

Elisa Caroline da Silva Santos

Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Biotécnicas da Reprodução Animal).

Orientador: João Carlos Deschamps

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Prof. João Carlos Deschamps

Prof^a. Denise Calisto Bongalhardo

Prof^a. Maria Gabriela Tavares Rheingantz

Prof. Thomaz Lucia Junior

Dedico este trabalho à minha família, que com amor, me deram apoio e incentivo para caminhar em busca de meus ideais.

AMO MUITO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por cada momento vivido.

A minha família, principalmente, Zélia Tavares, Catarina Tavares, Paulo e Patrícia e Daiane, pelo amor, apoio e confiança.

Ao Leandro Ribas pelo apoio e paciência durante a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Deschamps, pela orientação e apoio técnico-científico.

Ao Prof. Thomaz Lucia Junior, pela amizade e apoio concedido.

Às amigas e colegas de Pós-graduação Gissele Rambo, Priscila de Leon, Carine Corcini e Karina Goularte pelo alegre convívio, amizade, incentivo e apoio para a realização deste trabalho, sem elas não seria possível à realização desta pesquisa.

Aos amigos e funcionários do Centro de Biotecnologia, especialmente a Alegani, Simone Simionatto, Vanusa da Hora, Silvana Marchioro, Mariana Coutinho, Carina Moraes e Sibeles Borsuk.

À todos os amigos do PigPel.

Aos amigos, Milton Amado, Vera Monks, Leila Santos de Sousa, pela dedicação, amizade e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho no Biotério Central da Universidade.

Ao Frigorífico Mercosul, pela concessão dos ovários e seus funcionários Maria e Cardoso pela ajuda durante as coletas.

Aos amigos Ariadne e Francisco que mesmo distantes, me apoiaram e deram forças para continuar sempre.

Ao MSc. Daniel Saul pelos ensinamentos transmitidos durante treinamento no Instituto de Tecnologia do Paraná.

A família Wendt pelo apoio e amizade durante minha estada em Pelotas.

A todos que me incentivaram e colaboraram de alguma forma para a realização desta pesquisa.

Obrigada!

Resumo

SANTOS, Elisa Caroline da Silva Santos. **Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e bovinos.** 2008, 48 f., Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas.

A vitrificação de oócitos é uma metodologia valiosa para a conservação de material genético. Este trabalho comparou o efeito dos métodos de vitrificação OPS e SSV, com adição de copolímero SupercoolTM X-1000 (copolímero), sobre a viabilidade de oócitos maduros murinos e oócitos bovinos imaturos. Os oócitos foram vitrificados em OPS e SSV, ambos com as concentrações de copolímero: 0%, 0,1% e 1% e o controle não foi vitrificado. No primeiro experimento, os oócitos maduros murinos vitrificados foram avaliados quanto à viabilidade de membrana e no segundo experimento, quanto à clivagem. A concentração 0,1% de copolímero foi superior ($P>0.05$) em ambos os métodos no primeiro experimento. No segundo experimento, o tratamento SSV 0% apresentou resultado inferior ($P<0.05$) (9,2%) ao controle (26,6%). No terceiro experimento, oócitos bovinos imaturos foram vitrificados e avaliados quanto à taxa de maturação e viabilidade de membrana. Aparentemente, segundo observações numéricas, os resultados de todos os tratamentos parecem ser inferiores ao controle. Os resultados desta pesquisa indicam que ambos os métodos podem ser utilizados com a concentração 0,1% de copolímero, na vitrificação de oócitos murinos maduros. No entanto, a vitrificação, seguindo os protocolos utilizados nesta pesquisa, não é indicada para a criopreservação de oócitos bovinos imaturos.

Palavras- chave: Vitrificação. OPS. SSV. Supercool X-1000TM. Oócitos.

Abstract

SANTOS, Elisa Caroline da Silva. **Effect of the vitrification methods OPS and SSV, with inclusion of a synthetic ice blocker, on the viability of mice and bovine oocytes.** 2008. 48 p., Master's Dissertation - Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas.

Oocyte vitrification is a valuable tool for preservation of genetic material. This study compared the effects of vitrification in OPS and SSV, with addition of Supercool™ X-1000 (copolymer), on the viability of mature murine oocytes and immature bovine oocytes. Oocytes were vitrified in OPS and SSV, with addition of 0.1%, 1.0% copolymer and without copolymer, besides a control group with no vitrification. Murine oocytes were evaluated for membrane viability, in the first experiment, and for cleavage rate, in the second experiment. Results were superior with the concentration of 0.1% copolymer, for both methods, in the first experiment. In the second experiment, the SSV method without copolymer presented lower cleavage rate (9.2%) than the control group (26.6%). In the third experiment, bovine oocytes were vitrified and evaluated for maturation and membrane viability, but the results were numerically inferior than those for the control group, for both methods. Those results indicate that both vitrification methods can be used with inclusion of 0.1% of copolymer, for mature murine oocytes, considering membrane viability, but the SSV method without copolymer should not be used due to its low cleavage rate. However, the procedures tested in this study are not recommended for cryopreservation of bovine oocytes.

Key- words: Vitrification. OPS. SSV. Supercool™ X-1000. Oocytes.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Viabilidade de membrana de oócitos de camundongos vitrificados através dos métodos OPS e SSV	28
Tabela 2	Integridade de membrana de oócitos de camundongos submetidos aos métodos de vitrificação (OPS ou SSV) em soluções de vitrificação com diferentes concentrações de copolímero	28
Tabela 3	Clivagem de oócitos murinos fecundados <i>in vitro</i> após vitrificação em OPS e SSV utilizando diferentes concentrações de copolímero	29
Tabela 4	Maturação de oócitos imaturos bovinos vitrificados através dos métodos OPS e SSV	29
Tabela 5	Maturação de oócitos bovinos imaturos vitrificados através dos métodos OPS e SSV com diferentes quantidades de copolímero	30
Tabela 6	Viabilidade de membrana de oócitos imaturos bovinos vitrificados através métodos OPS e SSV com diferentes quantidades de Copolímero	30
Tabela 7	Viabilidade de membrana de oócitos imaturos bovinos vitrificados através dos métodos OPS e SSV	31

