente a integridade do *oolema*, ainda que pequenas alterações na estrutura e na função da membrana possam ocorrer durante o resfriamento¹⁵². Danos à membrana plasmática são geralmente associados à formação de gelo intracelular induzida pelas taxas de resfriamento, rápidas demais para permitir o equilíbrio osmótico¹⁵³.

Com o objetivo de evitar alguns dos problemas associados ao oócito em metáfase II, a atenção foi direcionada para oócitos imaturos, em estágio de vesícula germinativa. Porém, as primeiras tentativas de congelar oócitos em estágio de vesícula germinativa resultaram em desenvolvimento embrionário muito limitado após descongelamento, maturação e inseminação *in vitro* em camundongos¹⁵⁴, em bovinos¹³³ e em humanos¹⁵⁵. Pesquisas imunohistoquímicas demonstraram que o bloqueio ao desenvolvimento não foi, pelo menos exclusivamente, devido aos efeitos adversos da criopreservação na maturação nuclear, visto que a grande maioria dos oócitos eram capazes de formar uma placa metafásica normal após congelamento e maturação *in vitro*.

Estudos posteriores demonstraram que a elevada perda pós-implantação, observada após a transferência de oócitos criopreservados e maturados *in vitro*, era devida a condições inadequadas nas condições de maturação *in vitro* e não devida a danos provocados pelo congelamento¹⁵⁶.

2.3.4 Conceitos criobiológicos relacionados à criopreservação de oócitos

O sucesso das técnicas de criopreservação de oócitos deve-se à aplicação de observações teóricas e empíricas derivadas de estudos com outros sistemas celulares, incluindo o espermatozoide. Os dois fatores de maior importância em processos de criopreservação são o crioprotetor e taxas apropriadas de resfriamento e aquecimento.

2.3.4.1 Adição de crioprotetores

Em 1949, Polge e colegas¹¹⁵ demonstraram que o uso do glicerol como crioprotetor permite o congelamento e descongelamento bem sucedido de sêmen de aves. Desde então, descobriu-se uma série de compostos que permitem a sobrevivência celular ao congelamento. Os crioprotetores podem ser divididos em permeáveis (glicerol e DMSO) ou não-permeáveis (dextran e sucrose) às células. A escolha do crioprotetor depende do tipo celular e das condições em que é usado. As características comuns destes compostos incluem alta solubilidade em água e relativa baixa toxicidade. Os meios de manipulação de embriões ou de oócitos são geralmente utilizados como meios básico aos quais um ou mais crioprotetores serão acrescentados¹⁵⁷.

Ainda não se sabe exatamente como estes compostos proporcionam a crioproteção, mas considera-se, em geral, que eles protegem as células das altas concentrações de solutos produzidos pelo processo de congelamento¹⁵⁸ através da redução da temperatura na qual se forma o gelo intracelular (-40° C com DMSO)¹⁵⁹. Acredita-se que soluções crioprotetoras de baixo peso molecular previnam a

potencialmente deletéria exposição das células a elevadas concentrações de eletrólitos através da redução da quantidade de gelo intracelular formado durante o processo de criopreservação.

2.3.4.2 Velocidades de resfriamento

As células geralmente possuem uma velocidade ideal de resfriamento para sua sobrevivência¹⁵⁸. Velocidades de resfriamento mais elevadas que o valor ideal aumentam a probabilidade de formação de gelo intracelular e as conseqüências da presença de gelo intracelular durante o reaquecimento são geralmente letais para a célula^{160,161}. Em baixas velocidades de resfriamento, as células se equilibram pela perda de água. Entretanto, quando velocidades mais elevadas são empregadas, elas não conseguem perder água na velocidade adequada para manter o equilíbrio osmótico, tornando-se progressivamente super-resfriadas, até eventualmente congelarem. A velocidade de perda de água de uma célula é determinada pela permeabilidade hídrica da membrana plasmática, pela área de superfície da membrana e pelo volume celular¹⁶². A formação de gelo intracelular durante o congelamento de oócitos pôde ser visualizada com a utilização do criomicroscópio^{159,163,164}, quando foi também demonstrada uma relação inversa entre a formação de gelo intracelular e a sobrevivência celular em função da taxa de resfriamento para oócitos murinos¹⁵⁹. Evitar a formação de gelo intracelular é um requisito fundamental para a sobrevivência durante o descongelamento celular.

2.3.4.3 Enucleação ou “Seeding”

O ponto de congelamento do meio durante o resfriamento varia de acordo com a concentração de crioprotetor¹⁶⁵. Em curvas de congelamento lento, a formação de gelo intracelular raramente ocorre no ponto de congelamento do meio, e algumas amostras podem super-congelar a temperaturas tão baixas como -21°C . Para se evitar

conseqüências deletérias do super-congelamento, como desidratação incompleta, as amostras devem ser induzidas a formar gelo, processo comumente chamado de enucleação ou “*seeding*”. A enucleação ocorre em temperaturas logo abaixo do ponto de congelamento do meio. A enucleação é induzida pelo toque na palheta ou no recipiente contendo as amostras, com um objeto metálico previamente exposto ao nitrogênio líquido. Após a indução da enucleação, as amostras são geralmente deixadas nesta mesma temperatura por 5 a 20 minutos, para se reequilibrarem. Durante este período de tempo, as células irão se desidratar em resposta à elevada concentração de eletrólitos causada pela remoção de água na forma de cristais de gelo. Estudos detalhados sobre os parâmetros envolvidos no transporte de água em oócitos humanos mostraram que a formação de gelo intracelular ocorre mais rapidamente em oócitos humanos que em murinos. Portanto, a temperatura de enucleação do gelo extracelular deve ser alterada de maneira a aumentar as taxas de sobrevivência pós-descongelamento do gameta feminino humano¹⁶⁶.

2.3.4.4 Descongelamento

A velocidade de descongelamento é o segundo fator mais importante para a sobrevivência celular. Embriões de camundongos resfriados lentamente, até -80°C , são extremamente sensíveis à velocidade de reaquecimento^{118,119}. Existe uma relação entre as velocidades de resfriamento e de reaquecimento: células resfriadas rapidamente são mais sensíveis ao reaquecimento lento do que ao reaquecimento rápido¹⁵⁸. Este fato pode ser explicado pela presença de gelo intracelular, visto que células rapidamente congeladas estarão incompletamente desidratadas no momento da formação do gelo intracelular. Durante o reaquecimento lento, os cristais de gelo crescem, resultando na morte celular devido a ruptura da membrana plasmática e devido ao trauma osmótico durante o descongelamento¹⁶⁷. O reaquecimento rápido evitará os efeitos danosos do

crescimento dos cristais. Rall e colegas (1980)¹⁶⁴ observaram, por criomicroscopia, que embriões de camundongos em estágio de 8 células, congelados rapidamente a partir de – 40° C , não continham gelo intracelular, e que a formação de gelo ocorre somente quando eles são reaquecidos de forma relativamente lenta.

2.3.4.5 Diluição do crioprotetor

A maior parte da diluição do crioprotetor ocorre já durante o descongelamento¹⁶⁰. As taxas de diluição devem ser perfeitas a fim de reduzir o dano devido ao choque osmótico. Durante a diluição, ocorre um aumento imediato no volume celular e, se este aumento for muito grande, a célula morre. O grau de aumento do volume celular depende da quantidade de crioprotetor dentro da célula e da velocidade com que ele pode sair da célula. A temperatura é um fator importante durante a diluição, uma vez que ela influencia a velocidade de transporte do crioprotetor de dentro para fora da célula¹⁶⁵. Teoricamente, o dano celular seria evitado fazendo-se uma diluição gradativa, em etapas, de maneira que o volume celular nunca atinja valores que causem lise celular¹⁶¹. Entretanto, trabalhos com embriões de camundongos de 8 células e com blastocistos demonstraram que a sobrevivência após o descongelamento e rápida diluição a 20°C foi similar à ocorrida após diluição lenta a 0°C ou a 20°C ¹⁶⁸. Estes dados sugeriram que a intensidade do dano osmótico que as células podem suportar depende, fundamentalmente, da extensão dos danos ocorridos durante o congelamento e o descongelamento¹⁶⁵. Células resfriadas e descongeladas em velocidades ideais podem suportar o abrupto impacto osmótico.

O choque osmótico durante a diluição do crioprotetor pode ser evitado pela adição de um soluto impermeável, como a sacarose¹⁶⁹. Nestas soluções, o equilíbrio osmótico é estabelecido pelo colapamento da célula, prevenindo-se o aumento de volume

celular enquanto o crioprotetor desloca-se para fora dela^{170,171}. A concentração de sacarose no diluente pode variar entre 0,5 e 1,5 M, sem efeitos significativos na viabilidade dos embriões murinos congelados rapidamente¹⁷². Entretanto, durante a diluição da sacarose, a temperatura deve ser cuidadosamente controlada, uma vez que a viabilidade celular após o descongelamento é afetada quando a diluição da sacarose ocorre a temperaturas acima de 20°C^{172,173}.

2.3.5 Armazenamento

Teoricamente, as células podem sobreviver indefinidamente congeladas em temperaturas onde não existe atividade biológica, como ocorre em nitrogênio líquido. Os únicos tipos de reações que ocorrem, nesta temperatura, são fotofisiológicos, como a radiação ionizante. O nível natural de radiação ambiente é baixo e, uma vez que menos de 1% das mutações espontâneas são atribuíveis à radiação ambiente a temperaturas fisiológicas, seria necessário armazenamento por 200 a 1000 anos para reduzir significativamente a sobrevivência celular². Assim, parece não existir uma barreira óbvia ao armazenamento prolongado de embriões e oócitos de mamíferos a -196°C. Em condições normais, o maior período de estocagem de embriões, sem perda da viabilidade, foi de 14,5 anos¹⁷⁴ e em condições simulando períodos de até 200 anos de armazenamento, a -196°C².

2.3.6 Técnicas de criopreservação

As pesquisas têm demonstrado que a criopreservação de oócitos de diversas espécies mamíferas é viável, produzindo taxas razoáveis de desenvolvimento embrionário pós-descongelamento e fertilização *in vitro*.

2.3.6.1 Congelamento lento/descongelamento lento

Whittingham, Leibo e Mazur (1972)¹¹⁸ desenvolveram o método de congelamento lento para embriões de camundongos em estágio pré-implantacional, levando em consideração fatores criobiológicos, como o meio, a velocidade de congelamento, a temperatura final e a velocidade de descongelamento, que poderiam influenciar na sobrevivência dos embriões murinos pré-implantação, O procedimento que resultou nas melhores taxas de sobrevivência utilizou uma solução 1M de DMSO a 0°C e velocidade de resfriamento de -0,3°C/min. até -80°C, antes de serem imersos no nitrogênio líquido (-196°C). Para o descongelamento, as amostras que apresentaram melhores taxas de sobrevivência foram aquelas reaquecidas lentamente a uma velocidade de 2,5 ou 4°C/min.

O sucesso da técnica deveu-se às velocidades lentas de resfriamento, que permitiu a saída de toda a água congelável da célula, evitando a formação de gelo, e ao reaquecimento lento durante o descongelamento¹⁵⁸.

2.3.6.2 Congelamento lento e reaquecimento rápido

Willadsen (1977)¹⁷⁵ demonstrou que embriões de ovelhas e de bovinos também podem sobreviver ao reaquecimento rápido após congelamento lento, desde que o congelamento lento seja interrompido a temperaturas bem abaixo de zero (de -30°C a -45°C), antes de serem imersos no nitrogênio líquido. Nestas temperaturas extremamente baixas, os embriões devem conter água intracelular suficiente para danificá-los durante reaquecimento lento, mas não em descongelamento rápido¹⁶⁸. Acredita-se que isto ocorra porque o reaquecimento rápido evita a recristalização e crescimento subsequente dos cristais de gelo intracelular, preservando a viabilidade celular¹⁶³. Os passos essenciais neste método são: (a) incorporação de solução 1,5 M de DMSO a 0°C; (b) enucleação em torno de -7°C ; (c) resfriamento lento (0,3°C/min) até -40°C; (d) transferência para o

nitrogênio líquido; (e) reaquecimento rápido (275°C a 500°C/min; (f) após 5 minutos a temperatura ambiente, diluição rápida do DMSO¹⁶⁸.

A técnica de congelamento lento e descongelamento rápido, com interrupções, é mais rápida e mais prática do que a técnica descrita anteriormente², porque requer um período de resfriamento menor e os embriões são subseqüentemente descongelados também rapidamente.

