

FLAVIA TUANY RODRIGUES DE LIMA

Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*.

BRASÍLIA-DF

AGOSTO 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

FLAVIA TUANY RODRIGUES DE LIMA

**Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e
produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open
Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ORIENTADORA: ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA

BRASÍLIA-DF
AGOSTO 2012

Lima, F. T. R.

Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*. Flavia Tuany Rodrigues de Lima; Orientação de Alzira Amélia Martins Rosa e Silva- Brasília- 2008 66p.: il

Dissertação de mestrado (M) –Universidade de Brasília/ Faculdade de medicina, 2012.

1. Vitrificação 2. Ovócitos 3. Produção Embrionária. I. Rosa e Silva AAM. II.

FICHA CATALOGRÁFICA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lima. F. T. R. Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2012, 66p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Flavia Tuany Rodrigues de Lima

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*.

GRAU: Mestre

Ano: 2012

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Flavia Tuany Rodrigues de Lima
CPF: 006.047.911-60
Endereço: Condomínio Vivendas Bela Vista Mód. G cs. 41 - Grande Colorado
CEP: 73105-909- Sobradinho- Distrito Federal/DF
Tel: (61) 8232-5473 E-mail: flaviatuany@gmail.com

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

FLAVIA TUANY RODRIGUES DE LIMA

Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em *Open Pulled Straw (OPS)* e *Cryotop*.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS.

APROVADA POR:

ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA UnB
(ORIENTADORA)

DR. PAULO SERGIO FRANÇA - UNB
(EXAMINADOR INTERNO)

DR. FERNANDO ARARIPE TORRES - UNB

(EXAMINADOR INTERNO)

Brasília/ DF 10 de agosto de 2012

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadora pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Dedico a vocês estes anos de trabalho, pois vocês foram o suporte sem o qual não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que participaram dessa caminhada e que mesmo sem saber me ajudaram e ensinaram a superar os meus limites.

Em especial:

Inicialmente agradeço a Deus.

Agradeço especialmente à minha vózinha, Antônia (Dada), que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso.

Agradeço à minha mãe, Maria Lucia, que muitas vezes renunciou seus sonhos em favor dos meus, ofereço esta nova conquista em reconhecimento aos seus esforços.

Agradeço ao meu irmão, Rodrigo, por toda sua ajuda, conhecimentos em informática e muita paciência.

Agradeço ao meu padrasto, Dalci, pelo apoio.

Agradeço também ao Tio Zé e à Tia Uraide que sempre se interessaram em saber como andava a minha caminhada.

De modo geral, é preciso destacar o afeto, solidariedade e compreensão dos parentes e, portanto agradeço a todos os meus familiares.

Agradeço com um carinho especial à Professora Alzira, pela oportunidade, suporte e orientação durante a realização deste trabalho, além de todo incentivo e exemplo profissional.

À equipe e companheiros do laboratório de Biotecnologia da Reprodução da UNB Brasília-DF (Ingrid, Camila, Gustavo, Danielle, Isabela e estagiários), obrigada pelo convívio e colaboração.

À UnB, FAPDF, PRONEX e CAPES por proporcionarem a realização deste trabalho.

No processo inquietador de elaboração de uma dissertação, colegas e amigos terminam sempre por serem envolvidos. Aos amigos, Claudia Tsukada, Kallyne Santos, Lorena Carvalho, Marcus Passarinho, Tereza Mota, Vinicius Veloso, Kamila Karrijo, Naiá karrijo, Alessandra Tavora, Mônica Guanabara, Felipe Oliveira e Stephanie de Jong, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

À Tia Doraci, pelo cafezinho das tardes passadas trabalhando no projeto.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, por toda atenção dispensada.

Aos docentes com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho.

Ao namorado lindo, pela paciência e apoio durante os dias em que teve que dar espaço a saudade para que eu pudesse realizar este trabalho.

Obrigada a todos, com muito carinho.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AI	: Anáfase
ATV	: Ativado
CAn	: Cromatina Anormal
CO₂	: Dióxido de carbono
CCO	: Complexos <i>cummulus oophorus</i>
CIV	: Cultivo <i>in vitro</i>
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DV1	: Solução de desvitrificação 1 - <i>cryotop</i>
DV2	: Solução de desvitrificação 2 - <i>cryotop</i>
DV3	: Solução de desvitrificação 3 - <i>cryotop</i>
D7	: sétimo dia de cultivo.
D8	: Oitavo dia de cultivo.
EG	: Etilenoglicol
Fig.	: Figura
FIV	: Fecundação <i>in vitro</i>
FMT	: Fusos Multidirecionais
FSH	: Hormônio folículo estimulante
GVBD	: Rompimento da vesícula germinativa
h	: Horas
IGF	: insulin-like growth factor
LH	: Hormônio luteinizante
M	: Molar
mg	: Miligrama
MI	: Metáfase I
MII	: Metáfase II
MIV	: Maturação <i>in vitro</i>
min.	: Minutos
mL	: Mililitro

mm	: milímetro
N₂L	: Nitrogênio líquido
OPS	: Open Pulled Straw
PBS	: Tampão fosfato salino
PI	: Prófase I
PIV	: Produção <i>in vitro</i>
P < 0,05	: Probabilidade menor que 5%
P > 0,05	: Probabilidade maior que 5%
RNA	: ácido ribonucleico
SD1	: Solução de desvitrificação 1 - OPS
SD2	: Solução de desvitrificação 2 - OPS
sec. (s)	: segundos
SFB	: Soro fetal bovino
SM	: Solução de manutenção
SV1	: Solução de vitrificação 1 - OPS
SV2	: Solução de vitrificação 2 - OPS
TCM	: <i>Tissue culture medium</i>
TE	: Transferência de Embriões
TI	: Telófase I
VG	: Vesícula germinativa
VI1	: Solução de vitrificação 1 - <i>cryotop</i>
VI2	: Solução de vitrificação 2 - <i>cryotop</i>
µg	: Micrograma
µl	: Microlitro
°C	: graus Celsius

Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em open pulled straw (ops) e *cryotop*.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar as crioinjúrias causadas pelo processo de vitrificação utilizando dois diferentes dispositivos de congelamento (*OPS* e *Cryotop*) de ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro*. Um novo protocolo de congelamento foi testado e avaliado pela capacidade pós-vitrificação do ovócito atingir o estágio de metáfase II e produzir embriões *in vitro*. Os resultados obtidos mostram que ovócitos bovinos imaturos vitrificados pelo *Cryotop* apresentam maiores taxas do que os maturados *in vitro*. Os ovócitos utilizados foram obtidos de ovários de vacas mestiças em abatedouros. Os complexos cúmulus *oophorus* (*CCO*) foram aspirados e selecionados de folículos entre 2mm e 8mm. Os *CCOs* foram colocados em gotas de meio coberto com óleo mineral e mantidos em estufa de cultivo a 39°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa por até 24hs. Os *CCOs* selecionados foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos. A vitrificação foi realizada conforme protocolo descrito por Vajta et al. (1998), em que se utilizam duas soluções de vitrificação e uma palheta especial denominada *OPS* (open pulled straw). E o processo de vitrificação dos ovócitos por *Cryotop* foi realizada de acordo com um novo protocolo de vitrificação proposto a partir de mudanças testadas na rotina do laboratório de biotecnologia da reprodução da UNB. Após a vitrificação dos ovócitos, iniciou-se o processo de desvitrificação dos ovócitos e a seguir retornaram ao cultivo até completarem 24horas. Após a maturação, alguns dos ovócitos foram pelo desnudados e fixados em etanol e ácido acético por 48h. A seguir foram corados pelo corante lacmóide (SIGMA®). Para determinação do estágio da meiose, os ovócitos foram observados em microscópio de contraste de fase (Olympus®) em aumento de 1000x. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração nuclear em vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI) e metáfase II (MII). Os demais ovócitos seguiram para a fecundação e cultivo *in vitro* e os achados do grupo controle positivo (não vitrificados), apresentaram maior taxa de maturidade do que os ovócitos imaturos vitrificados por *OPS*. Em contrapartida foi

verificado taxas semelhantes de maturidade (MII) entre o controle + e os grupos *Cryotop* imaturos e maduros assim como o grupo de *CCOs* maduros vitrificados por *OPS*. Quanto à produção embrionária, Para todas as variáveis estudadas, as taxas para os ovócitos vitrificados foram significativamente menores do que as do grupo-controle ($P < 0,05$), com exceção do grupo de ovócitos imaturos vitrificados por *cryotop* que apresentou taxas semelhantes. Os ovócitos imaturos vitrificados com o *Cryotop* (15,1%), quando comparados aos demais grupos de ovócitos vitrificados, apresentaram as maiores taxas embrionárias. Os ovócitos vitrificados com *Cryotop* apresentaram maiores taxas de clivagem e blastocisto quando comparado ao método *OPS*. Os resultados deste estudo mostraram a superioridade do dispositivo *Cryotop* para vitrificação de ovócitos bovinos imaturos com o novo protocolo proposto em relação à produção *in vitro* de embriões bovinos. Indicando que a combinação dos crioprotetores, os tempos de equilíbrio ou até mesmo os procedimentos de vitrificação realizados foram mais eficazes na preservação da integridade dos ovócitos do que os já descritos na literatura, os quais não encontraram tal eficiência na produção de embriões a partir de ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* vitrificados com uso dos mesmos crioprotetores e hastes.

Palavras-chave: Bovino, Embrião, Vitrificação, Open Pulled Straw, *Cryotop*.

Evaluation of the cryoinjury in immature and *in vitro* matured oocytes, by embryo production from bovine oocytes vitrified with open pulled straw (*OPS*) and *Cryotop*.

ABSTRACT

The aim of this study, was to evaluate the cryoinjuries caused by the vitrification process using two different freezing devices (*Cryotop* and *OPS*) of immature and *in vitro* matured bovine oocytes. A new freezing protocol was tested and evaluated by the ability of the oocyte after vitrification to reach the metaphase II stage and produce *in vitro* embryos. The results showed that immature bovine oocytes vitrified by *Cryotop* have higher rates than those matured *in vitro*. The oocytes used were obtained from ovaries of crossbred cows in slaughterhouses. The cumulus oophorus (*CCO*) were aspirated and selected of follicles from 2mm to 8mm. *CCOs* were placed on drops of 200ul of medium covered with mineral oil and maintained in an incubator at 39 ° C in 5% of CO₂ and 95% of relative humidity for up to 24h. The *CCOs* selected were randomly distributed into different groups. Vitrification protocol was performed as described by Vajta et al. (1998), which were used two vitrification solutions and a special pick called *OPS* (open pulled straw). The oocytes vitrification process by *Cryotop* was performed according to a new vitrification protocol proposed by changes tested in the routine of reproductive biotechnology lab at UNB. After oocyte vitrification, the process of devitrification of oocytes was done and then returned to culture until they reached 24 hours. After maturation, some oocytes were denuded and fixed in ethanol and acetic acid for 48 hours. The sections were stained by lacmóide (SIGMA ®). To determine the stage of meiosis, the oocytes were observed by phase-contrast microscope (Olympus ®) increased by 1000x. The oocytes were classified according to the nuclear configuration of germinal vesicle (GV), metaphase I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI) and metaphase II (MII) . The rest of oocytes went to fertilization and *in vitro* culture . The findings of positive control group (non-vitrified) showed greater maturation than the immature oocytes vitrified by *OPS*. However was found similar rates of maturation (MII) between positive control and *Cryotop* groups immature and mature as well. The embryo production, of all variables studied, the rates for vitrified oocytes was significantly lower than the control group (P<0,05), except for the immature oocytes group vitrified by *cryotop* which showed similar rates. The immature

oocytes vitrified with *Cryotop* (15.1%) when compared to other groups of vitrified oocytes showed the highest embryonic rates. The vitrified oocytes with *Cryotop* showed higher rates of cleavage and blastocyst when compared with the *OPS*. The results of this study showed the superiority of *Cryotop* device for vitrification of immature bovine oocytes with a new proposed protocol for the production of *in vitro* bovine embryos. Indicating that the combination of cryoprotectants, the equilibration times or even the vitrification procedures performed were more effective in preserving the integrity of the oocyte than those already described in the literature, that did not found such efficient production of embryos from immature bovine oocytes *in vitro* matured and vitrified using the same cryoprotectants and stems.

Keywords: Bovine, Embryo, Vitritfication, Open Pulled Straw, *Cryotop*.

SUMÁRIO

O índice está vazio porque nenhum dos estilos de parágrafo selecionados no Inspetor de Documento está sendo usado no documento.

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1</u> - Taxas encontradas de acordo com a fase da maturação nuclear, a partir de ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> , vitrificados pelo método de <i>OPS</i> e <i>Cryotop</i> e não vitrificados (controles).....	28
<u>Tabela 2</u> - Taxas encontradas de acordo com as anormalidades da maturação nuclear, a partir de ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> , vitrificados pelo método de <i>OPS</i> e <i>Cryotop</i> e não vitrificados (controles).....	29
<u>Tabela 3</u> - taxa de clivagem e produção embrionária em D7 e D8, a partir de ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> , vitrificados pelo método de <i>OPS</i> e <i>Cryotop</i> e não vitrificados (controles).....	31

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1</u> - <i>Open Pulled Straw (OPS)</i>	7
<u>Figura 2</u> - Esquema temporal.....	12
<u>Figura 3</u> - Preparo da placa para vitrificação de ovócitos bovinos pelo método <i>OPS</i>	15
<u>Figura 4</u> - Processo de vitrificação de ovócitos bovinos pelo método <i>OPS</i>	16
<u>Figura 5</u> - Preparo da placa para desvitrificação de ovócitos bovinos pelo método <i>OPS</i>	17
<u>Figura 6</u> - Processo de desvitrificação de ovócitos bovinos pelo método <i>OPS</i>	18
<u>Figura 7</u> - Esquematização do VITRI-EQUIP (compartimento 1 e 2).....	19
<u>Figura 8</u> - Esquematização do processo de vitrificação por <i>Cryotop</i>	19
<u>Figura 9</u> - Desenho da haste para vitrificação pelo método <i>Cryotop</i>	20
<u>Figura 10</u> - Processo onde a haste é mergulhada rapidamente em nitrogênio líquido.....	20
<u>Figura 11</u> - desvitrificação pelo método <i>Cryotop</i>	21
<u>Figura 12</u> - Classificação da meiose de ovócitos bovinos corados por lacmóide.....	22

<u>Figura 13 - Ovócito em vesícula germinativa</u>	24
<u>Figura 14 - Ovócito em pré-metáfase I</u>	24
<u>Figura 15 - Ovócito em metáfase I</u>	24
<u>Figura 16 - Ovócito em anáfase I</u>	24
<u>Figura 17 - Ovócito em telófase I</u>	24
<u>Figura 18 - Ovócito em metáfase II com corpúsculo polar</u>	24
<u>Figura 19 - Ovócito ativado (pró-núcleo)</u>	25
<u>Figura 20 - Ovócito com cromatina atípica</u>	25
<u>Figura 21 - Ovócito com fusos multidirecionais</u>	26
<u>Figura 22 - Resultados em gráfico das clivagens a partir dos CCOs Imaturos e Maduros, Vitricados por <i>Cryotop</i> e <i>OPS</i></u>	32
<u>Figura 23 - Resultados em gráfico da produção embrionária a partir dos CCOs Imaturos e Maduros, Vitricados por <i>Cryotop</i> e <i>OPS</i></u>	33

1 INTRODUÇÃO

A reprodução tanto humana quanto animal tem passado nos últimos anos por uma enorme evolução, incluindo de forma substancial os avanços das biotécnicas reprodutivas. No Brasil como em outros países, há um constante crescimento de interesse e opinião pública atenta para a quantidade de novas possibilidades que surgem todos os dias, como técnicas de reprodução assistida.