Lista de abreviaturas e Siglas

Albumina sérica bovina – BSA
Complexo Cumulus- oócito- COC's
Diacetato de Fluoresceína- FDA
Dimetilsulfóxido- DMSO
Etilenoglicol-EG
Fecundação *in vitro*- FIV
Gás Carbônico- CO₂
Glicoproteínas anti-congelamento- AGFPs
Gonadotrofina Coriônica eqüina- eCG
Gonadotrofina Coriônica humana-hCG
Grupo controle- TC
Hormônio Folículo Estimulante- FSH
Intraperitonal- i.p.
Iodeto de Propídeo-PI
Maturação *in vitro*- MIV
Metáfase II- MII
Microlitros- µl
Minutos-min
Nitrogênio Líquido- N₂L
Polivinil Álcool- PVA
Polivinilpirrolidone-PVP
Proteínas Anti-congelamento-AFPs
Quebra de vesícula germinativa- QVG
Qui-quadrado- χ^2
Segundos- Seg
Solução 1- VS1
Solução 2- VS2
Soro Fetal Bovino-SFB

Ultravioleta-UV

Vesícula germinativa- VG

Vitrificação em palheta aberta estendida- OPS

Vitrificação em superfície sólida- SSV

Sumário

Banca examinadora	2
Dedicatória	3
Agradecimentos	4
Resumo	5
Abstract	6
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	8
1. Introdução Geral	11
Artigo: Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e bovinos.....	18
Resumo	19
Abstract	20
1. Introdução	21
2. Materiais e métodos	23
2.1 Experimento 1: Viabilidade de membrana de oócitos murinos.....	23
2.1.2 Coleta de oócitos.....	23
2.1.3 Vitrificação.....	23
2.1.4 Desvitrificação.....	24
2.1.5 Avaliação da viabilidade.....	24
2.2. Experimento 2: Fecundação <i>in vitro</i> de oócitos vitrificados de camundongos	25
2.2.1 Fecundação <i>in vitro</i>	25
2.3 Experimento 4: Vitrificação de oócitos imaturos bovinos.....	25
2.3.1 Coleta de oócitos bovinos	25
2.3.2 Vitrificação	26
2.3.3 Maturação	26
2.3.4 Avaliação da viabilidade.....	26
2.4 Análise Estatística.....	26

3.Resultados.....	
4. Discussão.....	31
5. Conclusões.....	35
6.Referências	36
2.Conclusão Geral.....	41
3.Considerações Finais	42
4.Referências Gerais	43

1. Introdução Geral

A criopreservação de oócitos e embriões, representa um passo essencial para a aplicação de outras tecnologias da reprodução assistida, tanto na reprodução animal, quanto na reprodução humana. Desde a primeira publicação sobre congelamento de embriões de camundongos (realizada por Whittingham *et al.* 1972), a criopreservação de embriões tem sido amplamente utilizada para a manutenção de recursos genéticos de animais domésticos e selvagens. Atualmente, é um método efetivo e estabelecido para armazenar embriões de um grande número de espécies de mamíferos, como bovinos (WURTH *et al.*, 1994), camundongos de laboratório (WHITTINGHAM *et al.*, 1972) e também em humanos (COHEN *et al.*, 1988). A criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) representa uma ferramenta indispensável para dinamizar e difundir o processo da PIV (MEZZALIRA *et al.*, 2002).

No entanto, existem situações, tanto na reprodução humana, quanto na reprodução animal, nas quais a opção de armazenar embriões não existe e é preferível armazenar oócitos não fecundados. Segundo Mezzalira *et al.* (2002) a habilidade de congelar oócitos pode ser valiosa para preservar importantes linhagens genéticas, oferecendo uma série de vantagens como a preservação de material para o estabelecimento de bancos genéticos para uso futuro, proporcionando assim, a otimização do aproveitamento de gametas femininos. Além disso, Quinn (2005) afirmou que resultados obtidos na criopreservação de oócitos murinos podem ser usados como modelo para a criopreservação de oócitos humanos. Na medicina humana, o desenvolvimento de uma técnica de criopreservação de oócitos poderá beneficiar pacientes com problemas oncológicos, de fertilidade, portadores de doenças genéticas, ou até mesmo, aqueles que necessitem adiar a gestação por motivos pessoais ou profissionais (GALBINSKI *et al.*, 2003).

O rápido desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida como a maturação, a fertilização e o cultivo *in vitro*, conduziu a um aumento da necessidade de criopreservação de oócitos mamíferos. A possibilidade de criopreservar com sucesso oócitos bovinos imaturos, permitiria seu armazenamento após a punção folicular realizada a campo, eliminando a necessidade de um laboratório para fecundação *in vitro* próximo aos locais de aspiração, o que otimizaria a PIV. Desse

modo, figuram como imprescindíveis os procedimentos de congelamento de gametas femininos (COSTA *et al.*, 2002).

Devido ao desenvolvimento relativamente baixo de embriões procedentes de oócitos congelados, estes não têm sido amplamente utilizados (CETIN e BASTAN, 2006). As taxas de sucesso da criopreservação de oócitos humanos ainda são inconsistentes e inconstantes na sobrevivência oocitária, fecundação *in vitro*, clivagem, assim como taxas de gestação e de nascimento (KO *et al.*, 2007). Em bovinos, os resultados ainda não são satisfatórios a ponto de justificarem seu emprego como uma técnica economicamente viável (COSTA *et al.*, 2002). Diferentemente do que ocorre com oócitos murinos, os quais já foram criopreservados com sucesso (CARROL *et al.*, 1993; WOOD *et al.*, 1993; HUANG *et al.*, 2007)

Em bovinos, a atenção estava sendo focada na criopreservação de oócitos maduros. Entretanto, neste estágio o oócito se encontra em metáfase II (MII), apresentando o primeiro corpúsculo polar extruso e cromossomos arranjados no fuso meiótico (FABBRI *et al.*, 2000). A criopreservação nesta fase pode ocasionar anomalias, devido à ruptura da arquitetura do citoesqueleto, pois a organização apropriada do fuso meiótico é essencial para o alinhamento correto e segregação dos cromossomos (FABBRI *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2002). Neste contexto, Sauders e Parks (1999) relataram que o fuso meiótico em oócitos em MII é extremamente suscetível a danos durante o congelamento, o que relaciona a criopreservação com a baixa competência de desenvolvimento.