2.3.6.3 Vitrificação

A vitrificação é uma alternativa a outros métodos de criopreservação, uma vez que evita os danos potenciais causados pela formação de gelo intracelular^{117,176}. Com embriões de camundongos¹⁷⁶ e com oócitos^{3,177}, as taxas de fertilização *in vitro* e de sobrevivência fetal após implantação são similares às obtidas após congelamento lento.

A vitrificação de embriões foi inicialmente desenvolvida por Rall e Fahy (1985)¹³⁶, com o objetivo de superar os problemas da formação de gelo intracelular, apresentando ainda a vantagem de reduzir o tempo do procedimento e eliminar a necessidade de uma máquina de congelamento programável. A vitrificação baseia-se na capacidade de soluções líquidas altamente concentradas de crioprotetores tornarem-se tão viscosas a temperaturas suficientemente baixas, que elas solidificam sem a formação de gelo¹³⁶. As células e os órgãos capazes de vitrificação escapam dos danos causados pelo efeito da solução ou pela formação de gelo intracelular.

Os crioprotetores geralmente utilizados para vitrificação incluem DMSO, propanodiol, polietilenoglicol, dextrose e acetamida. O DMSO é o componente preferido devido à sua maior capacidade de vitrificação e à sua baixa toxicidade¹⁵⁷, mas em concentrações muito elevadas ele pode ser desagradável para o manejo.

A solução de vitrificação original (SV1)¹³⁶ consistia de 20,5% de DMSO, 15,5% de acetamida, 10% de propilenoglicol e 6% de polietilenoglicol em solução salina Dulbecco

modificada em pH 8,0. Os embriões eram expostos gradativamente a SV1 a 25% e 50% à temperatura ambiente e, a seguir, transferidos uma solução contendo de 75% a 100% de SV1, à temperatura de 4°C, antes de serem imersos em nitrogênio líquido. Os autores obtiveram uma elevada taxa de sobrevivência *in vitro* dos embriões quando eles foram vitrificados nas mais altas concentrações (SV1 a 100%, a 90% e a 87,5%) e reaquecidos rapidamente a 300°C/min ou mais.

Os métodos de vitrificação foram originalmente desenvolvidos para criopreservação de embriões mamíferos^{136,178,179}. Diferentes soluções de vitrificação foram testadas e a sobrevivência embrionária variou conforme o protocolo utilizado. Algumas formulações diferentes de soluções de vitrificação que foram testadas desde a SV1 original, incluem: glicerol e propilenoglicol¹⁸⁰, etilenoglicol, Ficoll e sacarose^{173,181}, DMSO isoladamente¹⁸² ou em combinação com acetamida e propilenoglicol¹⁸³ e glicerol combinado com altas concentrações de albumina¹⁸⁴.

Dois fatores causam preocupação quanto à segurança da vitrificação. O primeiro é que a solução de vitrificação original contém acetamida, a qual tem sido associada à carcinogênese em humanos¹⁸⁵ e poderia também levar a malformações fetais. Além disso, as altas concentrações de crioprotetores como o DMSO e o glicerol, poderiam ser potencialmente tóxicas aos oócitos e aos embriões, particularmente durante o período de tempo em que eles são expostos à solução de vitrificação antes e após a vitrificação. Mais recentemente, foi descrito um método de vitrificação de embriões de camundongos de 8 a 12 células utilizando uma solução de vitrificação contendo glicerol e albumina sérica bovina¹⁸⁴. Esta formulação reduz o efeito tóxico das soluções anteriores, apresentando elevados índices de sobrevivência e viabilidade pós-descongelamento e grande repetibilidade dos resultados.

O segundo fator que gera preocupação quanto à segurança da vitrificação, diz respeito ao congelamento de oócitos em geral, e é a possibilidade de danos irreversíveis

ao citoesqueleto, que poderiam levar à má-segregação cromossômica, conforme discutido previamente. Esta possibilidade foi esclarecida a partir dos estudos citogenéticos em embriões murinos obtidos por partenogênese após congelamento dos oócitos^{3,146}. Ficou evidente que, ao serem observadas as condições ideais de congelamento e exposição ao crioprotetor, não há qualquer aumento nas taxas de anomalias cromossômicas resultantes dos processos de criopreservação.

2.3.6.4 Congelamento ultra-rápido

Miyamoto e Ishibashi (1983)¹⁸⁶ relataram pela primeira vez a sobrevivência de embriões congelados por transferência direta para temperaturas abaixo de zero, sem a necessidade de induzir a enucleação. A viabilidade dos embriões congelados desta forma direta depende do grau de desidratação prévia ao congelamento. Tal pode ser controlado utilizando-se um meio que contenha um soluto impermeável, como a sacarose. A água intracelular remanescente congela e o procedimento é inócuo, provavelmente porque os cristais de gelo que se formam durante o congelamento são muito pequenos para danificarem a célula e sua recristalização é prevenida pelo descongelamento rápido¹⁸⁷. Os crioprotetores mais utilizados para congelamento ultra-rápido são o glicerol^{172,186,188} e o DMSO^{189,190} em concentrações relativamente elevadas (glicerol: 2 a 4 M; DMSO: 2 a 3,5 M), enquanto que a concentração ótima de sacarose é de 0,25 a 0,5 M no meio de suspensão. Surrey e Quinn (1990)¹⁹¹ aplicaram a técnica de congelamento ultra-rápido utilizando solução 3,5 M de DMSO e 0,5 M de sacarose para oócitos murinos. Os autores obtiveram taxas de fertilização *in vitro* e formação de blastocistos equivalentes às obtidas com congelamento lento e semelhantes aos controles não tratados. Entretanto, o mesmo sucesso não foi obtido quando a técnica foi empregada em oócitos humanos¹⁹².

Similar ao que ocorre na vitrificação, o congelamento ultra-rápido requer habilidade manual e precisão nos tempos do procedimento, devido às altas

concentrações de crioprotetor e de sacarose. Assim, os resultados obtidos pela técnica dependem do operador e podem variar entre os diferentes laboratórios.

Atualmente, o armazenamento de oócitos murinos é uma rotina em vários laboratórios empregando alguma das técnicas descritas. Os problemas das baixas taxas de fertilização após vitrificação foram superados^{3,102,146}. Entretanto, a criopreservação de oócitos de animais domésticos e de humanos ainda não alcançou o mesmo sucesso. Evidentemente, mais pesquisa é necessária para congelamento ou vitrificação destes gametas, de maneira que eles mantenham sua integridade funcional e estrutural após a criopreservação. O efeito das baixas temperaturas na placa metafásica dos oócitos de diferentes espécies é muito importante. Sabe-se que ócitos murinos em metáfase II são capazes de recuperar a estrutura normal da placa após congelamento lento ou ultrarrápido, na presença de DMSO, desde que sejam mantidos por 1 hora a 37°C após o descongelamento¹⁹³. Ainda não é certo, entretanto, se o mesmo fenômeno ocorre em oócitos de humanos e bovinos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo sobre a adequação da técnica de criopreservação por vitrificação em solução de 6 M DMSO para oócitos bovinos maturados em laboratório para os seguintes desfechos:

- recuperação morfológica e sobrevivência após o descongelamento
- parâmetros de viabilidade fisiológica, tais como a fecundidade e o potencial de desenvolvimento dos oócitos bovinos vitrificados e descongelados

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar a fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos frescos com oócitos criopreservados por vitrificação.
2. Comparar o tempo de exposição de oócitos bovinos às soluções de DMSO da técnica de criopreservação por vitrificação de oócitos bovinos por 30 segundos, com a técnica de exposição por 60 segundos para os seguintes desfechos:
 - recuperação morfológica e sobrevivência após o descongelamento
 - fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário
3. Comparar oócitos bovinos expostos às soluções de vitrificação, com oócitos bovinos vitrificados com exposição às soluções de DMSO por 30 segundos e por 60 segundos e com oócitos frescos para os seguintes desfechos:
 - recuperação morfológica
 - fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário

4. Avaliar o índice de ativação partenogênese dos oócitos bovinos vitrificados através da sua exposição a sêmen contendo espermatozóides mortos ou sem espermatozóides.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;1:884-886.
2. Whittingham DG, Lyon MF, Glenister PH. Long term storage of mouse embryos at – 196⁰C: The effect of background radiation. *Genet Res* 1977;29:171-181.
3. Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, et al. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995;53:780-785.
4. Wassarman PM, Albertini DF; Mammalian ovum. In Knobil E, Neill J (eds): *The Physiology of Reproduction*, cap. 3, p. 79-123. New York, Raven Press, 1994.
5. Ozdenski W. Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Pol* 1967;17:369-379.
6. Ginsburg M, Snow MHL, McLaren M. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990;110:521-528.
7. Snow MHL, Monk M; Emergence and migration of mouse primordial germ cells. In McLaren A, Wylie, CC (eds): *Current Problems in Germ Cell Differentiation*. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1983.
8. Mintz B, Russel ES. Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 1957;134:207-238.
9. Tam PPL, Snow MHL. The *in vitro* culture of primitive streak stage mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1981;59:131-143.
10. Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 1983;24:77-92.
11. Baker TG; Oogenesis and ovulation. In Austin CR, Short RV (eds): *Reproduction in mammals*, cap. 2, p17-45. Cambridge, Cambridge University Press, 1987.
12. Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1966;10:97-105.

13. Speroff L, Glass RM, Kase MG: O ovário-embriologia e desenvolvimento. In: Speroff L, Glass RM, Kase MG (eds.), Camargo Jr. MAS (trad.) . Endocrinologia Ginecológica Clínica e Infertilidade, 5^aed., 1^a ed. português, cap. 3, p. 85-109 . São Paulo, Manole, 1995.
14. Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1989;38:87-98.
15. Milanov C, Sirard MA. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 1994;41:819-827.
16. Baker TG, Challoner S, Burgoyne PS. The number of oocytes and the rate of atresia in hemiovariectomized mice up to eight month after surgery. *J Reprod Fert* 1980;60:449-456.
17. Crozer N, Huneau D, Desmedt V, et al. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res* 1987;16:159-170.
18. Amsterdam A, Rotmensch S, Furman A, et al. Synergetic effect of human chorionic gonadotropin and extracellular matrix on in vitro differentiation of human granulosa cells: Progesterone production and gap-junction formation. *Endocrinology* 1989;124:1956-1964.
19. Clarck JM, Eddy EM. Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol* 1975;47:135-155.
20. Schultz R, Letourneau G, Wassarman PM. Programm of early development in the mammal: changes in the pattern and absolute rates of tubulin and total protein synthesis during oocyte growth in the mouse. *Dev Biol* 1979;73:120-133.
21. Young RJ, Sweeney K, Bedford JM. Uridine and guanosine incorporation by the mouse one-cell embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1978;44:133-148.

22. Levey IL, Stull GB, Brister RL. Poly(A) and synthesis of polyadenylated RNA in preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 1978;64:140-148.
23. Peters H; Folliculogenesis in mammals. In Jones RE (ed): The vertebrate ovary, cap. 3, p. 88. New York, Plenum, 1978.
24. Grunert E. Infertilidad en la vaca. 10a ed, p. 475. Montevideo, Hemisferio Sur, 1989.
25. Downs SM. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. *Theriogenology* 1993;39:65-79.
26. Motlik J, Kubelka M. Cell cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990;27:366-375.
27. Edwards RG. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965;201:349-351.
28. Hyttel P, Greeve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil* 1989; 38(suppl.):35-47.
29. Sun FZ, Moor R. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. *Dev* 1991;111:171-180.
30. Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol Reprod* 1988;39:546-552 .
31. Homa S, Brown CA. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *J Reprod Fert* 1991;94:153-160.
32. Szöllosi D, Gerard M, Menezes Y, et al. Permeability of ovarian follicle; corona cell-oocyte relationship in mammals. *Annals Biol Anim Biochem Biophys* 1978;18:511-521.
33. Pincus G, Enzman EV. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 1936;62:665-675.
34. Donahue R. Maturation of the mouse oocyte *in vitro*: sequence of timing of nuclear progression. *J Exp Zool* 1968;169:237-250.