Neste contexto o Brasil desponta como um país ávido por novas possibilidades de crescimento da produção animal assim como a multiplicação de animais de elevado mérito genético. Há alguns anos a punção *in vivo* de ovócitos e a produção *in vitro* de embriões bovinos é desenvolvida em vários laboratórios no país. Entretanto, um dos grandes entraves na utilização da produção *in vitro* é a necessidade de vinculação de um laboratório de fecundação *in vitro* próximo ao local de coleta, ou ainda a construção desta infraestrutura dentro da propriedade, o que eleva muito os custos da tecnologia, limitando seu uso. Após coletado o ovócito conserva sua eficiência por um período limitado se não for exposto a um ambiente controlado. A possibilidade de criopreservação imediata do ovócito tornaria o processo mais flexível e acessível, dando impulso a mais este recurso da reprodução. Além disto, seria possível a comercialização de ovócitos de fêmeas de elevado valor genético, abrindo-se assim mais um mercado potencial.

Além do setor de produção animal, a possibilidade de criopreservar ovócitos é fundamental para a formação de bancos de material genético. Essa tecnologia é indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção, e para que possam ser trabalhadas e regeneradas, é fundamental que sejam recuperáveis não somente os espermatozoides, que hoje são criopreservados com sucesso, mas também os ovócitos. A diversidade genética e as diversas características que compõem uma espécie, só seriam plenamente reconstituídas com a contribuição tanto da fêmea quanto do macho. Além do banco de sêmen que já é uma realidade, é fundamental desenvolver tecnologias para melhor criopreservar ovócitos e embriões, para tornar a FIV uma técnica de excelência. (BRANDÃO, 2002)

Pesquisas com a criopreservação de ovócitos bovinos têm sido importantes para a utilização comercial das biotécnicas reprodutivas que visam à seleção e aprimoramento genético do rebanho (GALBINSKI et al., 2003).

Vários estudos científicos sobre o uso das técnicas de criopreservação estão sendo realizados, com o propósito de formar bancos de gametas femininos que poderão ser utilizados em pesquisas ou aplicações comerciais. Em condições naturais, uma vaca com elevado valor genético pode gerar seis a oito crias em toda a sua vida. Com a superovulação podem ser obtidos até 60 bezerros do mesmo animal num período de 12 meses, por meio da transferência dos embriões para fêmeas receptoras (barrigas de aluguel). Já a retirada e congelamento de ovócitos por vitrificação permitem a produção de até 100 bezerros em um ano. (MEZZALIRA, 2003). Além da reprodução animal, a criopreservação de ovócitos tende a minimizar um dos grandes problemas de reprodução assistida em seres humanos que, por questão ética, é impedida de descartar embriões sobressalentes gerados nos programas de superovulação feminina, cada vez mais utilizado. Isto obriga a manutenção de grandes estoques de embriões que se tornaram um problema em diversos laboratórios em todo o mundo.

Os problemas éticos são maiores quando se congela embriões, pois a rigor já são novos seres humanos que foram formados, devendo ser tratados e respeitados como tal. Os embriões não podem ser descartados ou destruídos, o que acarreta em situações mais graves quando abandonados na clínica.

O congelamento de embriões é um procedimento mais complexo, pois exige a superovulação da mulher através de medicamentos, a realização da captação dos óvulos e da fecundação *in vitro*. Os embriões têm ainda de ser cultivados antes de serem congelados.

A partir do primeiro relato do nascimento de animais normais oriundos de ovócitos criopreservados de camundongos (WHITTINGHAM, D. G. , LEIBO, S.P. and MAZUR, P., 1972), diversas outras espécies começaram a ser testadas. No entanto, a redução da temperatura, em qualquer grau, afeta de forma muito mais drástica o ovócito bovino e outros animais domésticos, em relação ao de outras espécies de mamíferos (ARAV et al., 1996).

Desta forma, novas pesquisas de criobiologia são fundamentais para proporcionar maior sobrevivência de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criobiologia

De uma maneira geral, o bom protocolo de congelamento celular é aquele que propicia a estabilidade das reações cruzadas entre as moléculas no ambiente intracelular e que também permita a sobrevivência celular após o descongelamento. (THOMAZ et al., 2005). Durante o congelamento e o descongelamento podem ocorrer injúrias letais ou subletais nas células (COTICCHIO et al., 2004). Essas injúrias ocorrem em decorrência das numerosas situações estressantes as quais as células são submetidas nestes procedimentos, incluindo a formação intra e extracelular de gelo, desidratação não controlada, formação de bolhas de gás e aumentos na viscosidade e concentração iônica dos meios (SHAW et al., 2000).

Dentre os métodos de criopreservação de ovócitos, a vitrificação é a de uso mais recente. Esse método refere-se ao processo pelo qual uma solução concentrada de crioprotetores se solidifica durante o resfriamento, sem formar cristais. Esse processo é determinado pela extrema elevação da viscosidade e rápidas taxas de resfriamento e aquecimento. A vitrificação tem como desvantagem o seu efeito tóxico, pois consiste no uso de elevada concentração de crioprotetores na solução (PUGH et al., 2000). Da mesma forma, a duração do tempo de equilíbrio em que os ovócitos são expostos aos crioprotetores também é de importância crítica. Rápidas taxas de resfriamento reduzem a toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula a temperaturas críticas através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e -5°C.(VAJTA and KUWAYAMA, 2006).

Algumas estratégias, tais como redução do volume de solução de vitrificação (volume mínimo $\leq 1\mu\text{L}$) e contato direto com nitrogênio líquido, ajudam a obter altas taxas necessárias de refrigeração/ aquecimento (YAVIN and ARAV, 2007). Para alcançar estas rápidas taxas de resfriamento, diversas técnicas e protocolos que utilizam pequenos volumes de solução de vitrificação foram desenvolvidas e vêm sendo utilizados para criopreservação de ovócitos nos últimos anos. Eles diferem quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, número de passos

para equilíbrio do ovócito ao meio, técnica de criopreservação, material utilizado, tempo de exposição e número de passos para descongelação. (COBO et al., 2008).

Certas condições de resfriamento e exposição das células aos crioprotetores podem induzir à instabilidade dos fusos meióticos, provocando segregação anormal dos cromossomos na retomada da meiose com a fecundação, podendo causar anormalidades cromossômicas (SHAW et al., 2000).

Vários pesquisadores admitem que o estágio de vesícula germinal (ovócito imaturo) é mais sensível à criopreservação que qualquer outro estágio nuclear (FUKU et al., 1995; HOCHI et al., 1998; LUNA et al., 2001).

A tecnologia de *Cryotop* permite o carregamento de oócitos ou embriões com o mínimo contato direto da solução de vitrificação (~ 0.1µL) ao nitrogênio líquido, o que resulta em uma taxa de resfriamento extremamente alta (>23.000°C/min.). A partir daí, as temperaturas de zona de perigo (15°C a -5°C), que são causas de danos pelo frio são facilmente ignoradas. Além disso, a minimização da solução de vitrificação em torno da amostra facilita alcançar as taxas de aquecimento extremamente elevadas (>42.000°C/min.), o que foi encontrado na literatura, é que é mais importante ser rápido o suficiente na desvitrificação durante o momento do aquecimento (ISACHENKO et al., 2005). *Cryotop* tem mostrado melhores resultados em relação ao *OPS* para a vitrificação de oócitos imaturos de porca (LIU et al., 2008), humana (KUWAYAMA et al., 2005b), e oócitos bovinos maturados (MORATO et al., 2008), mas ainda há uma lacuna de informação para a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos usando diferentes dispositivos de congelamento.

Durante os últimos anos diversas técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Concomitante a isto, a aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores têm sido utilizadas (MORATO et al., 2008). Desde a primeira publicação realizada (RALL and FAHY., 1985) utilizando soluções com 6,5M de DMSO e propilenoglicol, inúmeras soluções de vitrificação vêm sendo estudadas utilizando várias combinações de crioprotetores (KASAI et al., 2004; PALASZ and MAPLETOFT, 1996; VAJTA, 2000). A maioria das soluções de vitrificação contém um crioprotetor, diversos sais e uma ou mais macromoléculas (SHAW et al., 1997).

Para alcançar estas rápidas taxas de resfriamento, diversas técnicas e protocolos que utilizam pequenos volumes de solução de vitrificação foram desenvolvidos e vêm sendo

utilizados para criopreservação de ovócitos nos últimos anos. Eles diferem quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, número de passos para equilíbrio do ovócito ao meio, técnica de criopreservação, material utilizado, tempo de exposição e número de passos para descongelamento (COBO et al., 2008).

2.1.1 *Open Pulled Straw (OPS)*

A técnica denominada *Open Pulled Straw (OPS)* foi desenvolvida originalmente para embriões bovinos por Vajta et al. (1997). As palhetas de *OPS* foram desenvolvidas através das palhetas francesas de 0,25mL, sendo os tampões de algodão removidos e estas amolecidas por aquecimento em sua região central. Manualmente, as palhetas foram esticadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede diminuíssem para aproximadamente metade do tamanho original. Posteriormente foram resfriadas ao ar e cortadas na extremidade estreita. Aproximadamente 2 μ L do meio de vitrificação contendo o ovócito é introduzido na extremidade estreita da palheta através do efeito capilar simples. A extremidade contendo o ovócito é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução (VAJTA et al., 1998).

A taxa de resfriamento é aumentada em oito vezes quando comparada as palhetas francesas de 0,25mL, sendo acima de 20.000°C/min. (VAJTA et al., 1998). Estas taxas de resfriamento são alcançadas devido à redução do volume das soluções e a diminuição da espessura da parede da palheta (0,07mm). Dessa forma, os altos padrões de resfriamento e aquecimento resultam em diminuição das crioinjúrias.

Adicionalmente, com o uso das palhetas de *OPS* (figura 1) é possível alcançar a vitrificação da solução utilizando uma menor concentração de crioprotetor, juntamente com o rápido resfriamento, minimizando as injúrias tóxicas e osmóticas (VAJTA et al., 1998). Entretanto, o método *OPS* possui uma desvantagem, pois o meio contendo os ovócitos fica em contato direto com o nitrogênio líquido, aumentando o risco de contaminação. Alguns autores desenvolveram técnicas para selar as palhetas de *OPS*, com algodão e álcool polivinílico (LÓPEZ-BÉJAR & LÓPEZ-GATIUS, 2002).



Figura 1- *Open Pulled Straw (OPS)*.

2.1.2 *Cryotop*

A diminuição do volume da solução de vitrificação para apenas 1 μ l,

utilizando-se sistemas de capacidade para volume mínimo, aumenta a velocidade de condução da temperatura. Uma grande variedade destes dispositivos são encontrados na literatura, (MARTINO et al., 1996), (VAJTA et al., 1998), (LANE et al., 1999), (CHEN et al., 2001), (MATSUMOTO et al., 2001), (LIEBERMANN et al., 2002), (ISACHENKO et al., 2003) (GASPARRINI et al., 2007) e têm sido aplicado com variados graus de sucesso em várias espécies de mamíferos, incluindo bovinos. Mas a mais recente abordagem para o volume mínimo é, o *Cryotop* (Kitazato Supply Co. Fujinomiya, Japão) desenhado por Kuwayama. A melhor vantagem deste dispositivo é que ovócitos são carregados em um volume muito pequeno (~1.0ul) e, portanto, uma taxa extremamente rápida de resfriamento é alcançada (23.000°C/min.). Outra vantagem desse método é que a concentração de crioprotetores é reduzida para 30% (junto com 1M de sacarose) minimizando eventuais efeitos potencialmente tóxicos (KUWAYAMA et al., 2005).

Aplicando esta tecnologia em ovócitos humanos, foi encontrada por Kuwayama em 2005 uma taxa de sobrevivência de 91%, 81% de taxa de clivagem, blastocistos em uma taxa de 50% e 41% com uma taxa de prenhes por transferência de embriões foram atingidos, resultando em 11 nascidos vivos.

Outros grupos têm publicado suas experiências com o método *cryotop* em seres humanos. Katayama et al. tem relatado excelente taxas de sobrevivência, taxas de fecundação e clivagem de 91% e 90%, respectivamente. (KATAYAMA et al., 2003)

Ruvalcaba e colaboradores (2005) relataram 90,1% de sobrevivência pós-descongelamento e utilizam o método *Cryotop*.

Lucena relatou taxas de sobrevivência fertilização e gestação de 89%, 87% e 57%, respectivamente, com 117 recém-nascidos. (LUCENA et al., 2006)

Cryotop é atualmente um dos mais eficientes métodos de vitrificação disponível, e representa a melhor alternativa confiável para a criação de bancos de ovócitos para humanos. E vem sendo relatada com sucesso sua utilização em ovócitos de éguas imaturos e maturados *in vitro* (BOGLIOLO et al., 2007), ovócitos de ovelhas e búfalos, (SUCCU et al., 2007) (GASPARRINI et al., 2007), zigotos de coelhos (HOCHI et al., 2004), e embriões suínos produzidos *in vitro* (USHIJIMA et al., 2003), assim como embriões de vacas (77% de sobrevivência pós-descongelamento) e búfalos (LAOWTAMMATHRON et al., 2005).