Por outro lado, oócitos imaturos, em fase de prófase da primeira divisão meiótica e com vesícula germinativa (VG) proeminente, ainda não tiveram o fuso meiótico formado (FRIEDLER *et al.*, 1988, VAN BLERKOM, 1989). Estes oócitos, teoricamente, seriam mais resistentes a criopreservação, devido à cromatina estar protegida em uma vesícula limitada por membrana e por evitar danos ao fuso (SAUDERS e PARKS, 1999). Entretanto, assim como os oócitos em metáfase II, em oócitos imaturos, a criopreservação provoca aumento nos índices de poliploidia e diminuição das taxas de fecundação (FRIEDLER *et al.*, 1988; MIKICH *et al.*, 1988). Hochi *et al.* (1998) relacionaram este fato às células adjacentes ao oócito imaturo, as células da corona radiata, devido a estas apresentarem longas extensões citoplasmáticas, as quais penetram na zona pelúcida e se expandem associando-se com a membrana do oócito. A presença de comunicação intercelular, através de

junções gap, entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito, têm importante papel na cooperação metabólica durante o recomeço da meiose, para finalizar a maturação do oócito. Contudo, Le gal e Massip (1999) sugerem que estas comunicações celulares podem apresentar sensibilidade à criopreservação, fato que explicaria o insucesso da criopreservação em oócitos imaturos de várias espécies. Tanto oócitos quanto embriões sofrem danos morfológicos ou funcionais consideráveis durante a criopreservação (VAJTA E KUWAYAMA, 2006). Estes autores relataram que a extensão da lesão depende de vários fatores, tais como, tamanho, forma celular, permeabilidade da membrana, qualidade e sensibilidade de oócitos e embriões. Entretanto, todos esses fatores podem variar entre espécies, estágio do desenvolvimento e ainda quanto à origem, ou seja, se foi produzido *in vitro* ou *in vivo*.

Fatores morfológicos também explicam a baixa viabilidade de oócitos criopreservados, como a qualidade oocitária (MEN *et al.*, 2002) e, pelo fato de apresentarem-se como uma célula única, com grande tamanho (maior célula dos mamíferos), alta relação volume/superfície, presença de uma membrana simples, sensibilidade dos fusos metafásicos ao resfriamento, presença de zona pelúcida, além de muitas camadas de células da granulosa que formam o complexo *cumulus*-oócito (LE GAL e MASSIP 1998 e 1999). Estas características comprometem o influxo ou o efluxo dos crioprotetores no oócito (FABRI *et al.*, 2000).

O resfriamento de oócitos até 24 °C não altera a formação dos fusos meióticos. No entanto, o resfriamento a 4 °C ou menos, por apenas 10 minutos, reduz a formação dos fusos normais e a taxa de fecundação (WU *et al.*, 1998). Muitos oócitos e embriões têm a capacidade de reparar estes danos plenamente ou parcialmente, podendo dar continuidade ao desenvolvimento normal (VAJTA e KUWAYAMA, 2006). Estes autores afirmaram que o propósito da criopreservação é de minimizar os danos e auxiliar as células a se regenerarem.

As formas mais comuns de criopreservação do gameta feminino são o congelamento lento e a vitrificação. No congelamento lento, os oócitos são gradativamente expostos a temperaturas cada vez mais baixas, a partir do equipamento programável que realiza automaticamente a velocidade de resfriamento requerida. Diversos autores associaram o congelamento lento com alterações como dispersão cromossômica, despolimerização dos microtúbulos, modificações nos fusos (SAUNDERS e PARKS, 1999; WU *et al.*, 1998) e interrupção

celular (FABBRI *et al.*, 2000). Os métodos de congelamento lento implicam na precipitação da água em gelo, sendo que, durante este processo, vários danos podem ocorrer, como a formação intracelular de cristais de gelo e também danos gerados pela alta concentração de solutos (AMBROSINI *et al.*, 2006). Dentro deste contexto, evidencia-se a necessidade de novas estratégias para a prevenção destas lesões.

Durante as últimas décadas, vários métodos de criopreservação de oócitos e embriões foram desenvolvidos. Entre estes métodos, a vitrificação foi considerada por Vajta *et al.* (2006), um método viável para a preservação de oócitos e embriões. Segundo este autor, vitrificação é o fenômeno da solidificação da água sem a formação de cristal de gelo. Entretanto, o termo também se refere à fase de transição de soluções aquosas, entre o estado líquido e o estado vítreo (sólido) (AMBROSINI *et al.*, 2006). O processo pode ser descrito como extremo aumento da viscosidade das soluções, com benefícios inquestionáveis, como a eliminação dos cristais de gelo (VAJTA e KUWAYAMA, 2006), causa mais perigosa da “crioinjúria” (DHALI *et al.*, 2007). Esta técnica foi primeiramente utilizada em torno de 70 anos atrás por Luyet *et al.*, (1937) na preservação de tecidos biológicos. A partir disso, vários métodos de vitrificação tem sido desenvolvidos, como palheta aberta estendida (OPS - VAJTA *et al.*, 1998), microgotas (PAPIS *et al.*, 2000), grades de microscópio eletrônico (MARTINO *et al.*, 1996), *hemi-straw* (VANDERZWALMEN. *et al.*, 2003), *nylon mesh* (MATSUMOTO *et al.*, 2001), *cryoloop* (LANE *et al.*, 1999), *cryotop* (HOCHI *et al.*, 2001) e vitrificação em superfície sólida (SSV – DINNYES *et al.*, 2000).