35. Thibault C. Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fert* 1977;51:1-15.
36. Schroeder AC, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes that matured in vitro is normal. *Dev Biol* 1984;102:493-497.
37. Wassarman PM; The mammalian ovum. In Knobill E, Neil JD (eds.): *The Physiology of Reproduction*, 1^a ed., p. 69-102, New York, Raven Press, 1988.
38. Siracusa G, DeFelici M, Salustri A; Meiotic maturation of the mammalian oocyte. In Asch R, Balmaceda J, Johnston I (eds.): *Gamete Physiology*, 1^a ed., p. 129-144. Serono Symposia, USA, 1990.
39. Eppig JJ. The relationship between cumulus-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Dev Biol* 1982;119:313-321.
40. Eppig JJ, Downs SM. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol Reprod* 1987;30:1-11.
41. Sirard MA, Coenen K. The co-culture of cumulus enclosed bovine oocytes and hemisections of follicles: effects on meiotic resumption. *Theriogenology* 1993;40:933-942.
42. Cho WK, Stern S, Biggers J. Inhibitory effect of dibutyl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J Exp Zool* 1984;187:383-386.
43. Bornslaeger E, Wilde M, Schultz R. Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev Biol* 1984;105:488-499.
44. Eppig JJ. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biol Reprod* 1991;45:824-830.
45. Carrol J. Development of oocyte banks and systems for the *in vitro* development of oocytes: future directions for the treatment of infertility. *Hum Reprod* 1996;11:159-168.

46. Cheung A, Swann K, Carrol J. The ability to generate normal Ca²⁺ transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocyte growth and maturation. *Hum Reprod* 2000;15:1389-1395.
47. Dominko T, First NL. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotrophins. *Theriogenology* 1992;37:203.
48. Schultz R, Montgomery R, Ward-Bailey P, et al. Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Dev Biol* 1983;95:294-304.
49. Tsafiriri A, Dekel N, Bar-Ami S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fert* 1982;64:541-551.
50. Tsafiriri A, Adashi E; Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In Knobil E, Neill J (eds): *The Physiology of Reproduction*, cap.15, p.817-861, New York, Raven Press, 1994.
51. Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 1990;138:16-26.
52. Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC. Role of EGF and IGF-I, sera and cumulus cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1995;44:109-118.
53. Webb R, Gong JG, Bramley TA. Role of growth hormones and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology* 1994;41:25-30.
54. Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fert* 1977;49:101-109.

55. Greeve J, Salzman G, Roller R et al. Biosynthesis of the major *zona pellucida* glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. *Cell* 1982;31:749-759.
56. Bos-Mikich A; Estudos histológicos e citogenéticos da oogênese e ovariogênese em gado mestiço: Dissertação (Mestrado em Genética), p.165. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1987.
57. Wassarman PM. Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 1990;108:1-17.
58. Ducibella T, Rangarajan S, Anderson E. The development of mouse oocyte cortical reaction competence is accompanied by major changes in cortical vesicles and not cortical granule depth. *Dev Biol* 1988;130:789-792.
59. Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 1990;138:26-32.
60. Chen L, Mao SJ, Larsen WJ. Identification of a factor in fetal bovine serum that stabilizes the cumulus extracellular matrix. *J Biol Chem* 1992;267:12380-12386.
61. Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod* 1993;49:1277-1287.
62. Zuelke KA, Brackett BG. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured *in vitro*. *Endocrinology* 1990;131:2690-2696.
63. Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1989;31:61-74.
64. Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Rutledge ML. *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol Reprod* 1991;44:256-260.
65. Motkik J. Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. *J Reprod Fertil* 1989;38:17-25.

66. Staingmiller RB. *In vitro* methods for production of viable oocytes. *J Anim Sci* 1988;66:54-64.
67. Tan SJ, Lu KH. Effects of different oestrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 1990;33:335.
68. Arlotto TM, Leibfried-Rutledge ML, First NL. Size, distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two locations in the ovary. *Theriogenology* 1990;33:188.
69. Grimes RW, Ireland JJ. Relationship of microscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. *Biol Reprod* 1986;35:725-732.
70. Yang YB, Lu KH. The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*. *Theriogenology* 1990;33:355.
71. Hazakeger NL, Stubbings RB. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology* 1992;37:219.
72. Yang NS, Lu KH, Gordon I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. *Theriogenology* 1990;33:352.
73. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591-600.
74. Fukushima M, Fukui Y. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 1985;9:323-332.
75. Younis A I, Brackett BG, Fayer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation *in vitro*. *Gam Res* 1989;23:189-201.
76. Nakawa A, Semple E, Leibo SP. Influence of serum sources on kinetics of nuclear maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 1994;41:264.

77. Staingmiller R, Moor R. Effect of follicle cells on oocyte maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gam Res* 1984;9:221-229.
78. Fukui Y, Ono H. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes. *Vet Res* 1988;122:282.
79. Ball GD, Leibfried ML, Ax RL. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. *J Dairy Sci* 1984;67:2775-2785.
80. Pinyopummintr T, Bavister BD. Effect of gaseous atmosphere on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1994;41:276.
81. Austin CR. Cortical granules in hamster eggs. *Exp Cell Res* 1956;10:533-540.
82. Barros C, Yanagimachi. Induction of the zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature* 1971;233:268-269.
83. Yanagimachi R; Mechanisms of fertilization in mammals. In Mastroiani Jr L, Biggers JD (eds.): Fertilization and embryonic development *in vitro*, cap.3, p.82-186, New York, Plenum Press, 1981.
84. Rodman TC, Pruslin FH, Hoffman HP, et al. Turnover of basic chromosomal proteins in fertilized eggs: a cytoimmunochemical study of events *in vivo*. *J Cell Biol* 1981;90:351-361.
85. Bedford JM. An electron microscopy study of sperm penetration into rabbit egg after natural mating. *Amer J Anat* 1972;133:213-254.
86. Longo FJ. Fertilization: A comparative ultrastructural review. *Biol Reprod* 1973;9:149-215.
87. Barros C, Gonzales J, Herrera E, et al. Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia* 1979;11:197-210.

88. Maro B, Johnson MH, Webb M, et al. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol* 1986;92:11-32.
89. Hillety FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertility and embryo development *in vitro*. *Theriogenology* 1990; 33:249.
90. Henault MA, Killian GJ. Effects of sperm preparation and bull fertility on *in vitro* penetration of zona-free bovine oocytes. *Theriogenology* 1995;43:739-749.
91. Chang MC. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature* 1959;184:466-467.
92. Iwamatsu T, Chang MC. *In vitro* fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature* 1969;224:919.
93. Fraser L. Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse oocytes. *Gamete Res* 1987;18:363-374.
94. Toyoda Y, Chang MC. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J Reprod Fert* 1974;36:9-22.
95. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982;27:147-158.
96. Brackett BG, Keefer CL, Troop CG, et al. Bovine twins resulting from *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 1984;21:224.
97. Sirard MA, Lambert RD, Menard DP, et al. Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviducts and their transfer to the cow uterus. *J Reprod Fert* 1985;75:551.
98. Fului Y, Imai K, Alfonso NF, et al. Follicle culture enhances fertilizability and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *J Anim Sci* 1987;64:935-941.
99. Sant'anna DM. Influência das células epiteliais de oviduto e da heparina na capacitação espermática e na fecundação sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Porto Alegre: FAVET-UFRGS, 1999. 145 p. Dissertação (Mestrado)

em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

100. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. *Nature* 1969;211:632-635.
101. Tan SJ, Steer C, Royston, et al. Conception rates and *in vitro* fertilization. *Lancet* 1990;335:299.
102. Carrol J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol. Reprod* 1993;48:600-612.
103. Belaisch-Allart JC, Testart J, Frydman R. Detection of plasmic hCG following transfer of embryos conceived *in vitro*. *Fertil Steril* 1984;40:701-702.
104. Hull MGR; The causes of infertility and relative effectiveness of treatment. In Templeton A A, Drife,J (eds.): Infertility, cap.3, p.33-34, London, Springer-Verlag, 1992.
105. Artley JK, Braude PR. Biochemistry of the preimplantation embryo. *Assit Reprod* 1993;3:13-32.
106. Parrish JJ; Application of *in vitro* fertilization to domestic animals. In Wassarman PM (ed.): Elements of mammalian fertilization, cap. 3, p111-132. CRC Press, Boca Raton, 1991.
107. Fukui Y, Urakawa M, Sasaki C. Developemt to the late morula or blastocyst stage following *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 1989;18:139-148.
108. Lu KH, Gordon I, Gallagher M. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet Rec* 1987;121:259-260.

109. Van Inzen WG, Van Stekenlenburg-Hamers AEP, Weima, TAM. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using buffalo rat liver cells. *Theriogenology* 1995;43:723-738.
110. Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM. Effect of oviduct on embryonic development. *J Reprod Fertil* 1989;38:107-115.
111. Eyestone WH, First NL. Characterization of developmental arrest in early bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology* 1991;35:613-623.
112. Pollard JW, Scodras JM, Plante L. Definition of the cleavage stage(s) at which oviductal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the *in vitro* 8-16 cell block. *Theriogenology* 1991;35:256, abstract.
113. Trounson A, Pushett D, Maclellan LJ. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 1994;41:57-66.
114. Ellington JE, Farrell PB, Carney EW. *In vitro* developmental potential of bovine zygotes in oviduct epithelial cell co-culture systems. *Theriogenology* 1990;33:223.
115. Polge C, Smith AU, Perkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949;164:666-667.
116. Ashwood-Smith MJ, Friedmann GB. Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage times, and x-radiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 1979;16:132-140.
117. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Amer J Physiol* 1984;247:C125-C143.
118. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse oocyte embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science* 1972;178:411-414.
119. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci* 1972;11:1071-1079.

120. Van Uem JFHM, Siebzehnruhl ER, Schuh B, et al. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987;2:752-753.
121. Tucker M, Wright G, Morton P, et al. Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1,2-propanediol and sucrose. *Hum Reprod* 1996;11:1513-1515.
122. Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, et al. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril* 1997;68:724-726.
123. RESOLUÇÃO 196/1996 -Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Governo do Brasil, Conselho Nacional de Saúde, Rresolução 196/1996.
124. Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocyte to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1982;66:161-168.
125. Rogers BJ, Van Campen H, Ueno M, et al. Analysis of human spermatozoa fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril* 1979;32:664-656.
126. Polge C; The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In In Elliot K,Whelan J (eds): The freezing of mammalian embryos, p.3-38. London, The CIBA fundation Symposium, 1977.
127. Sherman JK, Lin TP. Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs. *Nature* 1958;181:785-786.
128. Sherman JK, Lin TP. Temperature shock and cold storage of unfertilized mouse eggs. *Fertil Steril* 1959;10:384-396.
129. Parkes AS. Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J Endocrinol* 1958;17:337-343.
130. Parrot DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fert* 1960;1:230-241.

131. Al-Hasani S, Kirsch J, Diedrich K, et al. Successful embryo transfer of cryopreserved and *in vitro* fertilized rabbit oocytes. *Hum Reprod* 1989;4:77-79.
132. Vincent C, Garnier J, Heyman Y, et al. Solvent effects on cytoskeletal organization and *in vivo* survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fert* 1989;87:809-820.
133. Fuku E, Kojima T, Shioya Y, et al. *In vitro* fertilization and development of frozen/thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 1992;29:485-492.
134. Young E, Kenny A, Puigdomenech E, et al. Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. *Fertil Steril* 1998;70:360-362.
135. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, et al. A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Hum Reprod* 1999;14:3077-3079.
136. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
137. Edwards RG. Colchicine-induced heteroploidy in the mouse. I. The induction of triploidy by treatment of the gametes. *J Exp Zool* 1958;137:317-347.
138. Webb M, Howlett SK, Maro B. Parthenogenesis and cytoskeletal organization in aging mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 1986;95:131-145.
139. Vincent C, Pickering SJ, Johnson M. The hardening effect of dimethylsulfoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fert* 1990;89:253-259.
140. Magistrini M, Szöllosi D. Effects of cold and isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol* 1980;22:699-707.
141. Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of mouse oocyte. *Hum Reprod* 1987;2:207-216.
142. Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, et al. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 1987;16:205-216.