No Brasil, o Dr. Almodinem, em 2006, desenvolveu o VITRI-INGÁ, técnica que aperfeiçoa a vitrificação de ovócitos. Porém, quando lançado no mercado, o método foi dado como laborioso e seus usuários passaram em sua maioria a utilizar as hastes do VITRI-INGÁ com seus respectivos meios, mas depositando os ovócitos ao longo da haste como no primeiro método de *Cryotop* descrito. É, pois, considerado o VITRI-INGÁ uma variação do método de *Cryotop*.

Esses estudos têm fornecido informações sobre a sobrevivência, e capacidade de desenvolvimento, assim como alterações estruturais sofridos pelos ovócitos vitrificados por *Cryotop* (MORATÓ et al., 2008).

Apesar da variedade de resultados, a vitrificação é uma técnica de criopreservação promissora na reprodução assistida, sendo um procedimento simples, menos oneroso e que requer um menor tempo despendido (DOBRINSKY, 2002).

2.2 Maturação ovocitária

Durante todo o período do desenvolvimento, desde a formação e crescimento dos ovócitos e dos folículos, até após o período de dominância folicular, os ovócitos bovinos permanecem em estágio de prófase da primeira meiose. *In vivo*, o reinício da meiose ocorre com o surgimento do pico pré-ovulatório de LH (hormônio luteinizante) e se dá somente nos ovócitos inteiramente crescidos e meioticamente competentes dos folículos pré-ovulatórios (FAIR, 2003; RODRIGUEZ e FARIN, 2004).

Os ovócitos têm uma estreita relação com as multicamadas de células do cúmulus que os cercam, mantendo uma importante via de comunicação através das junções comunicantes (gap), antes e durante o pico pré-ovulatório de LH (RODRIGUEZ e FARIN, 2004; GILCHRIST et al., 2004). Logo após o pico de LH, começa a ocorrer o desaparecimento dessas vias de comunicação entre o ovócito e as células do cúmulus (HYTTEL et al., 2000).

A progressão do ciclo celular do ovócito até o estágio de metáfase da segunda meiose (metáfase II), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é marcada por uma série de transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma do ovócito, eventos esses que caracterizam a maturação ovocitária (DE SOUSA et al., 2004).

2.2.1 *Maturação nuclear*

A diferenciação do ovócito imaturo em maturo envolve uma série de alterações que são estimuladas principalmente por hormônios gonadotópicos (MERTON et al., 2003). Sob a influência dos hormônios, o ovócito recomeça seu ciclo celular progredindo da prófase da primeira meiose (prófase I), passando pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I (termino da primeira divisão meiótica) e progredindo até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (MENEICKE et al., 2001). No intervalo que compreende os estágios de prófase I a metáfase II, os cromossomos condensam e o envelope nuclear é desfeito marcando o início da maturação nuclear (MENEICKE et al., 2001; JONES, 2004). Dando sequência, os cromossomos homólogos são divididos em dois grupos, com a metade do número original de cromossomos. Ao término da primeira divisão meiótica o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de tamanhos diferentes: uma pequena chamada de corpúsculo polar e outra grande, o ovócito secundário. Ao término da maturação nuclear o ovócito permanece nesse estágio do ciclo celular (metáfase II) até a fecundação (MAYES and SIRARD, 2001).

A correta ocorrência desta sequência de eventos é muito importante, pois a habilidade do ovócito em ser fecundado e desenvolver normalmente, depende tanto da maturação nuclear quanto da maturação citoplasmática (HURT et al., 2000). O ovócito somente completará a meiose se for fecundado pelo espermatozóide (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.2.2 *Maturação Citoplasmática*

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

Durante seu desenvolvimento, o oócito aumenta o diâmetro de $<30\mu\text{m}$ (foliculo primordial) para mais de $120\mu\text{m}$ (foliculo terciário). Este aumento em tamanho é acompanhado por acúmulo de mRNA, proteínas, substratos e nutrientes, os quais são pré-requisitos para o oócito se tornar competente (SIRARD et al, 2006). Competência oocitária, portanto, inclui todos os eventos que introduzem ao oócito próximo a ovulação, a capacidade de completar a maturação nuclear, ser fertilizado e iniciar a embriogênese para um desenvolvimento fetal normal (GANDOLFI and GANDOLFI, 2001; SIRARD et al, 2006).

As modificações ultraestruturais que ocorrem durante o processo de maturação são de extrema importância para o oócito assegurar sua competência para o desenvolvimento. Após o pico de LH, há a quebra da vesícula germinativa, o oócito em MII apresenta os grânulos corticais alinhados com a membrana plasmática, as gotas de lipídeos e as mitocôndrias adquirem uma posição mais central no ooplasma, deixando uma zona periférica sem organelas, na qual a principal característica é a presença de grumos de retículo endoplasmático liso. O espaço perivitelínico se desenvolve para evitar a poliespermia, e o complexo de Golgi praticamente desaparece (ASSEY et al, 1994; DIEZ et al, 2005). Outro parâmetro morfológico que avalia a maturação citoplasmática é a expansão das células do cúmulus.

Um aspecto a ser considerado na criopreservação de ovócitos imaturos é a falta de sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática, fato este verificado por Hurtt et al. (2000) e Luvoni & Pellizzari (2000). A maturação nuclear completa não é suficiente para garantir a qualidade do oócito para ser fecundado e promover o crescimento de um embrião. A maturação citoplasmática também deve ser concluída. Enquanto a maturação nuclear consiste principalmente na segregação dos cromossomos, a maturação citoplasmática envolve

a reorganização de organelas e armazenamento de RNAs mensageiros, proteínas e fatores de transcrição, que atuam durante os processos de maturação, fecundação e início da embriogênese (FERREIRA et al., 2009).

A análise microscópica de óocitos maturados *in vitro* mostra que as células do cúmulus se expandem, o citoplasma é morfológicamente normal, e uma grande quantidade de vesículas digestivas é observada (DIEZ et al, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência de um novo protocolo proposto para o método de vitrificação *cryotop* utilizando o equipamento brasileiro VITRI-INGÁ (ingámed®), comparando-o com o método *OPS*, na criopreservação de ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro*.

3.2 ESPECÍFICOS

1- Avaliar as crioinjúrias causadas à cromatina do ovócito vitrificado imaturo e maturado *in vitro* através da coloração com lacmóide a análise em microscópio de contraste de fase (Olympus®) em aumento de 1000x.

2- Avaliar o potencial de produção de embriões dos ovócitos criopreservados tanto imaturos como maturados *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental.

Primeiramente foi realizado um pré-experimento onde ovócitos foram vitrificados em diferentes tempos de equilíbrio para vitrificação e então desnudados, fixados e corados com lacmóide para a determinação da cinética nuclear, durante a maturação *in vitro*. A partir desta cinética, foram selecionados os protocolos de interesse para o experimento. O delineamento experimental se seguiu de acordo com o esquema temporal mostrado na figura 2 onde todos os *CCOs* foram rastreados e selecionados ao mesmo tempo e em seguida foram divididos em 5 gotas (C+: controle positivo; C-0h: controle negativo imaturo; V0h: Vitrificados imaturos; V24h: Vitrificados maduros e C-24h: controle negativo maduro). Em sequência, os grupos C+, C- 24h e V24h foram diretamente para estufa e o grupo C-0h permaneceu na bancada em placa aquecedora a 37°C enquanto o grupo V0h era vitrificado e desvitrificado, após essa etapa os dois grupos foram para a estufa para concluir a maturação juntamente com os outros grupos. Ao completar 23 horas de maturação o grupo V24h passou pelo mesmo processo de vitrificação e desvitrificação enquanto o grupo C-24h aguardava em placa aquecedora. Então, os *CCOs* retornaram à estufa onde estabilizaram por mais 1 hora e em seguida alguns foram designados para a fixação em solução de ácido acético e etanol, para posterior coloração em lacmóide e avaliação da maturação nuclear e o restante dos *CCOs* foram submetidos à fertilização *in vitro* e posterior classificação embrionária.

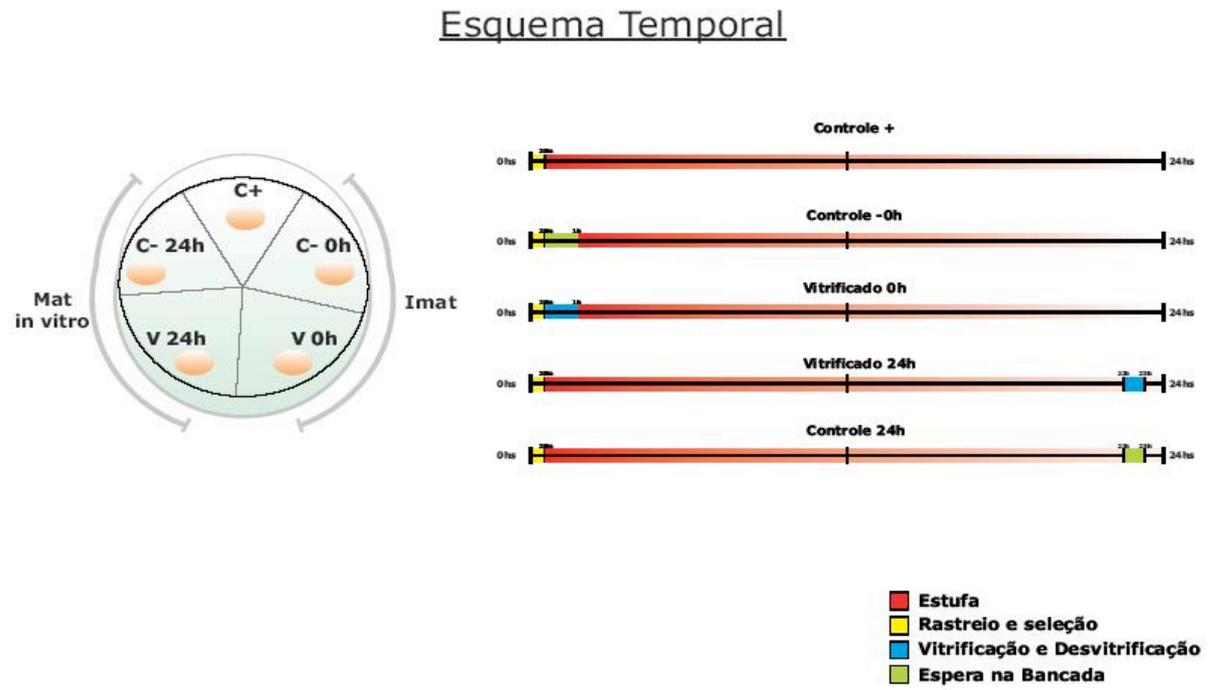


Figura 2- Esquema temporal.

4.2 *Coleta e seleção dos ovócitos*

O presente experimento foi realizado no período de outubro de 2010 a maio de 2012, no laboratório de biotecnologia da reprodução da Universidade de Brasília-UnB em Brasília-DF.

Os ovócitos utilizados foram obtidos de ovários de vacas mestiças em abatedouros na região do Distrito Federal, e foram transportados ao laboratório em um tempo de no máximo 4 horas, em soro fisiológico pré-aquecido a uma temperatura aproximada de 35-37°C. No laboratório, os ovários foram mantidos em banho-maria a 35 a 37°C até que todos fossem puncionados.

Os complexos cúmulus oophorus (*CCO*) foram aspirados de todos os folículos visíveis no ovário, com exceção daqueles com diâmetro aproximado de maior do que 8mm e menor que 2mm. Para a aspiração foi utilizado escalpe 20 gauge descartável, ligado a uma seringa descartável e estéril de 10ml e todo o líquido folicular foi depositado em um cálice que foi mantido em banho-maria de 35°-37°C durante todo o processo.

Após a aspiração o pellet formado no cálice e contendo os *CCOs* foi recuperado do fundo do tubo e lavado em PBS e transferido para placa de petri 100 x 15mm. A busca e seleção dos *CCOs* foram realizadas em estereomicroscópio SVII (Zeiss®) em aumento de 20-80x.

Foram selecionados os *CCOs* que apresentavam citoplasma homogêneo, sem vacúolos granulações ou extrusões, com um mínimo de 3 camadas de células do cúmulus compactas circundando todo o ovócito. Todo o procedimento, desde a seleção até a fixação, foi realizado a temperatura controlada em torno de 35°C. Os *CCOs* selecionados foram aleatoriamente distribuídos nos diferentes grupos.

4.3 *Maturação in vitro dos ovócitos.*

Após seleção os ovócitos são submetidos a dois banhos em meio de maturação que antes de ser utilizado foi estabilizado em estufa a 39°C e atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa por um período de 1 hora. Os *CCOs* foram colocados em gotas de 200 ul de meio coberto com óleo mineral e mantido em estufa de cultivo a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa por até 24hs. Em cada gota foram colocados entre 20 e 30 *CCOs*.

4.4 *Vitrificação dos ovócitos por OPS.*

A vitrificação foi realizada conforme protocolo descrito por Vajta et al. (1997, 1998), em que se utilizam duas soluções de vitrificação e uma palheta especial denominada *OPS* (*open pulled straw*), porém com algumas adaptações. A solução de vitrificação 1 (SV1) é composta por TCM- 199 com Hepes, acrescida de 20% de SFB. 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e 10% de Etilenoglicol sendo a solução de vitrificação2 (SV2), composta por TCM-199 com Hepes, acrescida de 20% de SFB. 20% DMSO, 20% EG e 1M de Sacarose.

A palheta de vitrificação *OPS* consiste em uma palheta de 0,25ml modificada, de forma que seu diâmetro interno e a espessura de sua parede sejam reduzidos para aproximadamente a metade do original. Ambas as extremidades da *OPS* ficam abertas, não sendo lacradas mesmo depois de conterem os ovócitos. Por ser mais fina do que a palheta tradicional, a *OPS* permite que os ovócitos sejam introduzidos na palheta por capilaridade.