Deste modo, Galbinski *et al.*, (2003) relatou que durante a vitrificação os oócitos são expostos de maneira muito rápida a baixas temperaturas e, quase imediatamente após seu contato com a solução crioprotetora, são congelados. No entanto, para a formação do estado vítreo, são necessárias altas concentrações de crioprotetor (VAJTA, 2000) e extremo aumento das taxas de congelamento/reaquecimento (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

A respeito da importância dos crioprotetores penetrantes, os quais evitam a formação de gelo dentro da célula, Arav *et al.* (1993) afirmou que a alta concentração requerida nas soluções de vitrificação é tóxica e pode causar alteração osmótica. A fim de minimizar a toxicidade das soluções, Vajta *et al.* (2000), sugeriram a utilização de substâncias menos tóxicas, a associação de diferentes

crioprotetores, a exposição prévia a menores concentrações de crioprotetores e a redução do tempo de exposição à solução de vitrificação.

Neste contexto, Wowk *et al.* (2000) propuseram o uso de um polímero sintético, formado por polivinil álcool, denominado X-1000 (Supercool™ 21st Century Medicine Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA), para evitar a formação de gelo intracelular. Estes mesmos autores sugerem que este polímero se assemelha em funcionalidade com as proteínas anticongelamento (AFPs) e com as glicoproteínas anticongelamento (AGFPs), presentes em peixes polares e em alguns insetos, as quais permitem um super resfriamento dos fluídos corporais abaixo da temperatura de equilíbrio de congelamento. Entretanto, polímeros como o X-1000 (copolímero) apresentam menor custo e podem ser produzidos em larga quantidade, diferentemente das proteínas anticongelamento. Wowk *et al.* (2000) também relacionam o copolímero com a redução da toxicidade dos crioprotetores, devido a sua capacidade de se fixar e inativar impurezas, as quais podem levar à formação de gelo em água ou outras soluções.

Carrol *et al.* (1993) relataram pela primeira vez que oócitos de camundongos podem ser criopreservados com sucesso utilizando PVA no meio criopreservação, no entanto, obtiveram baixa fecundação. Macedo *et al.*, (2006) adicionaram 1% de copolímero no meio de vitrificação e obtiveram bons resultados quanto ao teste de penetração *in vitro* de oócitos suínos vitrificados.

A vitrificação de oócitos já foi obtida com sucesso em diversas espécies de mamíferos, incluindo, camundongos (FAHY *et al.*; 2004 e MEN *et al.*, 1997), bovinos (OTOI *et al.*, 1998; LE GAL e MASSIP, 1999; LIM *et al.*, 1999) e humanos (HUNTER *et al.*, 1995). Em bovinos, já foram produzidos blastocistos a partir de oócitos imaturos vitrificados (KÜCHENMEISTER *et al.*, 1997) e nascimentos (SUZUKI *et al.*, 1996; VIEIRA *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007). No entanto, as taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e de nascimento, ainda são consideradas baixas, quando comparadas com as obtidas com oócitos frescos (LI *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2002). A fim de obter melhores taxas de desenvolvimento embrionário estão sendo propostos métodos de vitrificação que utilizam pouco volume de meio, como OPS ou SSV.

O método de vitrificação que utiliza palheta estendida (OPS), desenvolvido por Vajta *et al.* (1998) é simples, de baixo custo e proporcionou um grande aumento na velocidade de congelamento, devido à redução do volume de meio crioprotetor e

ao afinar a camada da palheta, a qual separa o agente de congelamento, o Nitrogênio Líquido (N_2L), da solução de vitrificação. Chen *et al.* (2000) avaliaram a utilização do método OPS em oócitos de camundongos, e consideraram que o método OPS preserva a morfologia do fuso e de cromossomos, resultando em melhores resultados do que as palhetas tradicionais.

Já o método de vitrificação em superfície sólida (SSV), desenvolvido por Dinnyes *et al.* (2000) também é simples, e em relação às vantagens que o método OPS apresenta, oferece melhorias, como a eliminação da camada que separa as amostras do N_2L , sendo este um dos obstáculos para aumento de taxas no método OPS, pois ao mergulhar uma palheta dentro do N_2L se forma uma camada de gás em torno da parede da palheta por alguns segundos. O método SSV minimiza este problema, aumentando ainda mais as velocidades de congelamento.

Em ambos os métodos de vitrificação são utilizados tempos de exposição curtos em altas concentrações de crioprotetores, antes e após o congelamento, diminuindo assim os seus efeitos tóxicos. Estes métodos de vitrificação melhoraram as taxas de desenvolvimento e de nascimento, sendo considerados métodos viáveis por Li *et al.*, (2002). Desta maneira, a vitrificação é considerada um procedimento promissor para a criopreservação de oócitos e embriões. Um dos maiores desafios seria estabelecer um método de vitrificação aplicável em diferentes espécies e estágios de desenvolvimento do oócito (VAJTA *et al.*, 2000).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a integridade de membrana e a viabilidade de oócitos imaturos bovinos e oócitos maduros de camundongos, vitrificados através dos métodos de palheta estendida (OPS) e superfície sólida (SSV), ambos com diferentes concentrações de SupercoolTM X-1000.

Efeito dos métodos de vitrificação, OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo, sobre a viabilidade de oócitos de camundongos e bovinos

(Artigo nas normas da Revista Ciência Animal Brasileira)

EFEITO DOS MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO, OPS E SSV, COM ADIÇÃO DE BLOQUEADOR SINTÉTICO DE GELO, SOBRE A VIABILIDADE DE OÓCITOS DE CAMUNDONGOS E BOVINOS

Elisa Caroline da Silva Santos^{1,2}, Priscila Marques Moura de Leon¹, Gissele Rambo¹, Carine Dahl Corcini¹, Thomaz Lucia Jr¹, João Carlos Deschamps¹

¹Laboratório de Biotécnicas da Reprodução, Centro de Biotecnologia
Campus universitário s/n - Caixa Postal 354 – CEP 96010-9000
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS

²Correspondência ao autor: Email: elisa_css@hotmail.com

Resumo

A vitrificação de oócitos é uma metodologia valiosa para a conservação de material genético. Este trabalho comparou o efeito dos métodos de vitrificação OPS e SSV, com adição de bloqueador sintético de gelo (SupercoolTM X-1000, copolímero), sobre a viabilidade de oócitos maduros murinos e oócitos bovinos imaturos. Os oócitos foram vitrificados em OPS e SSV, ambos com as concentrações de copolímero: 0%, 0,1% e 1% e o controle não foi vitrificado. No primeiro experimento, os oócitos maduros murinos vitrificados foram avaliados quanto à viabilidade de membrana e no segundo experimento, quanto à clivagem. A concentração 0,1% de copolímero foi superior ($P>0.05$) em ambos os métodos no primeiro experimento. No segundo experimento, o tratamento SSV 0% apresentou resultado inferior ($P<0.05$) (9,2%) ao controle (26,6%). No terceiro experimento, oócitos bovinos imaturos foram vitrificados e avaliados quanto à taxa de maturação e viabilidade de membrana. Aparentemente, segundo observações numéricas, os resultados de todos os tratamentos parecem ser inferiores ao controle. Os resultados desta pesquisa indicam que ambos os métodos podem ser utilizados com a concentração 0,1% de copolímero, na vitrificação de oócitos murinos maduros. No entanto, a vitrificação, seguindo os protocolos utilizados nesta pesquisa, não é indicada para a criopreservação de oócitos bovinos imaturos.