143. Bouquet M, Selva J, Auroux M. The incidence of chromosome abnormalities in frozen-thawed mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1992;7:76-80.
144. Kola I, Kirby C, Shaw J, et al. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and mal-formed fetuses. *Teratology* 1988;38:467-474.
145. Carrol J, Warnes GM, Matthews CD. Increase in dygany explains polyploidy after *in vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 1989;85:489-494.
146. Bos-Mikich A, Whittingham DG. Analysis of the chromosome complement of frozen-thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1995;42:254-260.
147. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubule system of the mouse oocyte. *Development* 1987;100:313-324.
148. Sathananthan A H, Trounson A, Freeman L, et al. The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988;3:968-978.
149. Shaw JM, Trounson A. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2-propanediol is influenced by temperature, oocyte age and cumulus removal. *Gamete Res* 1989;22:269-279.
150. Van Der Elst J, Nerinckx S, Van Steirtegehem AC. *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Hum Reprod* 1988;7:1440-1446.
151. Johnson MH. The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethylsulfoxide. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1989;6:168-175.
152. Didion BA, Martin MJ, Markert CL. Parthenogenetic activation of mouse and pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1990;33:1165-1175.
153. Parks JE, Ruffing NA. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* 1992;37:59-73.

154. Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, et al. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J Reprod Fert* 1990;89:43-50.
155. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988;3:117-119.
156. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG, et al. Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum Reprod* 1994;9:1738-1742.
157. Friedler S, Shen E, Lamb EJ. Cryopreservation of mouse 2-cell embryos and ova by vitrification: methodologic studies. *Fertil Steril* 1988;48:306-314.
158. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970;168:939-949.
159. Leibo SP, McGrath JJ, Carvalho E.G. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology* 1978;15:257-271.
160. Farrant J; General observations on cell preservation. In Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds.): Low temperature preservation in medicine and biology, cap.1, p.1-18. Tunbridge Wells, kent, Uk, Pitman Medical Ltd., 1980.
161. Mazur P; Slow-freezing injuries in mammalian cells. In Elliot K, Whelan J (eds.): The freezing of mammalian embryos. CIBA Foundation Symposium vol 52, p.19-48. Amsterdam, Elsevier, 1977.
162. Armitage WJ. Effect of solute concentration on intracellular water volume and hydraulic conductivity of human blood platelets. *J Physiol* 1986;374:375-385.
163. Rall WF, Reid DS, Farrant J. Innocuous biological freezing during warming. *Nature* 1980;286:511-514.
164. Lhen-Jensen H, Rall WF. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology* 1983;19:263-277.

165. Whittingham DG; Principles of embryo preservation. In Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds.): Low temperature preservation in medicine and biology, cap.4, p.65-84. Tunbridge Wells, Kent, UK, Pitman Medical limited, 1980.
166. Trad FS, Toner M, Biggers JD. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperatures on intracellular freezing and survival of human oocytes. *Hum Reprod* 1998;14:1569-1577.
167. Mazur P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. *Cryobiology* 1966;2:181-192.
168. Whittingham DG, Wood MJ, Farrant J, et al. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J Reprod Fert* 1979;56:11-21.
169. Leibo SP, Mazur P; Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In Daniel JC (ed): *Methods in Mammalian Reproduction*, 1^a ed., cap. 5, p. 111. New York, USA, Academic Press, 1978.
170. Renard J-P, Heyman Y, Ozil J-P. Congelation del émbryon bovin: une nouvelle methode de decongelation pour le transfer cervical démbryons conditionnes une seule fois en pailletes. *Annals Med Vet* 1982;126:23-32.
171. Leibo SP. Equilibrium and non-equilibrium cryopreservation of embryos. *Theryogenology* 1989;31:85-93.
172. Szell A, Schelton N. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid vapour. *J Reprod Fert* 1986;76:401-408.
173. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 1990;89:91-97.
174. Glenister PH, Wood MJ, Kirby, et al. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 1987;16:205-216.

175. Willadsen SM; Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing. In Elliot K, Whelan J (eds.): The freezing of mammalian embryos, CIBA Foundation Symposium, vol. 52, p. 175-201, Amsterdam/New York, USA, Elsevier, 1977.
176. Rall WF. Factors affecting the survival of vitrified mouse embryos . *Cryobiology* 1987;24:387-402.
177. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology* 1991;28:50-54.
178. Shaw PW, Fuller BJ, Bernard AG, et al. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effect of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev* 1992;33:210-214.
179. Bertolini M. Sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões de *Mus musculus* vitrificados. Porto Alegre, FAVET-UFRGS, 1994. 210p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
180. Massip A, Van Der Zwalm P, Scheffen B, et al. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 1986;7:270-273.
181. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, et al. Successful vitrification of murine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol Reprod Dev* 1993;34:66-271.
182. Wood MJ, Barros C, Candy CJ, et al. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulfoxide. *Biol Reprod* 1993;49:489-495.
183. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fert* 1989;87:479-483.

184. Rall WF, Wood MJ. High *in vitro* and *in vivo* survival of day-3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J Reprod Fert* 1994;101:681-688.
185. Kier LE, Brusik DJ, Auletta AE, et al. The Salmonella typhimurium/mammalian microsomal assay: a report of the US environmental Protection Agency. Gene-Tox programme. *Mutat Res* 1986;168:69-240.
186. Miyamoto H, Ishibashi T. Solid CO₂ freezing of mouse embryos. *J Reprod Fert* 1983;67:107-111.
187. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics* 1990;17:53-92,r.
188. Williams TJ, Johnson SE. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology* 1986;26:125.
189. Trounson A, Leeton J, Besanko M. Pregnancy established in infertile patient after transfer of donated embryo fertilized *in vitro*. *Br Med J* 1983;286:835-836.
190. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987;48:843-850.
191. Surrey ES, Quinn PJ. Successful ultra-rapid freezing of unfertilized oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990;7:262-266.
192. Al-Hasani S, Diedrich K, Vem H, et al. Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987;2:695-700.
193. Aigner S, Van Der Elst J, Siebzehnrbuk E, et al. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1992;7:857-864.

5. ARTIGO EM INGLÊS

**Viability and in vitro fertilization of bovine oocytes after vitrification using a 6 M
DMSO solution**

Sérgio Galbinski, M.D., Adriana Bos-Mikich, PhD, Arnaldo N. Ferrari, M.D. PhD.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade

Porto Alegre, RS, Brazil.

Address for correspondence:

Sérgio Galbinski

Rua Alcides Cruz, 101

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90.630-160

Fax: +55 51 3331 51 30

e-mail: guga@orion.ufrgs.br

SUMMARY

BACKGROUND. The ability to cryopreserve bovine oocytes indefinitely for subsequent *in vitro* fertilization has several applications in human medicine and biotechnology. The objective of this study was to verify the feasibility of the vitrification technique using 6 M DMSO to cryopreserve *in vitro* matured bovine oocytes, and to assess the effects of the prolonged exposure to the vitrification solutions at room temperature.

METHODS. The stock vitrification solution (VS 100%) consisted of 6 M DMSO. Dilutions of VS were prepared to give solutions 25% and 65% DMSO. Bovine oocytes were *in vitro* matured for 18-22 h. Matured oocytes were placed first 25% VS, at room temperature for 5 min, then transferred to 65% VS, before being pipetted into the 100% VS in plastic straws. Three experimental groups were formed: in the first group time of pipetting through 65% VS and loading the straw took up to 60 s, in the second group did not exceed 30 s. For thawing, straws were held in air for 10 s and then in water bath for 10 s. The contents of each straw were expelled in 1 ml of 1M Su solution at r.t. and held for 5 min. In the third experimental group, oocytes went through all VSs as described above, placed in straws, but not vitrified. All oocytes retrieved were inseminated. For control, fresh, *in vitro* matured oocytes were inseminated under the same conditions.

RESULTS. After vitrification, 69.1% and 59.8% of the oocytes were retrieved in the 30 s and 60 s groups, respectively. 93% and 89% of these oocytes appeared morphologically normal 24 h after insemination, respectively. In the group of oocytes exposed to VSs without vitrification, 75.6% were retrieved and 84.7% were morphologically viable, 24 h post-insemination. No fertilization and embryonic development was observed in any of the experimental groups. Among controls, 65.4% of the oocytes were fertilized and 28.2% of them reached the blastocyst stage by day-7 of culture.

CONCLUSIONS. The vitrification technique using 6 M DMSO is not a feasible approach to cryopreserve *in vitro* matured bovine oocytes. Decreasing the time of exposure to the SVs

at room temperature did not overcome the deleterious effects of the procedure on the fertilizability and embryonic development of vitrified/thawed oocytes. These results suggest that further improvements in the technique are needed to provide protection to the *zona pellucida* and oolemma components, during exposure to VSs.

KEY WORDS: Bovine oocyte. Cryopreservation. Vitrification. Fertilization. Embryo development.

INTRODUCTION

The ability to cryopreserve bovine oocytes indefinitely for subsequent *in vitro* fertilization has several applications in cattle breeding and genetic selection, human medicine and biotechnology. In human medicine it could be beneficial to women before oncological treatment and for women who wish to postpone pregnancy. Apart from the mouse, where the rate of fertilization and embryo development is similar for fresh and frozen oocytes^{1,2}, cryopreservation of the mammalian oocyte still represents a challenging task for researchers around the world.

The two most common procedures used to cryopreserve the female gamete are the slow freezing and the vitrification techniques. In the slow freezing procedure, oocytes are gradually exposed to lower temperatures by means of a programmable machine which runs automatically at the required freezing speed. During vitrification, oocytes are exposed to very low temperatures almost immediately after being exposed to cryoprotectants and loaded into straws. In contrast to the situation in slow freezing procedures, the concentrated solutions of cryoprotectants necessary for vitrification impose toxic stress on mammalian oocytes during handling at temperatures above zero. Oocytes viability and fertilizability after vitrification are known to be influenced by the time of exposure to the cryoprotectant solutions at temperatures above zero^{3,4}.

The aim of the present study was to verify the feasibility of the vitrification technique using 6 M dimethylsulfoxide ^{2,5} for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocyte to assess the following end-points: (1) Recovery and survival after thawing; (2) Physiological viability parameters, such as fertilizability and developmental potential of vitrified-thawed bovine oocytes. The specific objectives were: (1) To compare the effects of different exposure times, 30 and 60 seconds, during vitrification on the same end-points mentioned before; (2) To compare the effects of exposure to DMSO solutions for 30 seconds with and without vitrification, on the same end-points mentioned before.

MATERIALS AND METHODS

Source and collection of oocytes

Ovaries were obtained from a local abattoir (Silva Slaughter House, Santa Maria, Brazil) and transported to the laboratory (Laboratory of Large Animals of the Veterinary Medicine Faculty, Federal University of Santa Maria, Brazil) in physiological saline solution (0.9% w/v NaCl) supplemented within 100 mg streptomycin and 50.000 IU G-penicillin, at room temperature within 2 h. The cumulus-oocyte complexes (COCs) in follicular fluid were aspirated from follicles 2-8 mm in diameter with a 25 x 7 gauge needle attached to a Nevon vacuum pump (pressure of 50 mm/Hg). Collected COCs were placed in a Petri dish being selected for *in vitro* maturation only those showing compact and dense cumulus cell layers.

In vitro maturation (IVM)

Selected COCs were washed three times in maturation medium (TCM 199, Cultilab, Campinas, SP, Brazil) supplemented with Hepes (5.95 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium pyruvate (0.025 mg/ml; Sigma), sodium bicarbonate (2.2 mg/ml;

Sigma), FSH (0.01 IU/ml; r-FSH, Serono, Italy), LH (0.5 µg/ml; Serono) and 10% estrous cow serum, at 25-30°C.

Groups of 20-30 COCs were placed in 400 µl of maturation medium under paraffin oil (Sigma) and kept for 18-22 h at 39°C, under 5% CO₂ in air.

Vitrification solutions

The stock vitrification solution (VS 111%) consisted of 6 M dimethylsulfoxide (DMSO; BDH Chemicals, Poole, UK) in Ham F-10 medium. This solution was kept in the fridge at 4°C until use. VS 100% was prepared by adding 2 ml of fetal calf serum (FCS; Cultilab) to 18 ml of VS 111%. Dilutions of VS 100% were prepared to give solutions VS 65% (3.9 M DMSO) and VS 25% (1.5 M DMSO). The 1 M sucrose solution was prepared by adding 1.71 g sucrose to 5 ml of Ham F-10 supplemented with 10% FCS.

Straw preparation

Plastic straws (Nutricell, Campinas, SP, Brazil) were prepared as follows: (1) the cotton wool plug was pushed 4 cm into the straw; (2) a 3 cm fraction of 1 M sucrose solution was introduced into the straw to wet the cotton wool plug; (3) a 1 cm fraction of VS 100% was introduced into the straw separated from the sucrose fraction by an air bubble.