Para o processo de vitrificação foi utilizada uma placa de 4 poços, em que no primeiro e segundo poços, era colocado um volume de 800ul de TC-199 com Hepes, acrescido de 20% de soro fetal bovino (solução Holding). No terceiro poço era colocado um volume de 800ul de SV1 e no quarto poço, 600 ul de SV2 (Figura 3). Todas as soluções eram mantidas em placa aquecedora a 39°C.

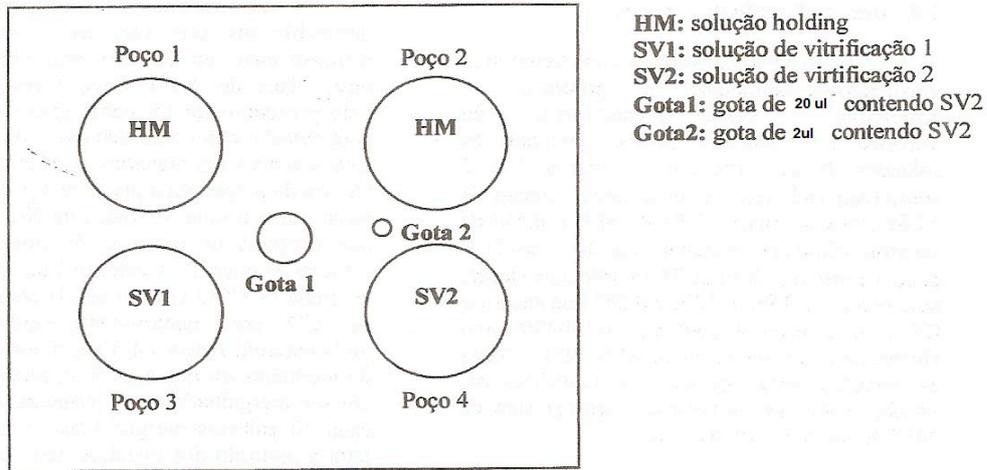
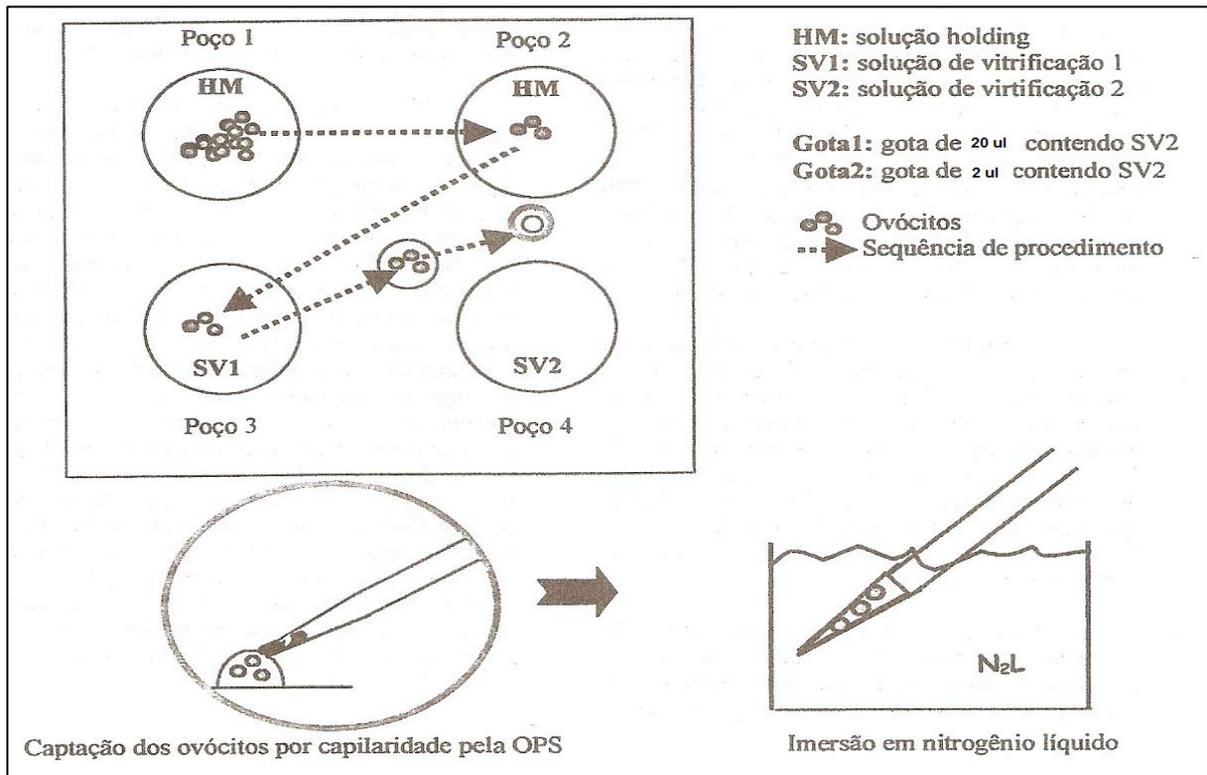


Figura 3 - Preparo da placa para vitrificação de ovócitos bovinos pelo método *OPS*.

Poço 1: 800µl HM	30 segundos
Poço 2: 800µl HM	30 segundos
Poço 3: VS1: 800µl HM+100µl EG+ 100µl DMSO	25-30 segundos
Gota 1 e 2: VS2: 600µl SM+ 200µl EG+ 200µl DMSO	20-25 segundos

Os ovócitos a serem vitrificados foram separados em grupos de 3 a 5 e inicialmente transferidos para a primeira gota que é utilizada somente para lavagem por 30 segundos, e então para a segunda, por mais 30 segundos, sendo em seguida expostos durante 25-30 segundos à solução SV1. Retirados desta solução com auxílio de pipeta, os ovócitos foram colocados em uma gota de 20µl de solução SV2, e imediatamente transferidos para uma nova gota de aproximadamente 2µl de SV2. A extremidade mais fina da palheta de *OPS* é então mergulhada nesta gota, e por efeito natural de capilaridade os ovócitos entram na palheta. Uma vez acondicionados na palheta, esta foi mergulhada em nitrogênio líquido mantido em uma caixa de isopor (figura 4). O tempo decorrido desde que são expostos a SV2 até serem colocados em nitrogênio líquido, é de 20 a 25 segundos.



4.5 Desvitrificação dos ovócitos criopreservados em OPS.

Logo após todos os ovócitos terem sido vitrificados, iniciou-se o processo de desvitrificação dos ovócitos que estavam armazenados nas OPS. Neste procedimento, foi utilizada uma placa de 4 poços, contendo as soluções de desvitrificação 1 e 2, além da solução HM. Os poços 1 e 2 continham cada um 1ml de solução de desvitrificação 1. O poço 3 continha 1ml de solução de desvitrificação 2, e o poço 4 continha 1ml de HM (figura 5). Todas as soluções foram previamente aquecidas e mantidas em placa aquecedora a 39°C.

Figura 4 - Processo de vitrificação de ovócitos bovinos pelo método OPS.

Os foram mergulhadas na solução do poço 1.

A extremidade oposta à que continha os ovócitos foi obliterada com o dedo, e os ovócitos foram naturalmente expulsos para o meio externo. Cerca de 3 segundos decorreram do momento em que a OPS foi retirada do nitrogênio líquido até ser mergulhada nesta primeira solução.

Logo após as palhetas serem mergulhadas no poço 1. Foi feita a remoção dos ovócitos deste poço para o poço 2, para evitar que ficassem em contato com uma solução muito concentrada em crioprotetores. No poço dois, os ovócitos foram mantidos por 1 minuto e depois por mais 1 minuto no poço 3. Finalizada esta etapa, os ovócitos foram transferidos para a solução do poço 4, onde permaneceram até retornarem para a maturação (figura 6).

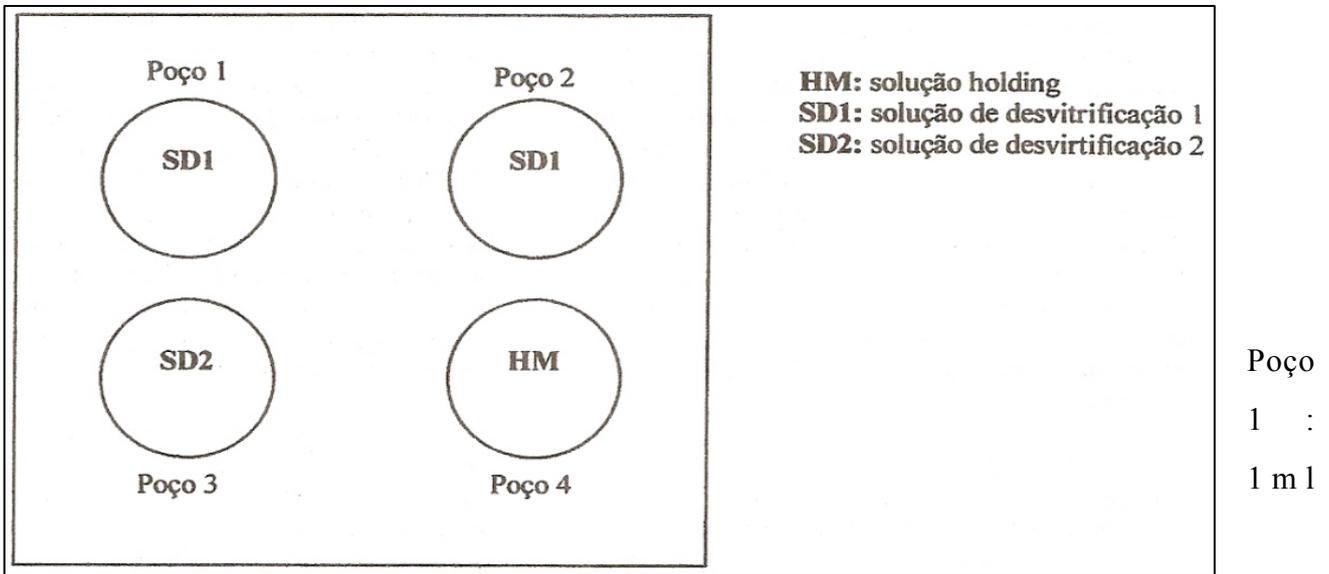


Figura 5 - Preparo da placa para desvitrificação de ovócitos bovinos pelo método OPS.

- Poço 2: 1ml SD1- (SM) 60 segundos.
- Poço 3: 1ml SD2- (500ul SM+500ul HM) 60 segundos.
- Poço 4: 1ml HM até o retorno ao cultivo.

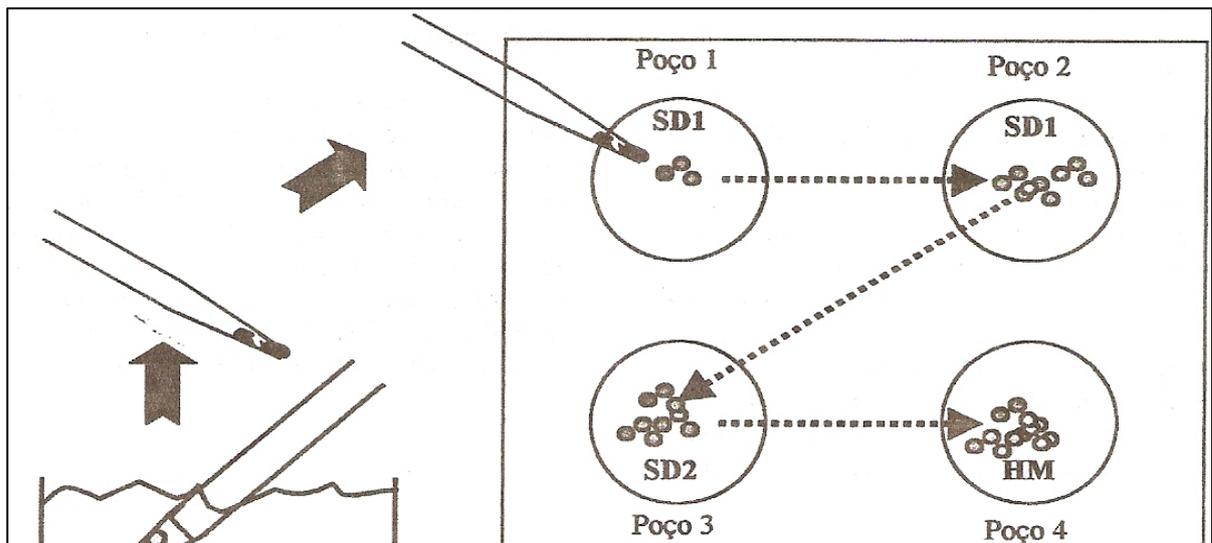


Figura 6 - Processo de desvitrificação de ovócitos bovinos pelo método *OPS*.

Antes de retornarem para o cultivo, os ovócitos foram previamente lavados em 2 gotas de meio de maturação para a retirada de qualquer resíduo do crioprotetor, e então colocados na gota de maturação. Neste caso para todo o processo de vitrificação, desvitrificação e retorno à maturação, utilizando o método *OPS*, foram gastos cerca de 40 minutos.

4.6 *Vitrificação dos ovócitos por Cryotop.*

A vitrificação foi realizada de acordo com um novo protocolo de vitrificação proposto a partir de mudanças testadas na rotina do laboratório de biotecnologia da reprodução da UnB. Onde se utiliza o recipiente VITRI-EQUIP e hastes para vitrificação com seus protetores (ingámed®). Foram separadas as hastes de vitrificação a serem usadas e identificadas. Em seguida, colocou-se o nitrogênio líquido no equipamento de vitrificação nos compartimentos 1 e 2 (figura 7).

Logo depois de colocados os protetores das hastes de vitrificação horizontalmente no vapor de nitrogênio (no compartimento 1 do VITRI-EQUIP) alguns minutos antes de começar o procedimento, foram então mergulhados diretamente no nitrogênio líquido, verticalmente (compartimento 2 do VITRI-EQUIP), para que ficassem totalmente encobertos, mas de modo a ser visualizado para poder encaixar a haste de vitrificação (Figura 7).