Palavras- chave: Vitrificação. OPS. SSV. SupercoolTM X-1000. Oócitos.

Abstract

Oocyte vitrification is a valuable tool for preservation of genetic material. This study compared the effects of vitrification in OPS and SSV, with addition of ice blocker (SupercoolTM X-1000, copolymer), on the viability of mature murine oocytes and immature bovine oocytes. Oocytes were vitrified in OPS and SSV, with addition of 0.1%, 1.0% copolymer and without copolymer, besides a control group with no vitrification. Murine oocytes were evaluated for membrane viability, in the first experiment, and for cleavage rate, in the second experiment. Results were superior with the concentration of 0.1% copolymer, for both methods, in the first experiment. In the second experiment, the SSV method without copolymer presented lower cleavage rate (9.2%) than the control group (26.6%). In the third experiment, bovine oocytes were vitrified and evaluated for maturation and membrane viability, but the results were numerically inferior than those for the control group, for both methods. Those results indicate that both vitrification methods can be used with inclusion of 0.1% of copolymer, for mature murine oocytes, considering membrane viability, but the SSV method without copolymer should not be used due to its low cleavage rate. However, the procedures tested in this study are not recommended for cryopreservation of bovine oocytes.

Key- words: Vitrification. OPS. SSV. SupercoolTM X-1000. Oocytes.

1. Introdução

A criopreservação de oócitos é a biotécnica que permite o armazenamento de gametas femininos por longos períodos. Esta biotecnologia proporcionou uma série de vantagens, como a conservação de espécies, tratamentos de infertilidade e preservação de material para estabelecimento de bancos genéticos. Oócitos de camundongos podem ser usados como modelo para a criopreservação de oócitos humanos, bovinos e espécies ameaçadas de extinção (Stachecki *et al.*, 1998).

Neste contexto, a criopreservação de oócitos na reprodução humana pode se tornar uma alternativa, devido às complicações éticas e legais relatadas para embriões (Coticchio *et al.*, 2004). Já em bovinos, a possibilidade de criopreservação de oócitos imaturos permite seu armazenamento logo após a punção folicular, eliminando a necessidade de fecundação *in vitro* em locais próximos a punção, otimizando assim, a produção *in vitro* de embriões (PIV) (Yamada *et al.*, 2007).

A criopreservação de oócitos já foi realizada em diversas espécies. No entanto, a eficiência no desenvolvimento de embriões procedentes de oócitos criopreservados ainda é muito baixa (Cetin e Bastan, 2006). Um dos fatores que limita o sucesso é a ocorrência de injúrias, pois as células são expostas a variados tipos de estresse, durante a criopreservação, como a formação de gelo intra ou extracelular, desidratação descontrolada e formação de bolha de gás (Arav *et al.*, 1993). Além disso, oócitos e pronúcleos são mais vulneráveis a danos na membrana celular que embriões 2-8 células ou em estágios posteriores (Bernart *et al.*, 1994).

Tanto oócitos maduros, quanto imaturos, apresentam sensibilidade ao congelamento, sendo que, em maduros pode ocorrer ruptura do citoesqueleto e injúrias no fuso meiótico (Aman e Parks, 1994). Já os imaturos se intercomunicam com as células do *cumulus-oophorus*, através de junções gap. Essa comunicação tem importante papel na cooperação metabólica durante o recomeço da meiose, para finalizar a maturação do oócito (Hochi *et al.*, 1998) e poder ser sensível a criopreservação. A permeabilidade de membrana também é diferente com relação ao estágio de maturação do oócito (Magnusson *et al.*, 2007). Oócitos maduros apresentam maior permeabilidade ao crioprotetor e à água, que oócitos imaturos (Agca *et al.*, 1998). Entretanto, o citoesqueleto é mais suscetível a danos causados pelos crioprotetores em oócitos imaturos (Men *et al.*, 2002).

Avanços neste contexto têm sido obtidos, como relatado por Cetin e Bastan (2006) e Yamada *et al.*, (2007), quanto à maturação de oócitos bovinos imaturos vitrificados. Mezzalira *et al.*, (2002) alcançaram boas taxas de desenvolvimento embrionário, e Vieira *et al.*, (2002) e Vieira *et al.* (2007) obtiveram nascimentos a partir de oócitos bovinos imaturos vitrificados.

Durante várias décadas foram padronizados diversos métodos de criopreservação, sendo que a vitrificação foi considerada o método mais viável para a preservação de oócitos e embriões por Vajta *et al.* (2006), e já tendo sido aplicada com sucesso na preservação de oócitos humanos (Jutte *et al.*, 1987b), de camundongos (Jutte *et al.*, 1987a), coelhos (Kasai *et al.*, 1992) e bovinos (Atabay *et al.*, 2004).

A vitrificação é um processo de congelamento rápido que envolve o uso de altas concentrações de crioprotetores e induz à solidificação, formando um estado vítreo em células vivas, devido à alta viscosidade da solução (Dhali *et al.*, 2007). Logo após a rápida permanência nas soluções crioprotetoras, as amostras são mergulhadas diretamente no nitrogênio líquido (N₂L). Este modo de congelamento pode minimizar a formação de cristais de gelo dentro da célula (Rall e Fahy, 1985), como também injúrias ao citoesqueleto do oócito.