Vitrification procedure

After maturation and removal of the excess of cumulus cells by vortexing, groups of 10 COCs were exposed to VS 25% at room temperature (~20°C) for 5 min, then transferred into a small volume of VS 25% into 1 ml of VS 65% and mixed thoroughly. The oocytes were pipetted in the minimum possible volume of VS 65% into the column of VS 100% in the straw. The straw was sealed with hematocrit putty and placed in the liquid nitrogen vapour for 3 min before plunging into LN₂. Straws were stored for periods ranging

from 4 h to 3 months. The procedures between placing COCs in the VS 65% and exposure to the vapour took no more than 60 s in the first experimental series and no more than 30 s in the second one.

Exposure to VSs without cryopreservation

Groups of 10 COCs were equilibrated in VS 25% for 5 min, pipetted in VS 65% and placed into the straws containing VS 100% as described above and sealed, but straws were not exposed to the vapour nor immersed in the liquid nitrogen. Passages through VS 65% and loading into straws took up to 30 s. Soon after sealing, the straws were processed as described below for the vitrified samples.

Warming and dilution of cryoprotectant:

Vitrified samples were warmed in air at room temperature ($\sim 20^{\circ}\text{C}$) for 10 s, then at $\sim 20^{\circ}\text{C}$ in a water bath for 10 s. The contents of each straw were expelled into 1 ml of 1M sucrose solution in a watch-glass, mixed gently and held for 5 min. Oocytes were transferred to 1 ml of fertilization medium (Fert-talp, ⁶), washed twice and maintained in 400 μl of fresh medium for 2 h before insemination.

In vitro fertilization (IVF)

Frozen semen samples were used for *in vitro* fertilization. Frozen semen was thawed in water bath at 39°C , for 10 s. 100 μl of each sample was pipetted underneath 1ml of Sperm-talp medium⁶ in a conical centrifuge tube maintained in water bath at $\sim 39^{\circ}\text{C}$, for 1 h. The supernatant was taken, placed in centrifuge tubes and centrifuged for 10 minutes. After removal of the supernatant, the pellet was resuspended using Sperm-talp medium so that to yield a sperm count of 1×10^6 spermatozoa/ml. For *in vitro* fertilization of fresh

oocytes, *in vitro* matured COCs were placed in 400 μ l of Fert-talp medium⁶, under oil and maintained at 39°C and 5% CO₂ in air, before insemination.

A 2 μ l aliquot of heparin, together with 50 μ l of sperm suspension were added to the medium containing the fresh or vitrified/thawed COCs. The system was maintained at 39°C for 18 to 22 h under 5% CO₂ in air.

Embryo culture

After IVF, excess of cumulus cells from COCs was removed by vortexing (1.5 min, 60% speed). The oocytes, fertilized or not, were washed twice and transferred into CR1 culture medium⁶ for subsequent assessment of fertilization and embryo development, at 39°C, under 5% CO₂. Fertilization rates were assessed as the number of 2-cell embryos present after 48 h of culture. Embryo culture was maintained up to day 7 to assess the frequency of morule and blastocyst formation.

Parthenogenetic activation

For evaluation of possible parthenogenetic activation during IVF, one group of fresh COCs was submitted to IVF using dead sperm and a second group of COCs was exposed to seminal fluid depleted of sperm cells.

Experimental Design

The present study was performed to assess the survival, fertilizability and developmental potential of bovine oocytes after vitrification in 6 M DMSO. There were also investigated the toxic effect of the vitrification solutions without exposure to the Liquid Nitrogen and the effect of the time of exposure to the vitrification solutions at room temperature before plunging the samples in Liquid Nitrogen. Bovine oocytes were matured *in vitro* and divided in six groups, including one control-group submitted to *in vitro*

fertilization without vitrification and 2 control-groups of oocytes submitted to parthenogenetic activation:

1. Control-group of bovine oocytes submitted to *in vitro* fertilization without vitrification. This group was composed of 462 bovine oocytes *in vitro* matured and retrieved after vortex, in 10 experimental repeats. Of that total, 452 were inseminated.
2. Group of bovine oocytes submitted to vitrification with exposure to vitrification solutions at room temperature for up to 60 seconds and subsequent *in vitro* fertilization. This group was composed of 111 bovine oocytes *in vitro* matured and retrieved after vortex in 3 experimental repeats. Of this total, 107 (96.3%) were exposed to the vitrification solutions at room temperature for up to 60 seconds and vitrified in Liquid Nitrogen at -196° C.
3. Group of bovine oocytes submitted to vitrification with exposure to vitrification solutions at room temperature for up to 30 seconds and subsequent *in vitro* fertilization. This group was composed of 506 bovine oocytes *in vitro* matured and retrieved after vortex in 7 experimental repeats. Of this total, 495 (97.8%) were exposed to the vitrification solutions at room temperature for up to 30 seconds and vitrified in Liquid Nitrogen at -196° C.
4. Group of bovine oocytes submitted to vitrification solutions at room temperature for up to 30 seconds without exposure to the Liquid Nitrogen and subsequent *in vitro* fertilization. This group was composed of 181 bovine oocytes *in vitro* matured and retrieved after vortex in 5 experimental repeats. All the oocytes were exposed to the vitrification solutions at room temperature for up to 30 seconds. Of this total number of oocytes, 137 (75.6%) were retrieved and inseminated.

5. Group of bovine oocytes exposed to seminal fluid depleted of spermatozoa to evaluate parthenogenetic activation. This group was composed of 41 oocytes submitted to in vitro fertilization in presence of seminal fluid depleted of spermatozoa in 2 experimental repeats.
6. Group of bovine oocytes exposed to seminal fluid bearing dead spermatozoa to evaluate parthenogenetic activation. This group was composed of 40 oocytes submitted to in vitro fertilization in presence of seminal fluid bearing dead spermatozoa in 2 experimental repeats.

Data Collection

The assessment of the variables in study was performed by light microscopy by the same observer with adequate practice, in all steps of the experiment.

Statistical Analysis and Sample Size

The feasibility of the study and sample size were evaluated after a pilot experiment. For a survival estimated proportion of 59% after vitrification and thawing, and 95% in the control-group up to 24 hours after fertilization, with power of 0.8 and alpha of 0.05, there would be necessary 25 oocytes in each group adding up to a total of 75 oocytes per experiment.

A total of 461 bovine ovaries were collected at oficial abbatoirs soon after slaughter in 10 visits. After transport in physiologic solution, follicles were aspirated and 2550 oocytes retrieved. Out of this total, after washing and selection according previosly defined criteria, 1341 (52.5%) were left for experiments

To evaluate the proportions between the percentages of the two groups of surviving oocytes after vitrification and thawing, in relation to the control-group submitted to IVF and in relation to the group exposed to the vitrification solutions without vitrification,

the Pearson's χ^2 -test was applied with a significance of 95%. Probabilities of $p < 0,01$ were considered statistically significant.

Ethical Aspects

The present study used ovaries obtained after the routine cow slaughter at official abattoirs, according to federal and state rulings. No animal was sacrificed specifically for the study. No living animal was submitted to any procedure during the experiments. The embryos generated after IVF were not transferred to recipient cows. The study was approved by the Ethical Committee in Research of the Clinicas Hospital in Porto Alegre, by resolution number 99229.

Period of the Study

The research was performed between December 1998 and December 1999.

Financial Support

The study was sponsored by a master scholarship granted to the first author by CAPES.

RESULTS

In vitro fertilization and embryonic development of fresh oocytes

The *in vitro* fertilization and embryonic development of 452 fresh control oocytes were determined in 10 experimental repeats. Most inseminated oocytes appeared morphologically viable 24 h post-insemination (94.6%). Fertilization rate assessed as the number of 2-cell embryos obtained 48 h post-insemination was 65.4%. Out of all 2-cell embryos obtained, 28.2% cleaved and reached the blastocyst stage in culture (Table 1).

Vitrification after 60 seconds exposure to VSs and IVF

The experiment was repeated three times. A total of 107 COCs were exposed to VS 65% and VS 100% for up to 60 s, at room temperature before exposure to vapour and immersion in liquid nitrogen. After thawing, 64 (59.8%) oocytes were retrieved and submitted to IVF. There was neither fertilization nor embryonic development. Morphological viability (color, membrane retraction and integrity) 24 hours post-insemination was not significantly different from controls ($p=0.089$) (Table 2).

Vitrification after 30 seconds exposure to VSs and IVF

This experimental group was created to evaluate the putative toxic effect of the prolonged exposure (60 s) to SVs at room temperature on COCs fertilizability after vitrification. The experiment was repeated seven times. A total of 495 oocytes were exposed to VS 65% and VS 100% for up to 30 s at room temperature, before exposure to vapour and immersion in LN₂. After thawing, 342 oocytes were retrieved (69%) and submitted to IVF. No oocyte was fertilized and there was no embryonic development. 24 h post-insemination, 319 oocytes (93%) looked morphologically normal.

There were no differences in viability 24 h post-insemination between the present group, those exposed to VSs ($p=0.293$) up to 60 s and controls ($p=0.493$) (Table 2).

Exposure to VSs for 30 seconds without vitrification and IVF

This experimental group was created to evaluate the possible deleterious effect of vitrification itself on COCs viability. The experiment was repeated five times. A total of 181 COCs were exposed for a maximum of 30 seconds to VS 65% and VS 100% at room temperature and immediately expelled in the 1M sucrose solution for removal of the cryoprotectant. 137 COCs were retrieved (75.6%) of which 116 (84.6%) were considered

morphologically normal 24 h post-insemination. There was no fertilization nor embryo development in all repeats.

The survival rate assessed 24 h post-insemination was significantly different between the present group and controls ($p < 0.001$) and between the present group and the vitrification group with exposure up to 30 s ($p = 0.006$). No significant difference was detected between this group and the vitrification group with exposure up to 60 s ($p = 0.293$) (Table 3).

Parthenogenetic activation assessment

Each parthenogenetic experiment was repeated twice using a total of 40 fresh COCs. No cleavage to the 2-cell stage was detected in either group of fresh oocytes submitted to IVF using dead sperm or seminal fluid depleted of spermatozoa.

DISCUSSION

Our results show that vitrification in 6 M DMSO is not a feasible technique for the cryopreservation of bovine oocytes. Fertilization and embryo development were not possible after vitrification or exposure to vitrification solutions without vitrification, in any of the experimental groups. The vitrification procedure employed in our study was chosen to cryopreserve bovine oocytes due to its excellent results on mouse and hamster oocytes^{2,5}. Large animals such as bovines, are good experimental models before human research. However, the same success was not achieved for the bovine, in view of the total failure of fertilization and embryo development after thawing or exposure to the vitrification solutions.

Overall, the recovery of oocytes with an apparently normal morphology in the present work was high and this observation lead us to suggest a deleterious effect on the zona pellucida or on the oolema that prevented normal fertilization to occur.

The failure of fertilization was commonly seen in the first experiments to cryopreserve mammalian oocytes and was associated with changes occurring in the zona pellucida^{2,7}. The problem was overcome in the mouse by adding fetal calf serum to the freezing/dilution media¹. In this study bovine oocytes were vitrified in medium containing 10% FCS, nevertheless fertilization was prevented. It may be that concentration of 10% FCS is insufficient to protect bovine zona during exposure, albeit briefly, to the high concentration of cryoprotectants. Alternatively, there may exist a variation in the components of FCS that is required to protect bovine oocytes. In their study, Wood and colleagues² noticed that when hamster oocytes were vitrified using a Chilean FCS, it was necessary to increase its concentration to 15% for as high survival rates as when using British FCS at a concentration of 5%.

Different strategies have been suggested to reduce the cytotoxic effect of the high concentrations of cryoprotectants needed for vitrification: (1) decrease the time of exposure to

the cryoprotectants at room temperature ⁸; (2) exposure at low temperatures only ⁹; (3) decrease the concentration of cryoprotectants or mix them with others of lower toxicity ^{9,10, 11}.

In the present study, one modification of the original procedure described by Wood and colleagues ² was attempted to revert the deleterious effect of the technique on fertilization, namely, we diminished the time of exposure to the VSs at room temperature before loading oocytes into the straws. In doing so, we aimed to reduce the potentially harmful effects of chemical toxicity caused by the DMSO at room temperature. However this modification yielded no improvement in the fertilization capacity of vitrified oocytes. Metallic grids, nylon grids, open straws were suggested to reduce time of exposure to vitrification solutions with good results in animal models and in humans, but they couldn't be applied in large scale ^{12, 13}.