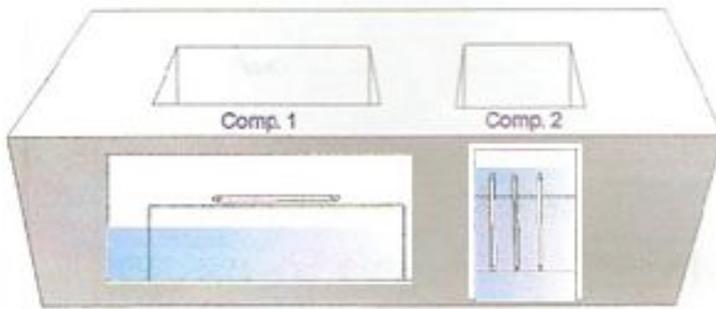


Figura 7 - Esquematização do VITRI-EQUIP (compartmento 1 e 2).

Em uma placa de cultivo de 4 poços, foram distribuídas as soluções, sendo uma de TCM-199 com Heps, acrescido de 20% de soro fetal bovino (solução Holding) e outra de solução de equilíbrio VI-1 em outra placa de petri 100mm, foram distribuídas as soluções em três gotas da solução de vitrificação VI-2. Os ovócitos foram lavados no poço contendo solução Holding e em seguida transferidos para o poço contendo a solução de VI-1. Em seguida os ovócitos foram transferidos para as três gotas de solução de vitrificação VI-2 (Figura 8). Então, foram colocados imediatamente nas hastes de vitrificação (figura 9). Sendo depositadas no máximo cinco estruturas por haste.

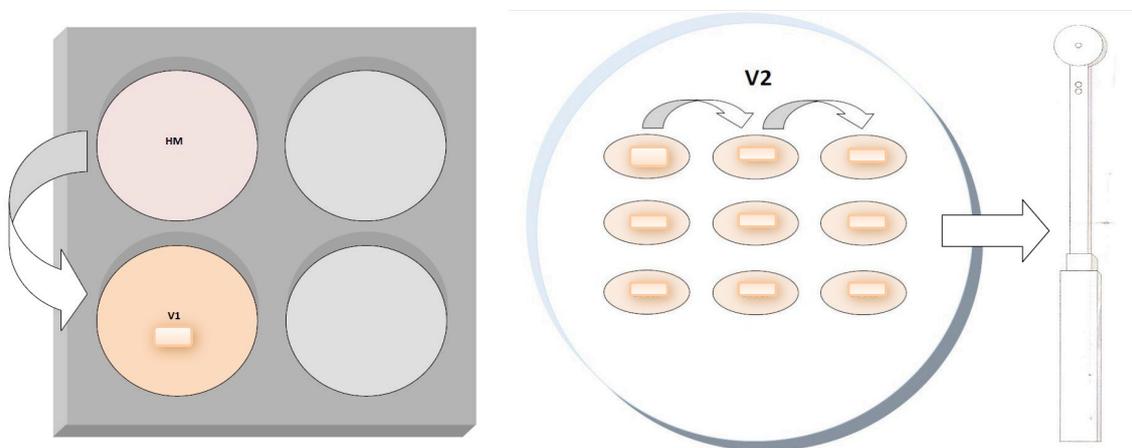


Figura 8 - Esquematização do processo de vitrificação por *Cryotop*.

A colocação das estruturas nas hastes foi cuidadosa de forma a evitar o excesso de meio. Em seguida a haste foi mergulhada rapidamente no nitrogênio líquido que se encontrava no compartimento 2 e mantida até o total congelamento (Figura 10). Logo após, introduziu-se a haste no protetor que se encontrava mergulhado. Cuidadosamente, ajustou-se a haste ao protetor para que ficasse bem fixa. As hastes foram mantidas no nitrogênio líquido até o início do processo de desvitrificação (Figura 10).

Figura 9 - Desenho da haste para vitrificação pelo método *Cryotop*.

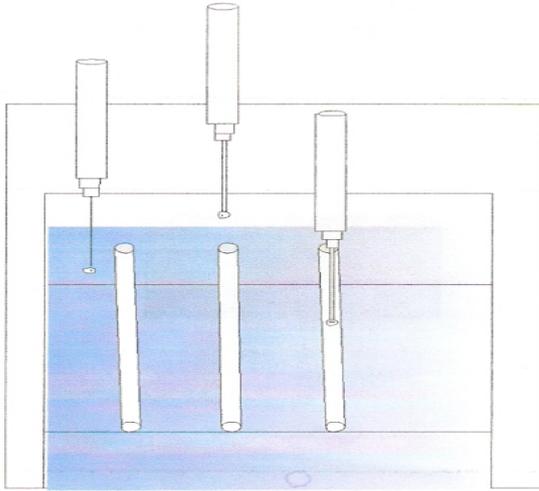


Figura 10 - Processo onde a haste é mergulhada rapidamente em nitrogênio líquido.

4.7 Desvitrificação dos ovócitos criopreservados por *Cryotop*.

Logo após a desvitrificação dos ovócitos que haviam sido criopreservados em *OPS* e o retorno dos mesmos ao cultivo, foi iniciado o processo de desvitrificação dos ovócitos criopreservados nas hastes pelo método *Cryotop*.

Neste procedimento foi utilizada uma placa de petri 100mm, onde foi feita a distribuição das soluções em gotas de ~300ul, sendo duas gotas da solução de desvitrificação DV-1; e em outra placa de petri uma gota da solução diluente DV-2 e duas gotas da solução de lavagem DV-3. Apenas a solução de desvitrificação DV-1 foi pré-aquecida a 37°C. As outras soluções foram utilizadas em temperatura ambiente controlada por ar condicionado em 24-26° C.

Após remover o protetor da haste, a tira da haste foi colocada diretamente na primeira gota da solução DV-1 e então os ovócitos foram passados para a segunda gota. Em seguida os ovócitos foram transferidos para a gota de DV2, e então os ovócitos foram lavados nas duas gotas de DV3 (figura 11). E então os ovócitos foram lavados em duas gotas do meio de maturação e retornados para o cultivo até completarem 24hs de maturação.

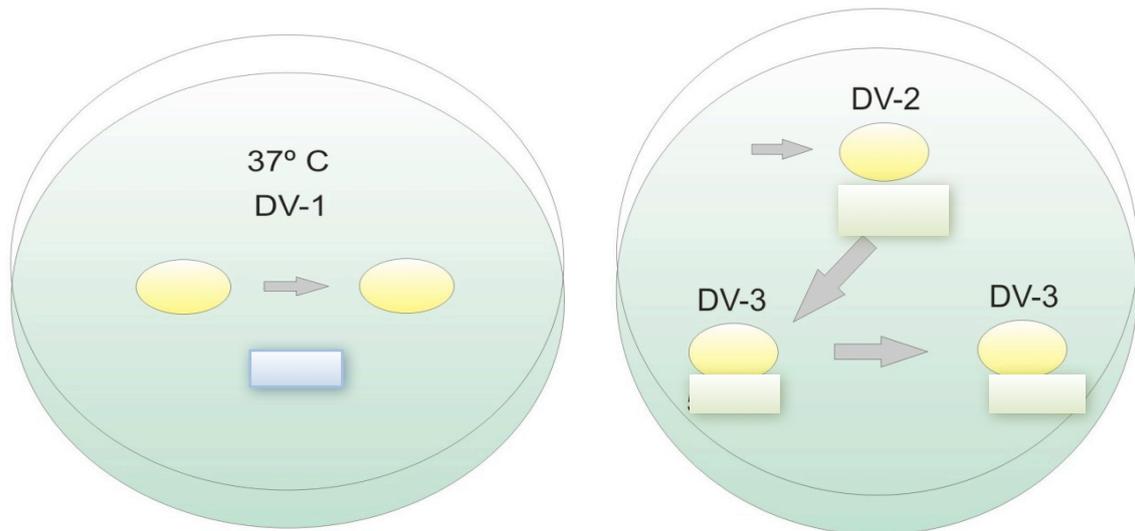


Figura 11 - Desvitrificação pelo método *Cryotop*.

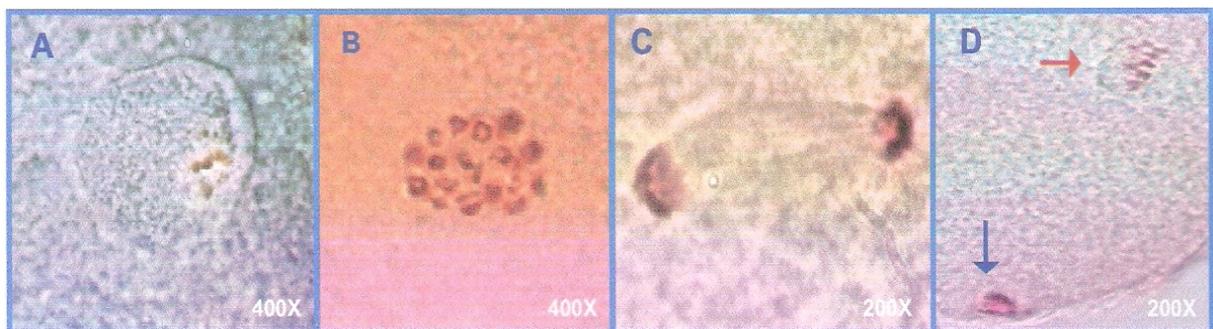
4.8 *Fixação e coloração com corante lacmóide.*

Após ter completado 24 horas de maturação, os ovócitos foram lavados em PBS e em seguida passaram pelo processo de desnudamento e logo foram colocados em tubos de 1,5ml tipo Eppendorf contendo uma solução 3:1 de etanol e ácido acético. Uma vez nesta solução os ovócitos foram armazenados por um período mínimo de 48hs caracterizando assim a fixação. Após a fixação, os ovócitos foram corados pelo corante lacmóide (SIGMA®).

No momento da coloração, os ovócitos foram removidos do fixador, e colocados em lâmina, em uma gota contendo o mínimo de fixador. Uma lamínula com pequena quantidade de parafina e vaselina ao longo de duas bordas opostas foi colocada sobre as gotas contendo os ovócitos. A lamínula foi então pressionada lentamente, até que os ovócitos ficassem firmemente aderidos à lâmina. Este procedimento foi realizado em estereomicroscópio (20-40x) para evitar a perda ou rompimento dos ovócitos.

Com auxílio de pipeta Pasteur, uma solução 1% de lacmóide em ácido acético glacial a 45% (previamente diluído em água destilada), foi passada entre lâmina e lamínula até que os ovócitos estivessem corados. O corante então foi removido por lavagem com a solução fixadora (3:1 de etanol e ácido acético). As bordas da lamínula foram lacradas com esmalte evitando o ressecamento das estruturas para posterior análise.

Para determinação do estágio da meiose, depois de corados os ovócitos foram observados em microscópio de contraste de fase (Olympus®) em aumento de 1000x. Os ovócitos foram classificados de acordo com a configuração nuclear (fig.12) em vesícula germinativa (VG) (fig.13), metáfase I (MI) (fig.15), anáfase I (AI) (fig.16), telófase I (TI) (fig.17) e metáfase II (MII) (fig.18), como descrito no quadro 1. E para os achados anormais em: Ativados (ATV) (fig. 19), Cromatina anormal (CAn) (fig. 20) e Fusos Multidirecionais (FMT) (fig. 21), Como descritos nos quadro 2.

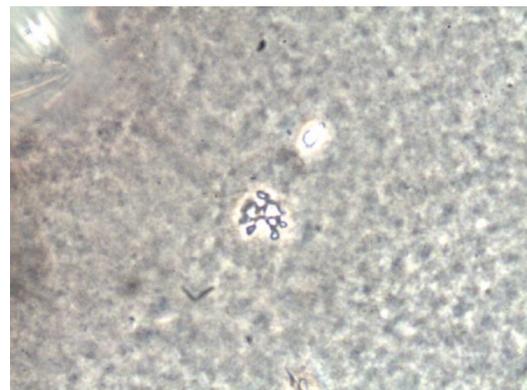
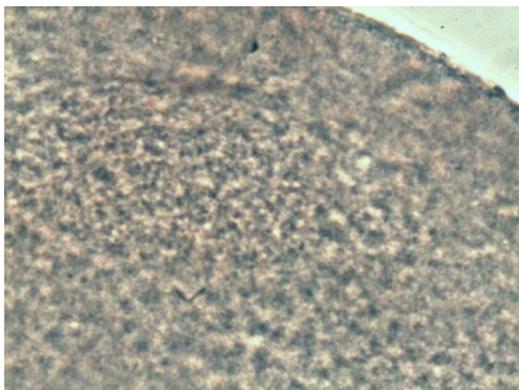


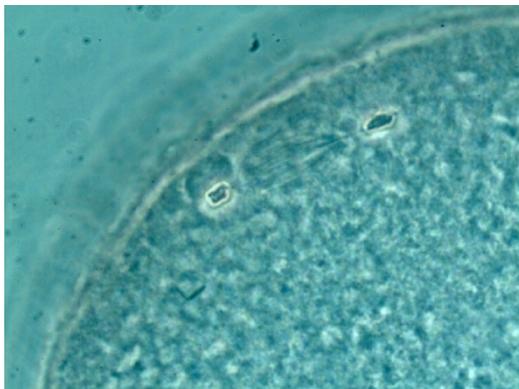
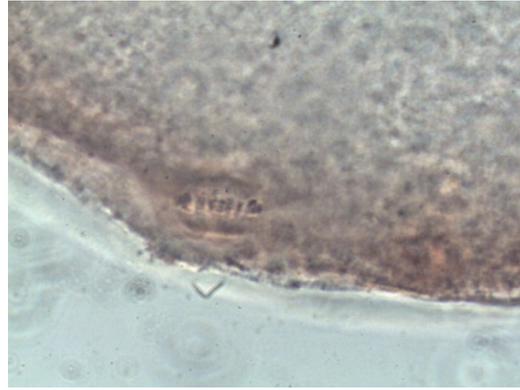
A) Vesícula germinativa (VG) B) Metáfase I (MI) c) Anáfase (An.) D) Metáfase II. Seta vermelha indica placa metafásica, seta azul indica primeiro corpúsculo polar.

Figura 12 - Classificação da meiose de ovócitos bovinos corados por lacmóide.

Quadro 1 – Descrição das configurações normais de cromatina encontradas em ovócitos bovinos não vitrificados (Controle) e em ovócitos vitrificados e maturados *in vitro*.