Neste contexto, Wowk *et al.*, (2000) propuseram o uso de um polímero sintético, formado por polivinil álcool (PVA, 20% vinil acetato e 80% vinil álcool), denominado SupercoolTM X-1000 (21st Century Medicine Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA), para evitar a formação de gelo intracelular. Este polímero reduz a toxicidade dos crioprotetores, devido à sua capacidade de se fixar e inativar impurezas, as quais podem levar à formação de gelo em água ou outras soluções (Wowk *et al.*, 2000). Em 2006, Macedo *et al.*, obtiveram sucesso em teste de penetração em oócitos suínos vitrificados com 1% de copolímero no meio de vitrificação.

A fim de aumentar a viabilidade e melhorar as taxas de desenvolvimento após FIV de oócitos submetidos à criopreservação, vários métodos que utilizam pouco volume de meio têm sido testados, como palhetas abertas estendidas (OPS, Vajta *et al.*, 1998) e superfície sólida (SSV, Dinnyes *et al.*, 2000).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos métodos de vitrificação OPS e SSV, e a adição de diferentes concentrações do copolímero X-1000 nas soluções de vitrificação, sobre a viabilidade de membrana de oócitos murinos maduros e a taxa de clivagem após FIV, assim como, a viabilidade de membrana e a taxa de maturação de oócitos bovinos imaturos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Experimento 1: Viabilidade de membrana de oócitos murinos

2.1.2 Coleta de oócitos

Para a coleta de oócitos foram utilizadas fêmeas das linhagens SWISS-ALBINA/UFPel e BALB/c, aleatoriamente. As fêmeas utilizadas neste experimento foram submetidas a um protocolo de superovulação, através da aplicação intra-peritoneal (i.p.) de 10 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) (Novormon®; Sintex S.A.; Argentina) e após 48- 52h receberam a aplicação de 10 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Choragon®; Ferring Pharmaceuticals; Alemanha).

As fêmeas foram sacrificadas através de deslocamento cervical entre 15-16h pós a aplicação do hCG. Os ovidutos foram retirados e mantidos em gota de 500 µl de meio M2 (M7167, Sigma) acrescido de 50% de soro fetal inativado (Sigma). Posteriormente realizou-se a ruptura da ampola do oviduto, com agulha hipodérmica 30 G e pinça, sob lupa estereomicroscópica. Foram recuperados os complexos *cumulus oophorus* (COC's) maduros (em MII) e separados em gota de 500 µl de meio M2.

2.1.3 Vitrificação

Antes da vitrificação, foram removidas as células do *cumulus oophorus* dos COC's, em PBS contendo 80 UI/ml de Hialuronidase (H-3506, Sigma). Logo após, os oócitos foram transferidos para gota de 500 µl de meio M2 e avaliados conforme sua integridade morfológica.

Para a vitrificação, os oócitos foram divididos em dois grupos quanto ao método de vitrificação, OPS e SSV, e um grupo controle (TC), o qual, não foi vitrificado. Cada método de vitrificação foi dividido em 3 tratamentos, conforme a concentração do copolímero: 0%, 0,1% e 1%.

No método de vitrificação OPS, os oócitos foram equilibrados por 1,5 min. na primeira solução (VS1): TCM 199, 1,4M dimetil sulfóxido (DMSO), 1,8M Etilenoglicol (EG) e copolímero, conforme o grupo, e transferidos para a segunda solução (VS2): TCM 199, 2,8M DMSO, 3,6M EG, 0,6M sacarose e copolímero, conforme o grupo, durante 30 seg. Os oócitos foram envasados em palheta estendida, as quais permaneceram por 3 seg no vapor de nitrogênio para a imersão.

No método SSV, os oócitos foram equilibrados na primeira solução (4% de EG, TCM 199, 20% de SFB e copolímero, conforme o grupo), durante 10 a 15 min., em 37 °C. Logo após, foram adicionados à segunda solução (35% de EG, 5% de PVP, 13,7% de sacarose, TCM 199, 20% de SFB e copolímero, conforme o grupo) por 30 seg. Grupos de 3 oócitos foram mantidos em 3 µl da segunda solução e depositados sob a forma de gotas, sobre a superfície de metal. A superfície utilizada se encontrava sobre o nitrogênio líquido, de forma que este encostasse seu fundo, mantendo-a em torno de -180 °C. As gotas depositadas foram acondicionadas em palhetas de 0,5 ml, as quais estavam encaixadas na superfície de metal, através de pequenos furos com o mesmo diâmetro da palheta. Na parte inferior as palhetas se encontravam vedadas com massa de modelar. Após o término da vitrificação, as palhetas foram retiradas do sistema SSV e vedadas com massa de modelar na parte superior e acondicionadas em botijão de N₂L durante, pelo menos, uma semana. Após este tempo foi realizada a desvitrificação.

2.1.4 Desvitrificação

A desvitrificação dos oócitos vitrificados através do método OPS foi realizada através da permanência de 5 minutos em três soluções de sacarose (Synth): 0,5 M, 0,25 M e 0,125 M, nesta ordem respectivamente, em 37° C.

Para a desvitrificação dos oócitos vitrificados através do método SSV, foi utilizada a solução de trealose 3 M (1264, Vetec), durante 5 minutos.

Após a passagem nas soluções de desvitrificação, todos os oócitos foram mantidos em meio 199 Hank's (Nutricell, ltda).

2.1.5 Avaliação da viabilidade

A viabilidade dos oócitos vitrificados foi avaliada logo após o reaquecimento, através da observação da integridade da membrana, segundo metodologia descrita por Somfai *et al.* (2006).

Para esta avaliação, os oócitos foram mantidos durante 10-15 min, a 37° C, em PBS acrescido de 5 mg/ml de BSA, contendo 1 µg/ml de Diacetato de Fluoresceína (FDA, Sigma F- 7378), 10 µg/ml de Hoeschst 33342 (Sigma, B-2261) e 50 µg/ml Iodeto de Propídeo (PI, Sigma P- 4170). A avaliação foi realizada sob luz UV em microscópio de epifluorescência. Os oócitos foram classificados em lesionados, íntegros e com pequenas lesões, sendo que, somente estes dois últimos foram considerados viáveis. Os considerados íntegros tiveram seu

citoplasma corado de verde (FDA positivo) e o conteúdo nuclear corado em azul (Hoeschst 33342). Os considerados lesionados apresentaram coloração vermelha no citoplasma (PI) e no conteúdo nuclear (Hoeschst 33342 e PI). Oócitos com pequenas lesões apresentavam citoplasma corado em vermelho (PI), porém o conteúdo nuclear apresentava-se íntegro, corado em azul (Hoeschst 33342).