Taken together our observations suggest that the total failure of fertilization was probably caused by structural changes in the zona due to modifications of the sperm receptor ZP2 to ZP2f during exposure to VSs as reported previously for the human and rabbit oocyte ^{13,14}. More recently, it has been reported that the cooling of *in vitro* matured bovine oocytes decreased the rates of oocytes that underwent fertilization and subsequent *in vitro* development, in part due to effects on the zona pellucida ^{15, 16}.

On the other hand, damage may have occurred in the plasma membrane and may perhaps be avoided by using a multi-step equilibration method as described by Kuwayama and colleagues ¹⁷ for the vitrification of bovine blastocysts. Their work showed that the cryopreservation of blastocysts following the 16-step equilibration method minimized the ultrastructural damage to the plasma membrane observed when the 2-step method was used. Chilling effects on membrane integrity of bovine oocytes could also be overcome by their pretreatment with butylated hydroxytoluene before exposure to lower temperatures ¹⁸.

No differences were observed in bovine oocytes vitrified in a vitrification solution containing cytochalasin D ¹⁹. Cryoprotectants such as DAP 213 induced microvilli and

mitochondria injury and caused premature release of the cortical granules²⁰. Recently, cytochalasin D was proposed as a protectant to microvilli without the same benefit mitochondria and no better results²¹. The vitrification solution with ethylene glycol enabled cleavage rates between 38% and 49%^{19, 22}.

Whatever the site of the injury, zona pellucida or plasma membrane, caused by the vitrification method employed here, an alternative way to assess oocyte viability would be to perform intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in the surviving oocytes, which has already been tried to human oocytes and resulted in live birth²³. We did not perform ICSI in the present study because of technical limitations, but it is our aim to introduce this technique in our future cryopreservation experiments.

In conclusion, vitrification of bovine oocytes using the 6 M DMSO technique as described for the mouse oocyte is not a valid procedure. Decreasing the time of exposure to VSs at room temperature did not overcome the deleterious effects of the technique on the fertilizability and embryo development of vitrified/thawed oocytes. However, modifications of the original technique may yield positive results for the bovine female gamete cryopreservation by vitrification.

REFERENCES

1. Carrol J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod* 1993;8:1163-1167.
2. Wood MJ, Barros C, Candy C J, Carrol J, Melendez J, Whittingham, DG. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulfoxide. *Biol Reprod* 1993;49:489-495.
3. Rall, WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.

4. Kono T, Kwon O Y, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology* 1991;28:50-54.
5. Bos-Mikich A, Wood MJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995;53:780-785.
6. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NI. *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up separated frozen-thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985;23:216.
7. Carrol J, Depypere H, Mathews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rate of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.
8. Arav A, Rubinski B, Fletcher G, Seren E. Cryogenic protection of oocytes with anti-freeze proteins. *Mol Reprod Dev* 1993;36:488-493.
9. Rall WF. Factors affecting the survival of vitrified mouse oocytes. *Cryobiology* 1987;24:387-402.
10. Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* 1986;7:270-273.
11. Dhali A, Manik RS, Das Sk, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 2000;53:1295-303.
12. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth Pj, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-8.
13. Wu J, Zhang L, Wang X. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001;121:389-93.
14. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res* 1987;16:343-354.

15. Vincent C, Turner K, Pickering SJ, Johnson MH. Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Mol Reprod Dev* 1991;28:394-404.
16. Azambuja RM, Kraemer DC, Westhusin ME. Effect of low temperatures on *in vitro* matures bovine oocytes. *Theriogenology* 1998;15:1155-1164.
17. Kuwayama M, Fujicawa S, Nagai T, Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology* 1994;31:415-422.
18. Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A. Kinetics and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 1999;38:35-42.
19. Vieira AD, Mezzalira A, Barbieri DP, LehmKuhl RC, Rubin MI, Vaj G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* 2002;45:91-4.
20. Fuku EJ, Liu J, Downey BR. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:177-85.
21. Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramian S, Lee HJ, Choe Sy. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002;63:464-70.
22. Lj X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyes A. Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology* 2002;58:1252-60.
23. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;14:3077-9.

TABLE 1- *In vitro* fertilization and embryo development of fresh bovine oocytes

	<i>In vitro</i> Matured	Inseminated	Viable after Insemination	Cleaved embryos	Day-7 Blastocysts
Number	462	452	428	280	79
%	-	-	94.6	65.4*	28.2# 18.4*

* % on the total of inseminated oocytes.

% on the total of cleaved embryos.

TABLE 2- Viability and *in vitro* fertilization of bovine oocytes after vitrification using two different periods of exposure to VSs

Period of exposure (seconds)	30	60
N° exposed to SVs	495	107
N° retrieved after vitrification	342 (69.1%)*	64 (59.8%)*
N° viable after Insemination	319 (93%)#	57 (89.1%)#
N° cleaved embryos	-	-

* % on the total of vitrified oocytes (p=0.493).

% on the total of retrieved oocytes after thawing (p=0.293).

TABLE 3- Viability and *in vitro* fertilization of bovine oocytes after exposure to SVs without vitrification.

	<i>In vitro</i> matured	Retrieved after exposure	Viable after insemination	Cleaved embryos
Number	181	137	116 [#]	-
%		75.6	84.6 [#]	-

[#] significant different between the present group and controls ($p < 0.001$) and between the present group and the vitrification group with exposure up to 30 s ($p = 0.006$).

6. ARTIGO EM PORTUGUÊS

Viabilidade e Fertilização *in vitro* de Oócitos Bovinos após Vitrificação em Solução 6 M de DMSO

Sérgio Galbinski, Adriana Bos-Mikich, Arnaldo Nicola Ferrari

Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência:

Sérgio Galbinski

Rua Quintino Bocaiúva, 1035, sala 201. Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90440-051

Fone/Fax: 55 51 33301200

E-mail: guga@orion.ufrgs.br

RESUMO

OBJETIVO. Avaliar a técnica de criopreservação por vitrificação em DMSO 6 M para oócitos bovinos maturados *in vitro* e os efeitos do tempo de exposição às soluções de vitrificação em temperatura ambiente.

MÉTODOS. Trata-se de um estudo experimental tipo coorte. Ovários de bovinos foram obtidos em frigorífico e transportados ao laboratório. Os complexos *cumulus*-oócito foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro. A partir da solução de vitrificação contendo DMSO 6 M (SV 100%), foram preparadas soluções a 25% e 65%. Oócitos foram maturados *in vitro* por 18-22 horas. Para vitrificação, os oócitos foram colocados em SV 25%, a t.a. por 5 minutos, transferidos à SV 65%, pipetados em SV 100% para palhetas e estocados em nitrogênio líquido. No primeiro grupo experimental, a exposição à SV 65% tomou até 60 segundos, no segundo grupo, não ultrapassou 30 segundos. Para descongelamento, as palhetas foram expostas ao ar por 10 segundos, colocadas banho-maria por 10 segundos e seu conteúdo expelido e mantido em solução de sacarose por 5 minutos. No terceiro grupo, os oócitos passaram por todas SV, foram envasados, mas não vitrificados. Todos os oócitos recuperados foram inseminados. Para controle, oócitos frescos, maturados *in vitro*, foram inseminados.

RESULTADOS. Após vitrificação, 69,1% e 59,8% dos oócitos foram recuperados nos grupos de 30 segundos e 60 segundos, respectivamente e, 24 horas após inseminação, 93% e 89,1% deles pareceram morfológicamente normais, respectivamente. No grupo de oócitos expostos às SV sem vitrificação, 75,6% foram recuperados, sendo 84,6% destes viáveis 24 horas após inseminação. Não ocorreu fertilização nos grupos experimentais. Entre os controles frescos, 65,4% dos oócitos foram fertilizados.

CONCLUSÕES. A técnica de vitrificação utilizando DMSO 6 M não é aplicável para a criopreservação de oócitos bovinos maturados *in vitro*. A redução do tempo de exposição

às SV, não superou o efeito deletério sobre a capacidade fertilizadora dos oócitos. Estes resultados sugerem que aprimoramentos da técnica são necessários para proteção da zona pelúcida e do oolema.

UNITERMOS: Oócitos bovinos. Criopreservação. Vitricificação. Fertilização. Desenvolvimento embrionário.

SUMMARY

BACKGROUND. The ability to cryopreserve bovine oocytes indefinitely for subsequent *in vitro* fertilization has several applications in human medicine and biotechnology. The objective of this study was to verify the feasibility of the vitrification technique using 6 M DMSO to cryopreserve *in vitro* matured bovine oocytes, and to assess the effects of the prolonged exposure to the vitrification solutions at room temperature.

METHODS. The stock vitrification solution (VS 100%) consisted of 6 M DMSO. Dilutions of VS were prepared to give solutions 25% and 65% DMSO. Bovine oocytes were *in vitro* matured for 18-22 h. Matured oocytes were placed first 25% VS, at room temperature for 5 min, then transferred to 65% VS, before being pipetted into the 100% VS in plastic straws. Three experimental groups were formed: in the first group time of pipetting through 65% VS and loading the straw took up to 60 s, in the second group did not exceed 30 s. For thawing, straws were held in air for 10 s and then in water bath for 10 s. The contents of each straw were expelled in 1 ml of 1M Su solution at r.t. and held for 5 min. In the third experimental group, oocytes went through all VSs as described above, placed in straws, but not vitrified. All oocytes retrieved were inseminated. For control, fresh, *in vitro* matured oocytes were inseminated under the same conditions.

RESULTS. After vitrification, 69.1% and 59.8% of the oocytes were retrieved in the 30 s and 60 s groups, respectively. 93% and 89% of these oocytes appeared morphologically

normal 24 h after insemination, respectively. In the group of oocytes exposed to VSs without vitrification, 75.6% were retrieved and 84.7% were morphologically viable, 24 h post-insemination. No fertilization and embryonic development was observed in any of the experimental groups. Among controls, 65.4% of the oocytes were fertilized and 28.2% of them reached the blastocyst stage by day-7 of culture.

CONCLUSIONS. The vitrification technique using 6 M DMSO is not a feasible approach to cryopreserve *in vitro* matured bovine oocytes. Decreasing the time of exposure to the SVs at room temperature did not overcome the deleterious effects of the procedure on the fertilizability and embryonic development of vitrified/thawed oocytes. These results suggest that further improvements in the technique are needed to provide protection to the *zona pellucida* and oolemma components, during exposure to VSs.

KEY WORDS: Bovine oocyte. Cryopreservation. Vitrification. Fertilization. Embryo development.

INTRODUÇÃO

A capacidade de criopreservar oócitos bovinos indefinidamente, para subsequente fertilização *in vitro*, tem importantes aplicações na seleção e aprimoramento genético do gado, na medicina humana e em biotecnologia. Em medicina humana, o desenvolvimento de técnica viável de criopreservação de oócitos poderá beneficiar pacientes previamente a tratamento oncológico, portadoras doenças genéticas e que necessitem adiar a gestação por outros motivos. Com exceção do camundongo, onde a criopreservação de oócitos atingiu níveis de sucesso semelhantes aos obtidos em oócitos frescos, em termos de fertilização e posterior desenvolvimento embrionário^{1,2}, o congelamento bem sucedido do gameta feminino de espécies mamíferas ainda representa um desafio para os pesquisadores.

As duas formas mais comuns de criopreservação do gameta feminino são o congelamento lento e a vitrificação. No congelamento lento, os oócitos são gradativamente expostos a temperaturas cada vez mais baixas, a partir do uso de um aparelho programável que realiza automaticamente a velocidade de resfriamento requerida. Na vitrificação, os gametas são expostos a temperaturas muito baixas quase imediatamente após seu contato com a solução crioprotetora e depositados em palhetas. Ao contrário do que ocorre quando utilizado o congelamento lento, as soluções concentradas de crioprotetores, necessárias para a vitrificação são bastante tóxicas para os gametas durante a manipulação a temperaturas acima de zero. A viabilidade e a capacidade do gameta ser fertilizado após vitrificação são diretamente influenciadas pelo período e temperatura de manipulação dos oócitos a temperaturas acima de zero ^{3,4}.