Denominação		Configuração nuclear
	Corpúsculo Polar	Descrição
Vesícula Germinativa (VG)	Ausente	Cromatina descondensada formando um ou mais emaranhados dispersos, de finos filamentos. Visualização do envelope nuclear.
Metáfase I (MI)	Ausente	Cromossomos individualizados, bivalentes, alinhados sobre placa metafásica ou isolados sobre almofada (rede de fusos).
Anáfase I (AI)	Ausente	Cromossomos ainda individualizados, separando-se em dois grupos em direções opostas, com as fibras do fuso freqüentemente visíveis.
Telófase I (TI)	Ausente	Cromossomos compactados em dois grupos distintos, em direções opostas, com fusos visíveis ou não.
Metáfase II	Presente	Cromossomos individualizados, monovalentes, alinhados sobre placa metafásica ou isolados sobre almofada.
	Ausente	Mesma configuração descrita para MII, mas só distinguível de MI pelo volume de cromatina e tamanho da placa metafásica.

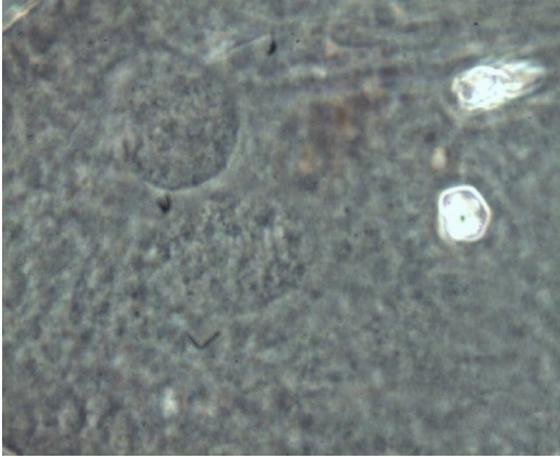




Quadro 2 – Descrição das configurações anormais de cromatina encontradas em ovócitos bovinos não vitrificados (controles) e em ovócitos imaturos e maduros vitrificados pelo método *OPS* e *Cryotop*.

Denominação	Corpúsculo	
	Polar	Descrição
Cromatina Anormal	Ausente ou presente	Cromatina identificável, mas sem qualquer desenho característico.
Ativados	Presente	Presença de pró-núcleos.

Fusos multidirecionais	Ausente ou presente	Cromatina e fusos em varias direções, e interligados.
---------------------------	---------------------------	---



5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados de taxa de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário foi utilizado o teste do Chi-quadrado ($P > 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da cromatina.

Maturação Nuclear

Os resultados encontrados neste experimento para avaliação da maturação nuclear estão sumarizados nas tabelas 1 e 2. Foi utilizada como parâmetro de maturação nuclear a presença da cromatina do ovócito em metáfase II. Um total de 917 ovócitos foi analisado quanto ao estágio de maturação nuclear para avaliação do potencial de maturação *in vitro* de ovócitos imaturos e maturados *in vitro* vitrificados pelo método *OPS* e *Cryotop*.

Os estágios intermediários (metáfase I, anáfase e telófase) foram pouco freqüentes nos diferentes tratamentos.

Os ovócitos do grupo controle positivo (não vitrificados), apresentaram maior taxa de MII do que os ovócitos imaturos vitrificados por *OPS* e também do que seu respectivo controle negativo. Em contrapartida foi verificada taxas semelhantes de MII quando comparado os resultados do controle + com os ovócitos imaturos e maduros que foram vitrificados pelo método *Cryotop*, assim como os que foram vitrificados maduros e pelo método *OPS*.

As anormalidades foram classificadas segundo descrição no quadro 2 e se distribuíram de forma diferenciada entre os grupos (tabela 2). Entre os tipos de anormalidades encontradas, a presença de cromatina anormal foi observada em maior grau, exceto no grupo de ovócitos imaturos vitrificados por *cryotop* e pelo grupo controle negativo dos ovócitos imaturos vitrificados por *OPS* que apresentaram maior observância de fusos multidirecionais. Em seqüência dentre as anormalidades mais encontradas observou-se os fusos multidirecionais, seguidos pelos ativados. Sendo que o grupo controle positivo e os controles negativos dos ovócitos maduros de ambos os métodos (*cryotop* e *OPS*) não apresentaram ativação. Foi importante observar que o grupo controle positivo apresentou maior taxa de cromatina anormal do que os vitrificados imaturos por *cryotop* e também do que o controle negativo dos ovócitos imaturos vitrificados por *OPS*.

Dentro das anormalidades denominadas como “fusos multidirecionais” e “cromatina anormal” não houve diferenças dos ovócitos vitrificados entre o método *cryotop* e *OPS* (imaturos e maduros).

Tabela 1 - Taxas encontradas de acordo com a fase da maturação nuclear, a partir de ovócitos imaturos e maturados *in vitro*, vitrificados pelo método de *OPS* e *Cryotop* e não vitrificados (controles).

Método de congelamento	Ovócitos	VG (%)	MI (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)	MII (%)	
<i>Cryotop</i>	Controle (+) (n=112)	8.93 ^A	3.57 ^A			87.50 ^B	
	Imaturo	Controle (-) (n=103)	25.24 ^{*a,c,A}	5.82 ^{a,c,B,D}			68.94 ^{C,D}
		Vitrificados (n=114)	10.53 ^{b,A,D}	21.05 ^{*b,B}		5.26 ^A	63.16 ^{C,D}
	Maduro	Controle (-) (n=100)	4.00 ^{d,A,D}	26.00 ^{*a,d,B}			70.00 ^C
		Vitrificados (n=103)	5.82 ^A	9.72 ^{b,A}	2.91 ^A	3.88 ^A	77.67 ^B
	<i>OPS</i>	Imaturo	Controle (-) (n=101)	15.84 ^{a,A}	27.73 ^{*c,A,E}	4.95 ^A	3.96 ^A
Vitrificados (n=99)			32.32 ^{*b,c,A,E}	20.2 ^{*a}	2.02 ^B	4.04 ^B	41.42 ^{*c,C,E}
Maduro		Controle (-) (n=93)	15.05 ^{A,E}	12.90 ^{*d,A}		2.15 ^B	69.90 ^{d,C}
		Vitrificados (n=92)	10.87 ^{d,A}	9.78 ^A		3.27 ^B	76.08 ^{d,C}

Teste estatístico do Qui-quadrado (X^2).

* Indica diferença do controle positivo dentro do mesmo estágio da meiose ($p < 0.05$).

^{a,b} Indica diferença entre o controle negativo e sua respectiva amostra vitrificada ($p < 0.05$).

^{c,d} Indica diferença entre ovócitos controles ou vitrificados dentro do mesmo tipo de criopreservação (*Cryotop* ou *OPS*) ($p < 0.05$).

^{A,B,C} Indica diferença entre os estágios da meiose dentro do mesmo grupo ($p < 0.05$).

^{D,E} Indica diferença entre os métodos de criopreservação *Cryotop* e *OPS*, entre ovócitos controles imaturos, vitrificados imaturos, controles maduros e vitrificados maduros, em cada fase da meiose ($p < 0.05$).

Tabela 2 - Taxas encontradas de acordo com as anormalidades da maturação nuclear, a partir de ovócitos imaturos e maturados *in vitro*, vitrificados pelo método de *OPS* e *Cryotop* e não vitrificados (controles).

Método de congelamento	Ovócitos	Ativados (%)	Fusos Multidirecionais (%)	Cromatina Anormal (%)
	Controle (+) (n=5)	0.00 ^A	40.00 ^B	60.00 ^C
<i>Cryotop</i>	Imaturo	Controle (-) (n=6)	0.00 ^{a,A}	50.00 ^B
		Vitrificados (n=12)	16.67 ^{* b,A,D}	50.00 ^{c,B}
	Maduro	Controle (-) (n=3)	0.00 ^A	33.33 ^B
		Vitrificados (n=10)	10.00 ^A	30.00 ^{d,B}
<i>OPS</i>	Imaturo	Controle (-) (n=14)	14.29 ^{* a,A}	50.00 ^B
		Vitrificados (n=22)	4.55 ^{* b,A,E}	45.45 ^B
	Maduro	Controle (-) (n=7)	0.00 ^{a,A}	42.86 ^B
		Vitrificados (n=9)	11.11 ^{b,A}	33.33 ^B

Teste estatístico do Qui-quadrado (X^2)

* Indica diferença do controle positivo ($p < 0.05$).

^{a,b} Indica diferença entre o controle negativo e sua respectiva amostra vitrificada ($p < 0.05$).

^{c,d} Indica diferença entre os ovócitos criopreservados Imaturos *versus* Maduros dentro do mesmo tipo de criopreservação (*Cryotop* ou *OPS*) ($p < 0.05$).

^{A,B,C} Indica diferença entre os três tipos de alterações cromossômicas dentro do mesmo grupo (letra maiúscula) ($p < 0.05$).

^{D,E} Indica diferença dos ovócitos vitrificados entre os métodos *Cryotop* ou *OPS* (ovócitos Imaturos ou Maduros) ($p < 0.05$).

6.2 Produção embrionária

Neste estudo, os resultados de clivagem e produção embrionária em D7 e em D8 de todos os grupos e tratamentos, estão apresentados na Tabela 3. Maiores taxas de clivagem (fig.22) e de produção embrionária (fig.23) foram obtidas no tratamento controle + e nos *CCOs* imaturos vitrificados por *Cryotop*. Taxas semelhantes entre os dois grupos foram encontradas ($p>0,05$). Com exceção dos *CCOs* imaturos que foram vitrificados pelo método *Cryotop*, todos os demais grupos de *CCOs* vitrificados, tanto imaturos como maturados *in vitro*, apresentaram menores taxas quando comparados ao grupo controle+, tanto para clivagem (fig.22) como para a produção de embriões em D7 (fig.23) e D8. Os *CCOs* imaturos e vitrificados por *Cryotop* obtiveram resultados semelhantes aos do seu controle (-), e quando comparado aos *CCOs* que foram maturados *in vitro* apresentaram maiores taxas de clivagem. Não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos Controle + e os Controles negativos imaturos ou maturados *in vitro* em ambos os grupos (*Cryotop* e *OPS*).

Os *CCOs* imaturos que foram vitrificados por *OPS* demonstraram menores taxas do que seu controle negativo na clivagem, assim como nas taxas embrionárias em D7 e D8. E no grupo dos *CCOs* maduros e vitrificados por *OPS*, não houve diferença na clivagem e nem nas taxas embrionárias em D7, mas apresentou menores taxas embrionárias em D8 quando comparados ao seu controle negativo.

Tabela 3 - Taxa de clivagem e produção embrionária em D7 e D8, a partir de ovócitos imaturos e maturados *in vitro*, vitrificados pelo método de *OPS* e *Cryotop* e não vitrificados (controles).

Método de congelamento	Maturação	Tratamento	Clivagem	Taxa de Blastocisto em D7	Taxa de Blastocisto em D8
<i>Cryotop</i>	Imaturos	Cont. (-)	91/67 (73,6%) ^{A,a}	21 (23,07%) ^{A,a}	19 (21%) ^{A,a}
		Vitrificados	86/47 (54,6%) ^{A,a}	13 (15,11%) ^{A,a}	12 (13,9%) ^{A,a}
	Maduro	Cont. (-)	95/65 (68,4%) ^{A,b}	20 (21%) ^{A,a}	19 (20%) ^{A,a}
		Vitrificados	75/25 (33,3%) ^{B,c,#}	8 (10,6%) ^{A,a,#}	9 (12%) ^{A,a}
<i>OPS</i>	Imaturos	Cont.(-)	117/84 (71,8%) ^{A,a}	24 (20,5%) ^{A,a}	22 (18,8%) ^{A,a}
		Vitrificados	103/37 (35,9%) ^{A,b,#}	7 (6,8%) ^{A,b,#}	8 (7,76%) ^{A,a,#}
	Maturados	Cont.(-)	94/57 (60,6%) ^{A,a}	18 (19,1%) ^{A,a}	20 (21,2%) ^{A,a}
		Vitrificados	79/32 (40,5%) ^{A,a,#}	7 (8,86%) ^{A,a,#}	6 (7,59%) ^{A,b,#}
Controle+	Controle	não vitrificados	188/137 (72,8%)	48 (25,5%)	46 (24,4%)

Valores expressos em porcentagem (%). n: número de ovócitos usados em cada experimento.

Entre parênteses o n de embriões obtidos em cada experimento.