2.2 Experimento 2: Fecundação *in vitro* de oócitos vitrificados de camundongos

2.2.1 Fecundação *in vitro*

Nesta etapa foi avaliado o desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados e fecundados *in vitro*. Para isso, foram utilizados camundongos das linhagens C57Bl e C57Bl X BALB/c. Os oócitos foram coletados já maduros, como descrito anteriormente, e logo após a coleta foram vitrificados. Para isso, foram divididos em três grupos quanto ao método de vitrificação: OPS, SSV e grupo controle não vitrificado (TC). Em cada método de vitrificação, os oócitos foram divididos em dois tratamentos quanto à concentração do copolímero: 0,0 e 0,1%.

Após a vitrificação, os oócitos foram desvitrificados conforme descrito anteriormente, e submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para cada FIV, foi utilizado um pool de sêmen de dois machos sacrificados por deslocamento cervical. Os testículos foram abordados por laparotomia, sendo removida a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente em uma placa de Petri 35 mm de diâmetro (Corning®) contendo 1000 µl de meio M16 (M7292, Sigma®) acrescido de 10% de soro fetal inativado. Para a coleta do sêmen foi realizado o rompimento das estruturas anatômicas, com auxílio de agulhas hipodérmicas (30G). A placa contendo os espermatozóides foi mantida durante 1h e 30 min a 2h em estufa com 37° C e 5% de CO₂ para a capacitação, em meio M16 (Sigma) acrescido de 10% de soro fetal inativado. Após este tempo, foram avaliados motilidade/vigor e calculada a concentração para a obtenção da dose inseminante de 2×10^6 espermatozóides/ml. Os espermatozóides e os oócitos foram transferidos para gotas de 200 µl de meio M16 acrescido de 10% de soro fetal inativado, recobertas por óleo de silicone e mantidos em estufa controlada durante 4 – 6h. Após, os prováveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de 100 µl do mesmo meio de FIV, recobertas por óleo de silicone e mantidas em estufa controlada, a 37 °C e 5% de CO₂, para o cultivo. Os zigotos foram avaliados quanto à clivagem após 48 h de cultivo.

2.3 Experimento 3: Vitrificação de oócitos imaturos bovinos

2.3.1 Coleta dos oócitos bovinos

Foram utilizados ovários coletados em abatedouro, e mantidos em solução salina 0,9% a 36° C. Os oócitos foram coletados por aspiração folicular, sendo utilizados somente folículos com 2 –8 mm de diâmetro. Os oócitos foram avaliados e classificados, somente os que continham 3 ou mais camadas de células do complexo *cumulus oophorus* e citoplasma homogêneo foram vitrificados.

2.3.2 Vitrificação

Para a vitrificação, não foram retiradas as células do complexo *cumulus oophorus*. Os oócitos foram divididos em grupos conforme os métodos de vitrificação (OPS e SSV) e concentração de copolímero, conforme descrito no primeiro experimento e grupo controle não vitrificado. A desvitrificação também foi realizada da mesma maneira como no primeiro experimento.

2.3.3 Maturação

Após o reaquecimento, os oócitos foram lavados três vezes em meio de maturação *in vitro* (MIV) e colocados para maturar, em meio composto por TCM Hank's (Sigma®, -Aldrich, Alemanha), 10UI de FSH (Foltropin V®, Vetepharma, Canadá), 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma®, -Aldrich, Alemanha), 100 µM cisteamina e 0,8335 mg/ml de sulfato de amicacina (Eurofarma, São Paulo). Foram colocados de 20-25 oócitos por gota de 200 µl de meio MIV, e mantidos durante 22 - 24 h em estufa controlada, com 5% de CO₂ e 39° C. Após o tempo de maturação, os oócitos foram desnudados utilizando 80 UI de Hialuronidase (H-3506, Sigma) e foram avaliados quanto à viabilidade de membrana e estado de maturação nuclear.

2.3.4 Avaliação da viabilidade

A viabilidade dos oócitos foi avaliada através da integridade de membrana, conforme metodologia descrita no primeiro experimento.

2.4 Análise Estatística

Os dados dos experimentos foram avaliados através do programa Statistix® 8.0. No primeiro experimento, a taxa de viabilidade em cada tratamento foi inicialmente comparada através do teste qui-quadrado (X^2). Após isso, os dados foram comparados através de regressão logística, onde cada tratamento, método/copolímero foi considerado um caso e

comparado com os demais quanto à taxa de viabilidade. Os oócitos não vitrificados foram utilizados como controle. O risco da taxa de oócitos viáveis (íntegros) foi estimado por razão de chance (*odds ratio*) e o intervalo de confiança foi de 95%. Dez análises diferentes foram conduzidas, cada uma comparando um dos tratamentos (método/copolímero) como nível de referência contra os demais.

No segundo experimento, foram comparados primeiramente os métodos de vitrificação/copolímero e a taxa de clivagem, através do teste qui-quadrado (X^2). Após, foi realizada a regressão logística, na qual cada tratamento, método/copolímero foi considerado um caso e comparado com os demais quanto à taxa de clivagem. No terceiro experimento, os dados não foram analisados estatisticamente, em função da grande variação nos dados. Isto ocorreu devido o pequeno número de oócitos em alguns grupos, ocasionado pela baixa taxa de maturação obtida.

3. Resultados

No primeiro experimento foi avaliada a viabilidade de membrana de oócitos murinos maduros pós-vitrificação. Foram utilizados neste experimento 527 oócitos, sendo 270 no método OPS, 194 no método SSV e 59 no controle. Nesta avaliação observou-se que o método OPS (62,6%) foi superior ($P < 0,05$) ao método SSV (53,1%). No entanto, os dois métodos foram inferiores ($P < 0,05$) ao grupo controle (100.0%) (tabela 1). Quanto à concentração de copolímero, os dados foram avaliados através de Regressão Logística. A concentração de 0,1% em ambos os métodos (tabela 02) foi superior que os demais tratamentos com relação à integridade de membrana. Os tratamentos com 1% de copolímero foram inferiores que os demais, em ambos os métodos de vitrificação (tabela 2).