O objetivo deste trabalho foi verificar a aplicabilidade da técnica de vitrificação utilizando uma solução 6 M de crioprotetor dimetil sulfóxido (DMSO)^{2,5}, para a criopreservação de uma coorte de oócitos bovinos maturados *in vitro* para os seguintes desfechos: (1) Recuperação e sobrevivência após o descongelamento; (2) Parâmetros de viabilidade fisiológica, tais como a fecundidade e o potencial de desenvolvimento. Os objetivos específicos foram: (1) Comparar o tempo exposição às soluções de DMSO por 30 ou 60 segundos, para os mesmos desfechos; (2) Comparar os efeitos da exposição às soluções de DMSO sem vitrificação, com as técnicas de vitrificação, para os mesmos desfechos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e coleta dos oócitos

Ovários foram obtidos em frigorífico local (Frigorífico Silva, Santa Maria) e transportados ao laboratório (Laboratório de Grandes Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria) em solução fisiológica salina acrescida de 100 mg de estreptomicina (Sigma, St. Louis , MO, USA) e 50.000 IU de penicilina G-potássica (Sigma) à temperatura ambiente, no período máximo de 2 horas.

Os complexos *cumulus*-oócito (CCO) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, com uma bomba de vácuo Nevoni sob pressão de 50 mm/Hg, acoplada a uma agulha de 25 x 7 G. Todos os CCO foram coletados em placas de Petri, sendo selecionados para maturação *in vitro* somente aqueles com abundantes e compactas camadas de células do *cumulus*.

Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCO selecionados foram lavados três vezes em meio de maturação (TCM-199, Cultilab, Campinas,SP) acrescido de Hepes (5,95 mg/ml; Sigma), piruvato de sódio (0,025 mg/ml; Sigma), bicarbonato de sódio (2,2 mg/ml; Sigma), hormônio folículo-estimulante recombinante (r-FSH; 0,01 UI/ml; Serono, Itália), hormônio luteinizante (LH; 0,5 µg/ml; Serono) e 10% de soro de vaca em estro preparado no próprio laboratório, à temperatura de 25 a 30°C. Grupos de 20 a 30 CCO foram depositados em gotas de 400 µl de meio de maturação em placas de cultura, cobertas de óleo mineral (Sigma) a 39°C, em atmosfera de 5% CO₂, por períodos entre 18 e 22 horas.

Solução de Vitriificação

A solução de vitriificação de estoque (SV 111%) consistiu de dimetilssulfóxido (DMSO) 6 M em meio Ham F-10. Esta solução foi mantida em geladeira a 4°C até o uso. A SV 100% foi preparada a partir da adição de 2 ml de soro fetal bovino (SFB; Cultilab,

Campinas) a 18 ml de SV 111%. Diluições da SV 100% foram preparadas de modo a resultar em SV 65% (3,9 M de DMSO) e em SV 25% (1,5 M de DMSO). A solução de sacarose 1 M foi preparada pela adição de 1,71 g de Sacarose (Sigma) em 5ml de meio Ham F-10 acrescido de 10% de SFB.

Preparo das palhetas

As palhetas plásticas de 0,25 ml foram preparadas da seguinte maneira: (1) O tampão de algodão foi rebaixado cerca de 4 cm no interior da palheta de 0,25 ml (Nutricell, Campinas, Brasil). (2) Uma coluna de 3cm da solução de sacarose 1 M foi depositada na palheta molhando o tampão. (3) Uma fração de 1 cm de SV 100% foi depositada na palheta, permanecendo isolada da gota de sacarose por uma bolha de ar.

Vitrificação

Após maturação e remoção do excesso de células do *cumulus* com uso de *vortex* com 60% de velocidade, durante 1 minuto, grupos de 10 COC foram expostos à SV 25%, à temperatura ambiente por 5 minutos e então transferidos para 1 ml da solução SV 65%, com um mínimo volume da SV 25% e misturados completamente. Os CCO foram transferidos com um mínimo volume de SV 65% para a coluna de SV 100% dentro da palheta. Esta foi selada com massa de hematócrito e exposta ao vapor de nitrogênio líquido por 3 minutos antes de ser imersa. As palhetas foram armazenadas por períodos que variaram de 4 horas a 3 meses. Os procedimentos de colocação dos CCO em SV 65% e de exposição ao vapor de nitrogênio líquido demoraram até 60 segundos na primeira série experimental e até 30 segundos na segunda série experimental.

Exposição às SV sem congelamento

Grupos de 10 CCO foram equilibrados na SV 25% por 5 minutos, lavados em SV 65% e colocados nas palhetas contendo SV 100%, as quais foram seladas e manipuladas como descrito acima, mas sem exposição ao vapor e imersão no nitrogênio líquido. Todo o processo entre a SV 65% e a SV 100% não ultrapassou 30 segundos de duração. Logo a seguir, as palhetas foram descarregadas em solução de sacarose e processadas para remoção do crioprotetor, conforme descrito abaixo para as amostras vitrificadas.

Descongelamento e remoção do DMSO

As amostras vitrificadas foram reaquecidas por exposição à temperatura ambiente (em torno de 20°C) por 10 segundos e transferidas para banho-maria a 25°C por 10 segundos. Os conteúdos de cada palheta foram expelidos em um vidro de relógio contendo 1 ml de solução de sacarose 1 M à temperatura ambiente, misturados e, neste local, mantidos por 5 minutos em sacarose. Os oócitos foram transferidos para 1 ml de meio de fertilização (Fert-talp⁶), lavados duas vezes e mantidos em 400 µl deste meio por 2 horas antes da inseminação.

Fertilização *in vitro* (FIV)

Amostras de sêmen congelado foram utilizadas para fertilização *in vitro*. O sêmen congelado foi descongelado em banho-maria a 39°C, por 10 segundos. Foram depositados 100 µl de cada amostra sob 1 ml de meio Sperm-talp⁶ em tubos cônicos que foram colocados em banho-maria a 39°C por 1 hora. O sobrenadante foi então transferido para tubos de centrífuga e centrifugado por 10 minutos. Após remoção do sobrenadante, o *pellet* foi recolocado em meio Sperm-talp de maneira a obter-se uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml.

Para fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos, CCO maturados *in vitro* foram colocados em 400 µl do meio Fert-talp⁶, sob óleo e mantidos à 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ até

o momento da inseminação. Foram adicionados 2 μ l de heparina e 50 μ l de suspensão de esperma à gota contendo ambos grupos de CCO, frescos e vitrificados/descongelados. O sistema foi mantido em atmosfera de CO₂, a 39^oC, por 18 a 22 horas.

Cultivo embrionário

Após a FIV, o excesso de células do *cumulus* dos CCO foi removido por Vórtex com 60% de velocidade durante 1,5 minuto. Os oócitos, fecundados ou não, foram lavados duas vezes e transferidos para meio de cultivo embrionário CR1⁶, em atmosfera de 5% de CO₂, a 39^oC. A avaliação após 24 horas considerou viáveis os oócitos que não apresentavam retração e/ou granulação, que apresentavam membrana íntegra e sem escurecimento. Eles foram cultivados por 48 horas, para posterior avaliação da taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário. As taxas de fertilização foram calculadas como o número de embriões de 2 células presentes após 48 horas de cultivo. A cultura embrionária procedeu até o 7^o dia para constatação da frequência de mórulas e blastocistos.

Avaliação da ativação partenogênica

Para avaliação de possível ativação partenogênica dos oócitos durante a FIV, um grupo de COC frescos foi exposto a fluido seminal com espermatozóides mortos e outro grupo foi exposto a fluido seminal sem espermatozóides.

Delineamento

O experimento foi realizado para avaliar a sobrevivência morfológica conforme característica da zona pelúcida, retração e coloração do oócito, o potencial de fertilização e o desenvolvimento embrionário a partir de uma coorte de oócitos bovinos após vitrificação em solução 6 M de DMSO. Também foram investigados os efeitos de

toxicidade das soluções de vitrificação, sem que houvesse exposição ao nitrogênio líquido e o efeito do tempo de exposição às soluções de vitrificação à temperatura ambiente, antes de mergulhar o material em nitrogênio líquido. Oócitos bovinos foram maturados *in vitro* e divididos em 6 grupos, incluindo o grupo-controle de oócitos submetidos a fertilização *in vitro* sem vitrificação e os 2 grupos-controle de oócitos submetidos a ativação partenogênica:

1. Grupo-controle de oócitos bovinos submetidos a fertilização *in vitro* sem vitrificação. Este grupo foi composto por 462 oócitos bovinos maturados *in vitro* e recuperados após vórtex em 10 repetições do experimento, destes, 452 foram inseminados.
2. Grupo de oócitos bovinos submetidos a vitrificação, com exposição às soluções de vitrificação à temperatura ambiente por 60 segundos e posterior fertilização *in vitro*. Este grupo foi composto por 111 oócitos bovinos maturados e recuperados após vórtex em 3 repetições do experimento. Destes, 107 (96,3%) foram expostos às soluções de vitrificação e vitrificados em nitrogênio líquido a -196°C .
3. Grupo de oócitos bovinos submetidos à vitrificação, com exposição às soluções de vitrificação à temperatura ambiente por 30 segundos e posterior fertilização *in vitro*. Este grupo foi composto por 506 oócitos bovinos maturados *in vitro* e recuperados após vórtex em 7 repetições do experimento. Destes, 495 (97,8%) foram expostos às soluções de vitrificação e vitrificados em nitrogênio líquido a -196°C .
4. Grupo de oócitos bovinos expostos às soluções de vitrificação à temperatura ambiente por até 30 segundos, sem imersão em nitrogênio líquido e com posterior fertilização *in vitro*. Este grupo foi composto por 181 oócitos bovinos maturados e recuperados após vórtex em 5 repetições do experimento. Todos

foram expostos às soluções de vitrificação. Destes, 137 (75,6%) foram recuperados e inseminados.

5. Grupo-controle de oócitos bovinos expostos a líquido seminal sem espermatozóides para avaliação da ativação partenogênica. Neste grupo, um total de 41 oócitos, em 2 repetições do experimento, foram expostos a líquido seminal sem espermatozóides.
6. Grupo-controle de oócitos bovinos expostos a líquido seminal com espermatozóides mortos para avaliação da ativação partenogênica. Neste grupo, um total de 40 oócitos, em 2 repetições do experimento, foram expostos a líquido seminal com espermatozóides mortos.

Coleta dos dados

A mensuração das variáveis em estudo foi realizada em estereomicroscópio pelo mesmo pesquisador, com treinamento adequado, em todas as etapas do experimento.

Análise estatística e tamanho amostral

A viabilidade do estudo e o tamanho da amostra foram avaliados após execução de um experimento piloto. Para uma proporção estimada de 59% de sobrevivência após vitrificação e descongelamento e de 95% no grupo-controle até 24 horas após a fertilização, com poder de 0,8 e α 0,05, seriam necessários 25 oócitos em cada grupo, perfazendo um total de 75 oócitos por experimento.

Foram coletados 461 ovários bovinos em frigoríficos oficiais logo após o abate num total de 10 coletas. Após transporte em solução fisiológica, os folículos foram puncionados, obtendo-se 2550 oócitos, dos quais, após lavagem e seleção, conforme critérios definidos previamente, 1341 (52,5%) foram selecionados para o experimento.

Para avaliar as proporções entre as percentagens dos dois grupos de óocitos sobreviventes à vitrificação e descongelamento, em relação ao grupo-controle submetido à FIV e em relação ao grupo somente exposto às soluções de vitrificação sem imersão em nitrogênio líquido, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado de Pearson, com significância de 95%. As probabilidades de $p < 0,01$ foram consideradas estatisticamente significativas.

Aspectos éticos

O presente trabalho utilizou ovários obtidos a partir do abate regular de vacas em frigoríficos oficiais, de acordo com as normas estaduais e federais. Nenhum animal foi sacrificado especificamente para a realização do experimento. Nenhum animal vivo foi submetido a qualquer tipo de procedimento durante a realização do estudo. Os embriões obtidos por fertilização *in vitro* não foram transferidos para fêmeas receptoras. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela resolução número 99229.

Tempo de Realização da Pesquisa

A pesquisa foi realizada durante o período de dezembro de 1997 até dezembro de 1999.