Não há diferença estatística entre os grupos experimentais *Cryo* e *OPS* em nenhum dos tempos testados ($p > 0,05$)

Legenda:

indica diferença estatística do controle + ($p < 0,05$)

^{A,B} indica diferença estatística entre os tempos 0 e 24 horas em cada grupo experimental ($p < 0,05$)

^{a,b,c} indica diferença estatística entre cada tratamento e seu respectivo controle negativo ($p < 0,05$)

Teste utilizado: qui-quadrado

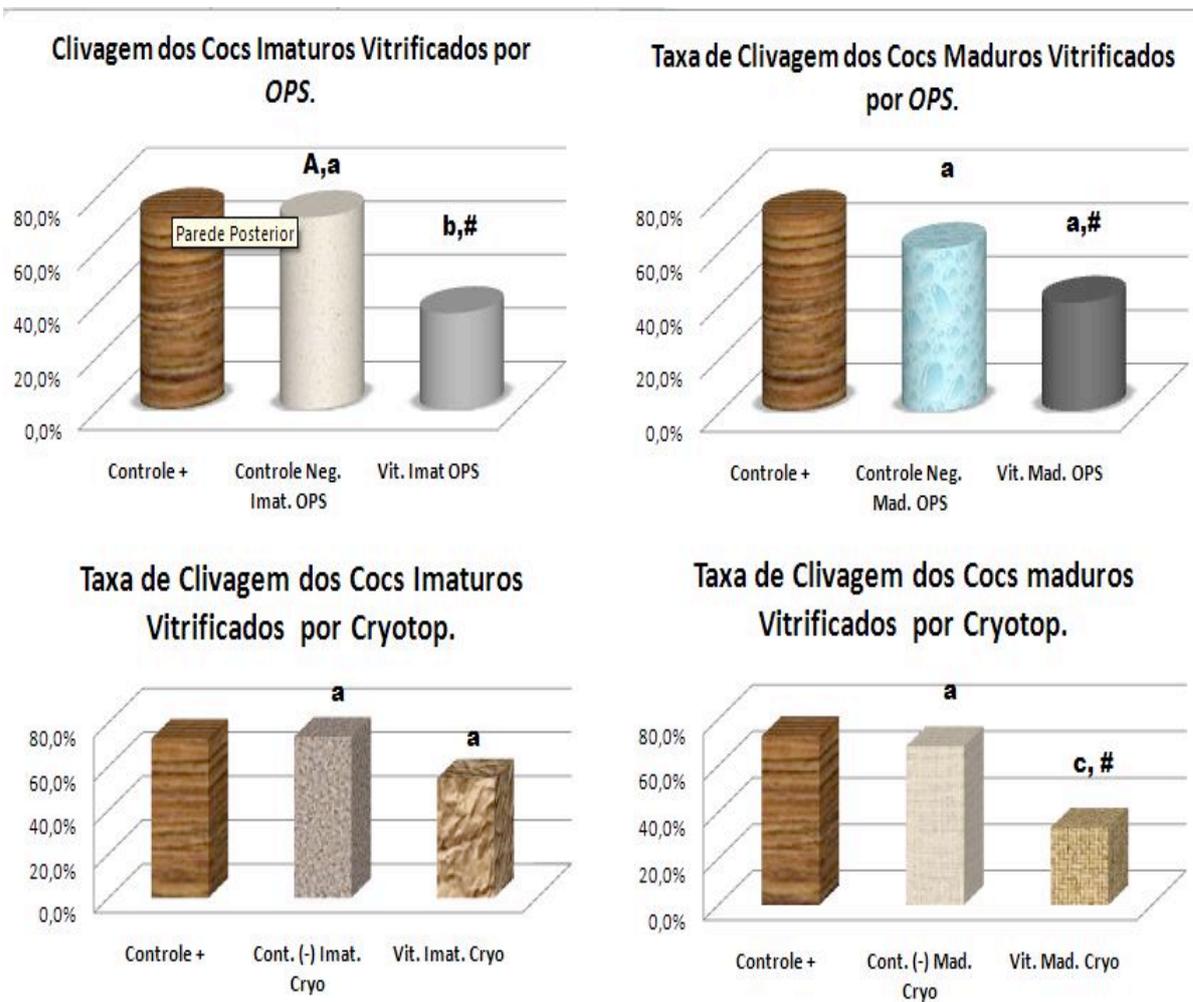


Figura 22 - Resultados em gráfico das clivagens a partir dos CCOs Imaturos e Maduros, Vitrificadas por *Cryotop* e *OPS*.

Valores expressos em porcentagem (%). n: número de ovócitos usados em cada experimento. Entre parênteses o n de embriões obtidos em cada experimento.

Não há diferença estatística entre os grupos experimentais *Cryo* e *OPS* em nenhum dos tempos testados ($p > 0,05$)

Legenda:

indica diferença estatística do controle + ($p < 0,05$)

^{A,B} indica diferença estatística entre os tempos 0 e 24 horas em cada grupo experimental ($p < 0,05$)

a,b,c indica diferença estatística entre cada tratamento e seu respectivo controle negativo ($p < 0,05$)

Teste utilizado: qui-quadrado

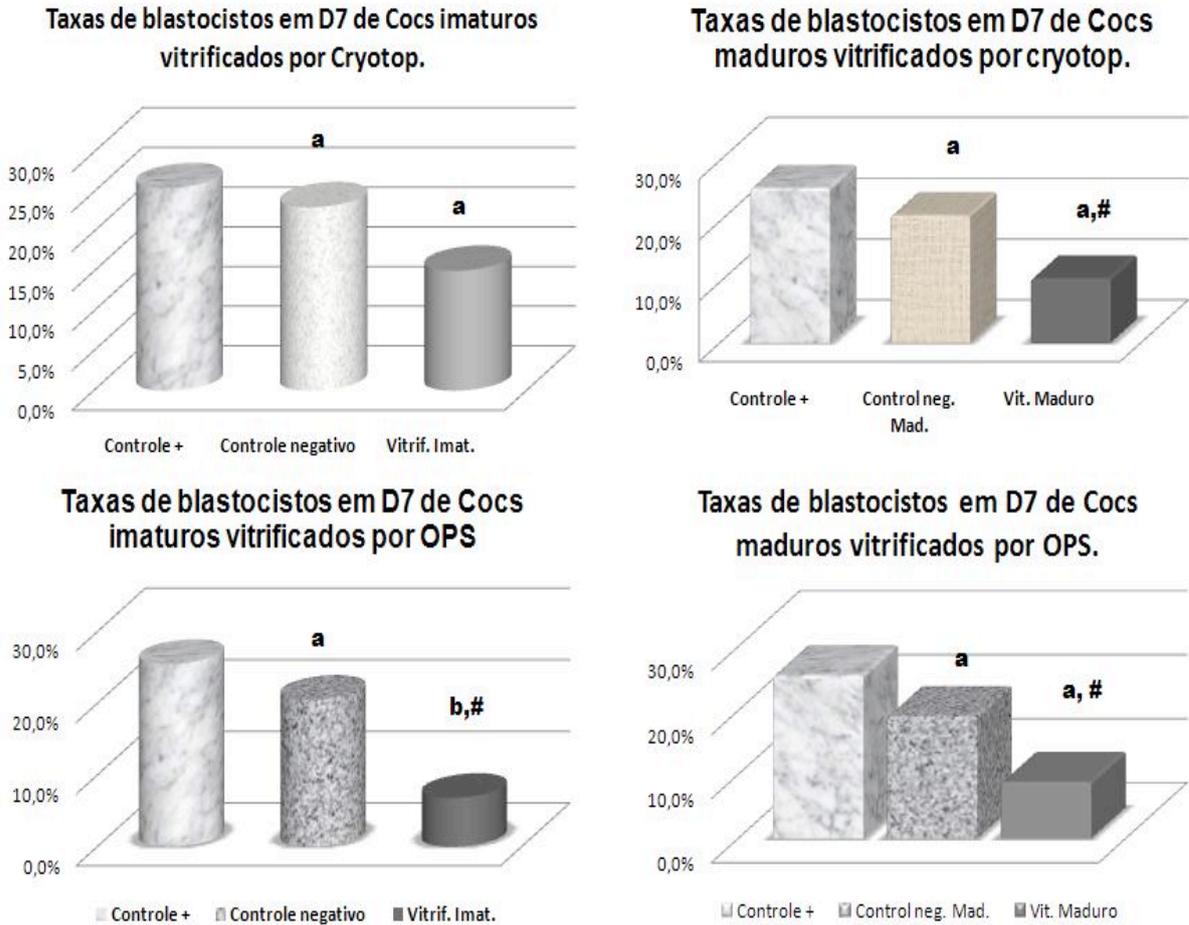


Figura 23 - Resultados em gráfico da produção embrionária a partir dos *CCOs* Imaturos e Maduros, Vitrificados por *Cryotop* e *OPS*.

Valores expressos em porcentagem (%). n: número de ovócitos usados em cada experimento. Entre parênteses o n de embriões obtidos em cada experimento.

Não há diferença estatística entre os grupos experimentais *Cryo* e *OPS* em nenhum dos tempos testados ($p > 0,05$)

Legenda:

indica diferença estatística do controle + ($p < 0,05$)

A,B indica diferença estatística entre os tempos 0 e 24 horas em cada grupo experimental ($p < 0,05$)

^{a,b,c} indica diferença estatística entre cada tratamento e seu respectivo controle negativo (p<0,05)

Teste utilizado: qui-quadrado

7 DISCUSSÃO

7.1 Avaliação da cromatina

Maturação Nuclear

É importante a análise das estruturas do ovócito que podem ser afetadas pela vitrificação, dentre elas, uma das principais a ser observada é a capacidade do ovócito de completar a maturação nuclear, pois dela dependerá a continuidade do desenvolvimento do futuro embrião (YANG, B.; TUANY, F. et al., 2010). Sabe-se que a maturação nuclear pode ser considerada completa pela observação dos cromossomos organizados em metáfase II, associados à observação do primeiro corpúsculo polar (KING et al, 1986; EPPIG, 2001). Técnicas de coloração que permitam a identificação e caracterização do estado da cromatina são importantes e vem sendo extensivamente empregadas, a exemplo da coloração por lacmóide e Hoechst (LUNA et al., 2001; EBRAHIMI et al., 2010). Esses corantes que tem afinidade pela cromatina tornam possível a identificação de alterações como: fusos multidirecionais, diploidia, degeneração da cromatina e interrupção da meiose em estágios anteriores à MII. As ligeiras diferenças podem ser atribuídas ao meio de maturação utilizado e a época do ano em que foram coletados os ovócitos influenciado pelo fator nutricional. (COSTA et al., 2002). A taxa de maturação do tratamento controle positivo - não vitrificados (87,5%) foi semelhante à taxa observada por outros pesquisadores (CAMARGO, 1995; IM et al., 1997; COSTA et al., 2002; SANTOS., 2008; YAMADA et al., 2007; MATSUMOTO et al., 2001; FAGUNDES, 2002; WANI et al. 2004), que encontraram respectivamente, 84,0; 88,0; 84,0; 80,1; 75,9; 70,0; 82,5% de maturação. De fato, fica evidenciado que os procedimentos adotados na maturação *in vitro* dos ovócitos foram adequados.

Na técnica de coloração com lacmóide, a avaliação de maturação é feita somente pela observação dos cromossomos em MII. Neste caso é importante observar que tanto a extrusão

do corpúsculo polar quanto a organização da cromatina em MII, necessitam que a estrutura de microtúbulos e microfilamentos esteja normal e funcional (CHAMAYOU et al., 2011; BRANDÃO, 2002; FAIR., 2003.). É possível que nos ovócitos que se encontravam em metáfase II, mas com anormalidade, as injúrias que normalmente ocorrem no citoesqueleto na criopreservação (WU et al., 1999), não tenham impedido a maturação nuclear e a expulsão do primeiro corpúsculo polar, mas tenham sido grandes o suficiente para prejudicar a reorganização dos cromossomos, não tendo sido possível observar a metáfase II configurada normalmente.

A maioria dos trabalhos relaciona a configuração anormal da cromatina com a desorganização e o rompimento dos fusos meióticos (AMAM e PARKS, 1994; PARK et Al., 1997; SAUNDERS e PARKS, 1999; WU et al., 1999), o que pode ter sido o fator responsável pelo não alinhamento dos cromossomos, e as anormalidades da cromatina observadas nos ovócitos submetidos à vitrificação. Todos estes erros estruturais são verdadeiros, sendo possível que muitos dos mecanismos fisiológicos também estejam afetados. Wu et al. (1999) relataram que o surgimento de fusos multidirecionais e configurações muitas vezes tríade, seriam causadas pela presença de vários centros de organização mitótica (MTOC), não sendo ainda elucidado seu mecanismo.

7.2 *Produção embrionária*

Atualmente a vitrificação é considerada a técnica mais eficiente para a conservação de ovócitos bovinos. Porém, os resultados obtidos até o presente ainda não permitem a sua utilização como ferramenta viável, para o armazenamento do germoplasma feminino. Injúrias decorrentes da criopreservação ocorrem em todos os tecidos e células, entretanto, tais lesões parecem estar potencializadas no gameta feminino. Essa alta sensibilidade à criopreservação pode ser explicada por suas características morfológicas e funcionais peculiares, como o tamanho celular, volume de água no citoplasma, organização do citoesqueleto, distribuição de organelas e estágio da meiose (FUKU et al., 1995; HOCHI et al., 1998; DIEZ et al., 2005; ADONA et al., 2008).

Os grupos de controles negativos foram utilizados no intuito de demonstrar que as injúrias causadas aos *CCOs* durante todo o processo de vitrificação, podem não somente serem consequências do processo em si, mas também do stress causado à célula durante o tempo de espera até o final de todo o processo de vitrificação. As taxas obtidas nesses grupos demonstraram que não há influência na produção de embriões de acordo com o tempo em que os *CCOS* ficam expostos ao meio-ambiente durante a vitrificação.

Os ovócitos não vitrificados que passaram pelo protocolo usual do laboratório para maturação *in vitro*, denominado como Controle+, desenvolveram-se até os estágios de blastocisto, em taxas satisfatórias (72,8% clivados e 25,5% de embriões), demonstrando que os procedimentos e meios adotados para FIV e CIV foram adequados. A habilidade do ovócito em ser fertilizado e se desenvolver normalmente requer tanto a maturação nuclear quanto a maturação citoplasmática (HURT et al., 2000). A clivagem é um bom indicativo de sobrevivência após a criopreservação, e as taxas obtidas neste estudo e nos demais trabalhos atestam a viabilidade do processo. Todavia, embora as taxas de clivagem dos grupos de *CCOs* maduros vitrificados por *OPS* (40,5%) e por *Cryotop* (33,3%) demonstrem que há sobrevivência e capacidade de fertilização após a vitrificação, foram inferiores à observada no grupo de controle + (72,8%), demonstrando que o processo de vitrificação utilizado, independente do tipo de recipiente empregado, ainda é danoso para os ovócitos maduros.

Após a vitrificação de ovócitos imaturos, estudos demonstraram alterações na configuração dos fusos meióticos (KIM D.H et al., 2007), que foram dependentes da exposição aos crioprotetores antes e durante a vitrificação. Estas alterações, além de outros possíveis danos subcelulares, podem explicar a razão da redução nas taxas de clivagem e do reduzido número de estruturas clivadas que atingem estágios mais avançados como blastocisto. Também no grupo controle houve uma acentuada diferença entre a taxa de clivagem (72,8%) e a taxa de blastocistos (25,5%), demonstrando que fatores ainda não identificados e provavelmente relacionados ao processo de cultivo embrionário (LONERGAN et al., 2003a e b), não oferecem as melhores condições para o desenvolvimento do embrião. É provável que, com ovócitos vitrificados, esse fenômeno seja intensificado e, assim, determine a maior redução na taxa de blastocistos. Em função disso, embora a taxa de clivagem seja um bom critério para avaliar a sobrevivência, sozinho, não é um parâmetro satisfatório para avaliar a posterior viabilidade de desenvolvimento dos ovócitos.

Dias et al. (1999) verificaram que a vitrificação provoca migração prematura dos grânulos corticais durante a MIV, caracterizando deficiência na maturação citoplasmática dos ovócitos. Essa migração prematura levaria ao endurecimento também prematuro da zona pelúcida (VICENT et al., 1990) e, conseqüentemente, redução da taxa de fecundação, causa pela qual as taxas de fecundação e produção embrionárias são mais baixas do que as do tratamento controle. Os procedimentos de vitrificação provocaram efeitos adversos, diminuindo conseqüentemente, o desenvolvimento até estádios de blastocisto. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos de *CCOs* vitrificados Imaturos e Maturados *in vitro* pelo método *Cryotop* quanto à clivagem, demonstrando melhores taxas nos que foram vitrificados ainda imaturos.

Apesar de inúmeros estudos nesta área, a taxa de sobrevivência de ovócitos criopreservados ainda é baixa, indicando a necessidade de otimização dos protocolos (BRANDÃO, 2002; VIEIRA et al., 2002; MEN et al., 2005; HORVATH and SEIDEL, 2006; MORATO et al., 2008a; MORATO et al., 2008b; ANCHAMPARUTHY et al., 2009; YANG et al., 2010). Foi importante observar que a taxa de embriões obtida no grupo de *CCOs* Imaturos vitrificados em *Cryotop* (15,11%) foi superior do que a encontrada por outros autores (MORATO et al., 2008; MEZZALIRA et al.2002;). A diminuição da viabilidade ovocitária originada pela criopreservação é observada principalmente na redução do desenvolvimento embrionário. As taxas de produção de blastocistos giram em torno dos 5% (VIEIRA et al., 2002; MEN et al., 2005; KIM et al., 2007; MORATO et al., 2008a; MORATO et al., 2008b; ANCHAMPARUTHY et al., 2009; SRIPUNYA et al., 2010) a partir de ovócitos vitrificados, submetidos à fecundação e cultivo *in vitro*.

A criopreservação de ovócitos imaturos já foi utilizada para ovócitos de suínos (Liu et al., 2008), humanos (KUWAYAMA et al., 2005), bovinos (ZHOU et al., 2010) e felinos (LUCIANO et al., 2009), Tendo já sido descritos nascimentos de bezerros a partir de ovócitos imaturos vitrificados (VIEIRA et al., 2002). Apesar dos estudos que avaliaram o melhor momento para a vitrificação durante a maturação *in vitro* (HOCHI et al., 1998; LUNA et al., 2001; BRANDÃO, 2002; MEN et al., 2002), mostrarem resultados divergentes em resposta à vitrificação. No geral, ovócitos imaturos são considerados menos resistentes à vitrificação e mais susceptíveis às lesões provocadas pelo resfriamento (ARAV et al., 1996) quando comparados aos ovócitos em MII (LUNA et al., 2001; ALBARRACIN et al., 2005).

A desorganização dos cromossomos na placa metafásica, menores níveis de lesões ao citoesqueleto, além de possibilitar o armazenamento imediato do gameta feminino, são vantagens atribuídas ao ovócito imaturo que podem ter sido otimizadas com a utilização deste novo procedimento e ter proporcionado resultados muito superiores de taxas embrionárias a partir de ovócitos imaturos de bovinos. Nas últimas décadas as pesquisas estiveram voltadas ao aprimoramento dessa técnica, onde foram testadas múltiplas associações de crioprotetores e diferentes dispositivos para armazenagem visando principalmente a redução do volume dos crioprotetores e o aumento da velocidade de congelamento. (KUWAYAMA et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo são promissores, pois apontam o potencial desse método, para a criopreservação de ovócitos bovinos. Com base nessas informações, foi possível propor um novo protocolo e com isso melhorar a resposta dos ovócitos viabilizando a sua utilização nas técnicas de reprodução assistida.

8 CONCLUSÃO

A vitrificação de ovócitos bovinos tanto pelo método *OPS* como pelo método *Cryotop*, é hoje a técnica que mais demonstra resultados promissores em termos de preservação de gametas femininos de bovinos. De acordo com os resultados observados neste estudo é possível concluir que o método de vitrificação por *Cryotop* com o protocolo proposto neste estudo é menos prejudicial ao ovócito vitrificado imaturo do que o método *OPS* de vitrificação, gerando assim melhores taxas embrionárias do que as já obtidas em outros estudos até hoje. As taxas de maturação nuclear assim como as taxas de produção embrionária encontradas neste estudo indicam que a combinação dos crioprotetores, os tempos de equilíbrio ou até mesmo os procedimentos de vitrificação realizados foram mais eficazes na preservação da integridade dos ovócitos do que os já descritos na literatura, os quais não encontraram tal eficiência na produção de embriões a partir de ovócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* vitrificados com uso dos mesmos crioprotetores e hastes.

9 REFERÊNCIAS

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

AMAN, R.R. e PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103-110, 1994.

ARAV, A., ZERON, Y., LESLIE, S.B., BEHBOODI, E., ANDERSON, G.B., CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 33, p. 589-599, 1996.

ASSEY RJ, HYTTEL P, GREVE T, PURWANTARA B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Mol. Reprod. Dev.** V.37 p.335-344. 1994

BOGLIOLO L., ARIU F., FOIS S., ROSATI I., ZEDDA M.T., LEONI G., SUCCU S., PAU S. & LEDDA S.. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. **Theriogenology**. V. 68 p.1138-1149. 2007

BRANDÃO, D.O. Vitriificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação *in vitro*. Belo Horizonte, MG: UFMG. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

CAMARGO, L.S.A. Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos com 1,2 propanodiol. Itaguaí, RJ: UFRRJ. 62 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.

CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science**. V. 92, P. 29-36, 2006.

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

CHEN S.U., LIEN Y.R., CHENG Y.Y., CHEN H.S., HO H.N. & YANG Y.S.. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**. V.16, p. 2350-2356, 2001.

COBO A., Domingo J., Pérez S. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. **Clin Transl Oncol**. V.10, p. 268-73. 2008.

COSTA, E.P., GUIMARÃES, J.D., TORRES, C.A.A., FAGUNDES, L.M., GIOSO, M.M. Criopreservação de ovócitos de bovinos imaturos desnudados ou não, utilizando o etilenoglicol pelo método da vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.º 3, p. 1122-1129, 2002.

COTICCHIO, G., BONU, M.A., BORINI, A., FLAMIGNI, C. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. V. 115S, p. S2-S7, 2004.

DE SOUZA, M. R. et al. Vitriificação de ovócitos imaturos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 55, n. 5, p. 580-587, 2004.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GOMEZ, E.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C . . ; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**. v. 64, p. 317-33,2005.

DOBRINSKY J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, V.57, p.285-302, 2002.

EBRAHIMI, B.; VALOJERDI, M. R.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; BAHARVAND, H.; FARROKHI, A. IVM and gene expression of sheep cúmulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 20, p. 26-34, 2010.

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

FAIR T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**. Oct 15;78(3-4):203-16. Review 2003.

FERREIRA, E.M; VIREQUE, A.A.; ADONA , P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n.5, p.836-848, 2009.

FIGUEIREDO JR, RODRIGUES APR, AMORIM CA, SILVA JRV. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca. p.303-327, 2008.

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

GALBINSKI, S.; BOS-MIKICH, A. e FERRARI, A. N. Viabilidade e fertilização *in vitro* de ovócitos bovinos após vitrificação. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet. [online]**. v. 25, n. 8, p. 553-559, 2003.

GANDOLFI BTAL, GANDOLFI F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology** 2001;55:1255-1276.

GASPARRINI B. ET AL. Cryopreservation of *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. **Animal Reproduction Science**. V. 98, P. 335-342, 2007.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**. v. 82-83, p. 431-46, 2004.

GONÇALVES, P.B.D., VISINTIN, J.A., OLIVEIRA, M.A.L., MONTAGNER, M.M., COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO,

J.R. e FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo (Brasil): Livraria Varela. p. 195-226, 2002.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 49, p. 787-96, 1998.

HURTT, A.E. et al. Vitrification of immature and mature equine and bovine Oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**. v.54, p. 119-128, 2000.

HYTTEL P, VAJTA G, CALLESEN H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultra structural consequences. **Mol. Reprod. Dev.** v.56, p. 80–88, 2000.

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

ISACHENKO E., ISACHENKO V., RAHIMI G. & NAWROTH F.. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **Eur J Obstet Gynecol Reprod.** v.108, p. 186-193. 2003.

ISACHENKO V , MONTAG M , ISACHENKO E , VAN DER VEN H . Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen . **Fertility and Sterility** .v.84 p.1011–1016. 2005

JONES A, VAN BLERKOM J, DAVIS P. AND TOLEDO A. A. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. **Hum Reproduction** V. 19, p. 1861-1866. 2004.

KAIDI et al., Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**. V.65, p. 1127-1134, 2001.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive Biomedicine online**. v. 9, p. 164-70, 2004.

KATAYAMA K. P., STEHLIK J , KUWAYAMA M , et al. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy . **Fertility and Sterility**. v.80 p.223–224. 2003

KIM, D. H.; PARK, H. S.; KIM, S. W.; HWANG, I. S.; YANG, B. C.; IM, G. S.; CHUNG, H. J.; SEONG, H. W.; MOON, S. J.; YANG, B. S. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. **The Journal of reproduction and development**. v. 53, p. 843-51, 2007.

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

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**. p.1300–1308.2005a.

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

LAOWTAMMATHRON C, LORTHONGPANICH C, KETUDAT-CAIRNS M, HOCHI S, PARNPAI R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology**, v.64, p.1185-1196, 2005.

LIEBERMANN J , TUCKER MJ , GRAHAM J , et al. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette . **Reproductive BioMedicine Online**.v.4 p.146–150. 2002

LIU, YING et al., Comparison of Efficiency of *Open Pulled Straw* (ops) and *Cryotop* Vitrification for Cryopreservation of *In vitro* Matured Pig Oocytes. V.29, p. 315-320, 2008.

LONERGAN P., RIZOS D., GUTIERREZ-ADAN A., FAIR T. & BOLAND M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**. V. 38, p. 259-267, 2003a

LONERGAN P., RIZOS D., KANKA J., NEMCOVA L., MBAYE A.M., KINGSTON M., WADE M., DUFFY P. & BOLAND M.P.. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**. V. 126, p.337-346. 2003b

LOÂPEZ-BEÂJAR M AND LOÂPEZ-GATIUS F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology** v.58, p. 1541±1552. 2002

LUCENA E , BERNAL DP , LUCENA C , et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes . **Fertility and Sterility**. v.85 p.108–111. 2006

LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocyte at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Anim. Reprod. Sc.**, v.68, p.23-28, 2001.

LUVONI, G.C., PELIZZARI, P. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. **Theriogenology**, v. 53, p. 1529-1540, 2000.

MARTINS, R. D. ; COSTA, E. P. ; CHAGAS, Juliana Silva de Carvalho ; Ignácio, Fernanda Saules ; TORRES, Ciro Alexandre Alves . Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p. 128-134, 2005.

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

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

MAYES, M. A. e SIRARD, M. A. The influence of cúmulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**. V. 55, n.4, p. 911-922, 2001.

MEINECKE B, JANAS U, PODHAJSKY E, MEINECKE-TILLMANN S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36 p.183-188. 2001.

MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, E. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-674, 2003.

MEZZALIRA, A., MEZZALIRA, J.C., BARBIERI, D.P., LOHN, L., SANTOS, R.M., VIEIRA, A.D., DAMIANI, J.C. Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: Avaliação de dois protocolos. **Acta. Scientiae Veterinariae**, v.31, p-480-481, 2003 (Abstract).

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

MORATÓ, R. et al. *Cryotop* versus open-pulled straws (*OPS*) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, p. 137-141, 2008.

PALASZ, A. T. e MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, n.2, p.127-149. 1996.

PARK, S.E., LEE, K.A., SON, W.Y., KO, J.J., LEE, S.H., CHA, K.Y. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v. 68, p. 920-926, 1997.

PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryo following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal Reproduction Science**, v.58, p. 9-22, 2000.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**. v. 313, p. 573-5, 1985.

RODRIGUEZ K. F. E FARIN C. E. Developmental capacity of bovine cumulus oocyte complexes after transcriptional inhibition of germinal vesicle breakdown. **Theriogenology**. V. 61 p.1499–1511. 2004.

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

SHAW, J.M., KULESHOVA, L.L., MAC FARLANE, D.R., TROUSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, Gainesville, v.53, n.1, p.59-72, 2000.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. V. 65, p. 126-36, 2006.

SUCCU S., LEONI G.G., BERLINGUER F., MADEDDU M., BEBBERED., MOSSA F., BOGLIOLO L., LEDDA S. & NAITANA S.. Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. **Theriogenology**. V. 68, p.107-114. 2007

THOMAZ BAC. Et al. Aspectos histológicos do ovário de coelhas após criopreservação. **Rev Bras Ginecol Obstet**; vol.27, n.11, p. 642-9, 2005.

USHIJIMA H, ESAKI R, YOSHIOKA H, KUWAYAMA M, NAKANE T, NAGASH- IMA H. Improved survival of cryopreserved porcine morulae. **Theriogenology**; 59:316(abstract). 2003.

VAJTA, G.; BOOTH, P. J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (*OPS*) method. **Cryo-Letters**, v.18, p.191- 195, 1997

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

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

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**. v. 65, p. 236-44, 2006.

VICENT C, JOHNSON MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocytes. **Oxford Rev Reprod Biol.** V.14 .73–1001. 992.

WANI NA, MAURYA SN, MISRA AK, SAXENA VB, LAKHCHAURA BD. Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology.** V.61 p. 831–842. 2004

WHITTINGHAM, D. G. , LEIBO, S.P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to -196°C and -296°C . **Science**, Washington, v.178, p. 411-414, 1972.

WU, B., TONG, J., LEIBO, S.P. Effect of cooling bovine germinal vesicle stage oocyte on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 388-395, 1999.

YAMADA, C.; CAETANO, H.V.A.; SIMOES, R.; NICACIO, A.C.; FEITOSA, W.B.; D'AVILA, M.E.O.; ASSUMPÇÃO, J.A.V. Comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.

YANG, B.; TUANY, F.; RUMPF R.; DODE M.A. N. Comparison of Vitrification Methods on the Viability of Bovine Immature Oocyte. In: THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION 2010 ANNUAL MEETING, 43., 2010, Wisconsin, **Anais The Intersection Between Genetics, Genomics, and Reproductive Biology**, Wisconsin: The Society for the Study of Reproduction Canada, p. 72, 2010.

YAVIN S. & ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology.** V. 67, p. 81-89. 2007.