Fonte de Financiamento

O presente trabalho foi custeado por bolsa de mestrado conferida ao primeiro autor pela CAPES

RESULTADOS

Grupo-controle de fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos frescos

A fertilização *in vitro* e o desenvolvimento embrionário de 452 oócitos frescos foram determinados neste experimento (Tabela 1). A maioria (94,6%) dos oócitos inseminados foram considerados morfológicamente normais 24 horas após inseminação. A taxa de fertilização avaliada como o número de embriões que atingiram o estágio de 2 células 48 horas após inseminação foi de 65,4%. Dos embriões obtidos, 28,2% evoluíram ao estágio de blastocisto até o sétimo dia.

Grupo de oócitos bovinos submetidos a vitrificação após exposição às SV por 60 segundos e posterior FIV

Um total de 107 CCO foram expostos às SV 65% e 100% por 60 segundos à temperatura ambiente, antes da exposição ao vapor e imersão no nitrogênio líquido. Após descongelamento, 64 oócitos (59,8%) foram recuperados e submetidos à inseminação. Não ocorreu fertilização nem desenvolvimento embrionário neste grupo. A viabilidade morfológica, 24 horas pós-inseminação, não diferiu significativamente daquela do grupo-controle ($p=0,089$) (Tabela 2).

Grupo de oócitos bovinos submetidos a vitrificação após exposição às SV por 30 segundos e posterior FIV

Um total de 495 CCO foram expostos às SV 65% e 100% por 30 segundos, à temperatura ambiente, antes de serem expostos ao vapor e imersos no nitrogênio líquido. Após descongelamento foram recuperados 342 oócitos (69,1%), os quais foram submetidos à FIV. Vinte e quatro horas após inseminação, 319 (93%) pareceram morfológicamente normais. Não foi detectada clivagem 48 horas após inseminação. Não houve diferença significativa entre a taxa de sobrevivência do presente grupo e a taxa do

grupo exposto às SV por até 60 segundos ($p=0,293$), assim como em relação ao grupo controle ($p=0,493$) (Tabela 2).

Grupo de oócitos bovinos expostos às SV por até 30 segundos, sem vitrificação e posterior FIV

Um total de 181 CCO foram expostos por até 30 segundos às SV 65% e 100%, à temperatura ambiente e imediatamente expelidos na solução 1 M de sacarose para remoção do crioprotetor. Destes, 137 (75,6%) foram recuperados após a exposição, dos quais 116 (84,6%) foram considerados morfológicamente normais 24 horas após a inseminação. Não ocorreu fertilização nem desenvolvimento embrionário neste grupo. A taxa de sobrevivência, analisada 24 horas após inseminação, foi significativamente diferente entre o presente grupo e os controles ($p<0,001$), assim como em relação ao grupo de exposição até 30 segundos ($p=0,006$). Não houve diferença significativa nas taxas de viabilidade deste grupo e o grupo com exposição até 60 segundos ($p=0,293$) (Tabela 3).

Grupos-controle de avaliação da ativação partenogênica

Cada experimento de partenogênese utilizou um total de 40 CCO frescos, não tendo sido detectada qualquer clivagem.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a vitrificação em DMSO 6 M não é uma técnica apropriada para a criopreservação de oócitos bovinos. A fertilização e o desenvolvimento embrionário não foram possíveis após vitrificação ou exposição às soluções de vitrificação em quaisquer dos grupos experimentais.

O processo de vitrificação empregado em nosso estudo foi escolhido para criopreservar oócitos bovinos por seus excelentes resultados com oócitos de camundongo e de hamster^{2,5}. Os bovinos, por serem grandes mamíferos são modelos animais mais próximos dos humanos. Entretanto, o mesmo sucesso não foi atingido para a espécie bovina, devido à total ausência de fertilização e de desenvolvimento embrionário após descongelamento ou exposição às soluções de vitrificação.

De uma forma geral, a recuperação de oócitos com uma morfologia aparentemente normal, neste trabalho, foi elevada, e esta observação nos leva a sugerir um efeito deletério na zona pelúcida ou no oolema, que impediu a fertilização. O problema da falha de fertilização foi bastante observado nos primeiros experimentos de criopreservação de oócitos mamíferos e foi associado a alterações que ocorrem na zona pelúcida^{2,7}. O problema foi superado no camundongo pela adição de soro fetal bovino (SFB) aos meios de congelamento e de diluição¹. Neste estudo, oócitos bovinos foram vitrificados em meio contendo 10% de SFB, entretanto, houve falha permanente da fertilização. Talvez, a concentração de 10% de SFB seja insuficiente para proteger a zona pelúcida dos oócitos bovinos durante a exposição, apesar de breve, às altas concentrações de crioprotetores. Alternativamente, podem ocorrer variações dos componentes do SFB que são necessários para proteger os oócitos bovinos. Em seu estudo, Wood e colegas² notaram que, quando os oócitos de hamster eram vitrificados utilizando SFB chileno, era necessário aumentar sua concentração a 15%, de maneira a obterem-se taxas de sobrevivência semelhantes àsquelas quando se utilizava o SFB inglês na concentração de 5%.

Diferentes estratégias têm sido sugeridas para diminuir o efeito citotóxico das altas concentrações de crioprotetores necessárias para vitrificação: (1) diminuir o tempo de exposição aos crioprotetores necessário para vitrificação⁸; (2) exposição apenas a baixas

temperaturas⁹; (3) diminuição da concentração de crioprotetores ou mistura deles com outros de toxicidade mais baixa^{9,10,11}.

No presente estudo, uma modificação do procedimento original de Wood e colegas² foi pesquisada para reverter o efeito deletério na fertilização. Foi experimentada uma redução no tempo de exposição às SV à temperatura ambiente, antes de colocar os oócitos nas palhetas. Com isto, nós procuramos diminuir os efeitos potencialmente deletérios da toxicidade química causada pelo DMSO à temperatura ambiente. Entretanto, esta modificação não levou à qualquer melhora na capacidade dos oócitos vitrificados serem fertilizados após o descongelamento. Algumas técnicas para redução do tempo de exposição utilizando grids metálicos, de nylon ou palhetas abertas obtiveram algum sucesso, inclusive em oócitos humanos, mas são pouco viáveis para utilização em larga escala^{12,13}.

Consideradas em conjunto, nossas observações sugerem que a falha total da fertilização foi provavelmente causada por modificações estruturais na zona pelúcida devido a alterações aos receptores de espermatozóide ZP2 e ZP2f, durante a exposição às SVs, conforme já foi relatado anteriormente para o oócito humano e de coelho^{13,14}. Mais recentemente, foi relatado que o resfriamento de oócitos bovinos maturados *in vitro* diminuiria as taxas de oócitos fertilizados e o desenvolvimento embrionário *in vitro* posterior, parcialmente devido a defeitos na zona pelúcida^{15,16}.

Por outro lado, podem ter ocorrido danos à membrana plasmática, os quais poderiam, talvez, ser evitados pelo emprego de um método de equilíbrio em múltiplas etapas, conforme descrito por Kuwayama e colegas¹⁷, para a vitrificação de blastocistos bovinos. O trabalho daqueles autores demonstrou que a criopreservação de blastocistos, conforme o método de equilíbrio em 16 etapas, diminui os danos ultraestruturais à membrana plasmática observados quando o método de duas etapas é empregado. Os efeitos do resfriamento na integridade da membrana dos oócitos bovinos também

puderam ser superados pelo seu tratamento com hidróxi-tolueno butilado antes da exposição à temperaturas mais baixas¹⁸.

A adição de citocalazina D à solução de vitrificação não melhorou os resultados¹⁹. Crioprotetores como DAP 213 induziram alterações nos microtúbulos e nas mitocôndrias, causando liberação precoce dos grânulos corticais e ausência de clivagem²⁰. Recentemente foi proposto que a citocalazina D poderia proteger os microtúbulos, mas sem proteção à mitocôndria e sem melhora significativa dos resultados²¹. A técnica de vitrificação com uma solução que inclui o crioprotetor etilenoglicol a 20% tem resultado em taxas de clivagem de 38% a 49%, o que aparentemente é promissor^{19, 22}.

Qualquer que seja o local do dano, na zona pelúcida ou na membrana plasmática, causado pelo método de vitrificação aqui empregado, uma alternativa para avaliar-se a viabilidade do oócito seria a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) nos oócitos sobreviventes a exposição às soluções de vitrificação e ao congelamento, o que já foi realizado inclusive para oócitos humanos, com nascimento-vivo²³. Nós não executamos ICSI no presente estudo devido a limitações técnicas, mas é nosso objetivo introduzir esta técnica em nossos futuros experimentos de criopreservação.

Em conclusão, a vitrificação de oócitos bovinos utilizando a solução de DMSO 6 M, conforme descrita para o oócito murino, não é um procedimento válido. A diminuição no tempo de exposição às SV à temperatura ambiente não superou os efeitos deletérios causados pela técnica na capacidade dos oócitos vitrificados e descongelados serem fertilizados e no seu desenvolvimento embrionário. Entretanto, modificações da técnica original podem levar a resultados positivos para a criopreservação do gameta feminino bovino por vitrificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carrol J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. *Biol Reprod* 1993;8:1163-1167.
2. Wood MJ, Barros C, Candy C J, Carrol J, Melendez J, Whittingham, DG. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulfoxide. *Biol Reprod* 1993;49:489-495.
3. Rall, WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
4. Kono T, Kwon O Y, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. *Cryobiology* 1991;28:50-54.
5. Bos-Mikich A, Wood MJ, Whittingham DG. Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995;53:780-785.
6. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NI. *In vitro* fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swim-up separated frozen-thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985;23:216.
7. Carrol J, Depypere H, Mathews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rate of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.
8. Arav A, Rubinski B, Fletcher G, Seren E. Cryogenic protection of oocytes with anti-freeze proteins. *Mol Reprod Dev* 1993;36:488-493.
9. Rall WF. Factors affecting the survival of vitrified mouse oocytes. *Cryobiology* 1987;24:387-402.
10. Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* 1986;7:270-273.
11. Dhali A, Manik RS, Das Sk, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 2000;53:1295-303.

12. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth Pj, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-8.
13. Wu J, Zhang L, Wang X. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 2001;121:389-93.
14. Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res* 1987;16:343-354.
15. Vincent C, Turner K, Pickering SJ, Johnson MH. Zona pellucida modifications in the mouse in the absence of oocyte activation. *Mol Reprod Dev* 1991;28:394-404.
16. Azambuja RM, Kraemer DC, Westhusin ME. Effect of low temperatures on *in vitro* matures bovine oocytes. *Theriogenology* 1998;15:1155-1164.
17. Kuwayama M, Fujicawa S, Nagai T, Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology* 1994;31:415-422.
18. Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A. Kinetics and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 1999;38:35-42.
19. Vieira AD, Mezzalira A, Barbieri DP, LehmKuhl RC, Rubin MI, Vaj G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology* 2002;45:91-4.
20. Fuku EJ, Liu J, Downey BR. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:177-85.
21. Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramian S, Lee HJ, Choe Sy. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002;63:464-70.

22. Lj X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyes A. Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology* 2002;58:1252-60.
23. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;14:3077-9.

Tabela 1- Resultados da fertilização *in vitro* e desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos frescos.

	Oócitos Maturados	Oócitos Inseminados	Oócitos Viáveis Pós-Inseminação	Embriões Clivados	Blastocistos (7^o dia)
Número	462	452	428	280	79
%	-	-	94,6	65,4 ¹	28,2 ² 18,4 ¹

¹ % sobre o total de oócitos inseminados.

² % sobre o número de embriões obtidos.

Tabela 2- Resultados de viabilidade e fertilização *in vitro* após vitrificação de oócitos bovinos utilizando diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação.

Tempo de Exposição (segundos)	30	60
Nº de Oócitos Expostos às SV	495	107
Nº de Oócitos Recuperados Pós-vitrificação	342 (69,1%) ¹	64 (59,8%) ¹
Nº de Oócitos Viáveis Pós-Inseminação	319 (93%) ²	57 (89,1%) ²
Nº de Embriões Clivados	-	-

¹ % sobre o número total de oócitos vitrificados. (p=0,493)

² % sobre o número de oócitos recuperados pós-descongelamento. (p=0,293)

Tabela 3- Resultados de viabilidade e fertilização *in vitro* de oócitos após exposição às soluções de vitrificação, sem vitrificação.

	Maturados	Recuperados	Viáveis Pós-	Embriões
		Pós-Exposição	Inseminação	Clivados
Número	181	137	116 ¹	-
%		75,6	84,6 ¹	-

¹ significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,001$) e em relação ao grupo de oócitos vitrificados com exposição às soluções de vitrificação por até 30 segundos ($p = 0,006$)