Tabela 1- Viabilidade de membrana de oócitos de camundongos vitrificados através dos métodos OPS e SSV.

Viabilidade	Método de Vitrificação			Total
	OPS ¹	SSV ²	Controle ³	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Lesão	101 (37,4)	91 (46,9)	0 (0,0)	192
Integros	169 (62,6) ^b	103 (53,1) ^c	59 (100,0) ^a	331
Total	270	194	59	464

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística ($P < 0,05$); ¹OPS- Vitrificação em Palhetas Abertas Estendidas; ²SSV –Vitrificação em Superfície Sólida; ³Controle- Oócitos frescos não vitrificados

Tabela 2- Integridade de membrana de oócitos de camundongos submetidos aos métodos de vitrificação (OPS ou SSV), em soluções de vitrificação com diferentes concentrações do copolímero.

Integridade de Membrana				
Método	Copolímero (%)	Lesionado (%)	Íntegro (%)	Total
OPS	0.0	43 (37,1)	73 (62,9) ^b	116
	0,1%	14 (20,6)	54 (79,4) ^a	68
	1,0%	44 (51,2)	42 (48,8) ^c	86
SSV	0,0	41 (47,1)	46 (52,9) ^{b,c}	87
	0,1%	19 (33,9)	37 (66,1) ^{a,b}	56
	1,0%	31 (60,8)	20 (39,2) ^c	51
Total		192	272	464

Letras diferentes correspondem à diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos e entre os métodos. Lesionado- Oócitos com lesão nas membranas celulares; Integro- Oócitos sem lesão nas membranas celulares; OPS- Vitrificação através de palheta aberta estendida; SSV-Vitrificação através de superfície sólida; Copolímero- Diferentes concentrações de copolímero.

No segundo experimento, a viabilidade foi avaliada através da clivagem, após a fecundação *in vitro* dos oócitos murinos submetidos a vitrificação. Foram utilizados 294 oócitos, 93 no método OPS, 137 no SSV e 64 no controle. Os oócitos foram avaliados quanto ao desenvolvimento embrionário, sendo que, foram considerados clivados os oócitos que se desenvolveram até o estágio de duas ou quatro células. Na tabela 3 os resultados demonstraram que o tratamento SSV sem o copolímero foi inferior (9,2%) ($P < 0,05$) quando comparado com os demais tratamentos e controle. Nos demais tratamentos e no grupo controle, não vitrificado, não houve diferença.

Tabela 3. Clivagem de oócitos murinos fecundados *in vitro* após vitrificação em OPS e SSV utilizando diferentes concentrações de copolímero.

Método de Vitrificação						
Clivagem	OPS 0,0 (%)	OPS 0,1%	OPS 0,0 (%)	SSV 0,1 (%)	Controle	Total
Não clivado	38 (76,0)	34 (79,1)	79 (90,8)	39 (78,0)	47 (73,4)	237
Clivado	12 (24,0) ^a	9 (20,9) ^a	8 (9,2) ^b	11 (22,0) ^a	17 (26,6) ^a	57
Total	50	43	87	50	64	294

Letras diferentes correspondem à diferença estatística ($P < 0,05$); ¹OPS- Vitrificação em Palhetas Abertas Estendidas; ²SSV –Vitrificação em Superfície Sólida; ³Controle- Oócitos frescos não vitrificados

Tabela 04- Taxa de maturação de oócitos imaturos de bovinos vitrificados através dos métodos OPS e SSV.

Maturação				
Método	VG	QGV	MII	Total
¹ OPS	198 (43,8)	202 (44,7)	52 (11,5)	452
² SSV	209 (52,6)	169 (42,6)	19 (4,8)	397
³ Controle	13 (15,9)	15 (18,3)	54 (65,9)	82
Total	420	386	125	931

¹OPS- Vitrificação em Palhetas Abertas Estendidas; ²SSV –Vitrificação em Superfície Sólida; ³Controle- Oócitos frescos não vitrificados; VG- Vesícula Germinativa; QVG- Quebra de Vesícula Germinativa; MII- Metáfase II,

No terceiro experimento, foram avaliadas as taxas de maturação e a integridade de membrana de oócitos imaturos de bovinos vitrificados. Foram observadas baixas taxas de maturação nos grupos vitrificados, diferentemente do observado no grupo controle (tabela 5). Ocorreram também baixas taxas com relação à viabilidade como observado na tabela 6. Apesar disso, aparentemente, as menores taxas de viabilidade ocorreram no método SSV, nos tratamentos 0,0 (9,4%) e com 1 % copolímero (0,9%). Assim como, aparentemente, as melhores taxas de viabilidade ocorreram na utilização do método OPS 1% (33,1%), neste, a taxa de maturação também foi aparentemente maior (15,9%) que os demais.

Tabela 5- Maturação de oócitos imaturos de bovinos vitrificados através dos métodos OPS e SSV com diferentes quantidades de copolímero.

Método	Copolímero (%)	Maturação			Total
		VG	QVG	MII	
		N (%)	n (%)	n (%)	
Controle	-	13 (15,9)	15 (18,3)	54 (65,9)	82
OPS	0,0	48 (39,3)	69 (56,6)	5 (4,1)	122
	0,1%	62 (44,9)	56 (40,6)	20 (14,5)	138
	1,0%	74 (51,0)	48 (33,1)	23 (15,9)	145
SSV	0,0	62 (48,4)	53 (41,4)	13 (10,2)	128
	0,1%	50 (57,5)	35 (40,2)	2 (2,3)	87
	1,0%	53 (47,7)	56 (50,5)	2 (1,8)	111
Total		540	386	125	931

Controle- Oócitos não vitrificados; Copolímero- Diferentes concentrações de copolímero; OPS- Vitrificação em Palheta Aberta Estendida; SSV- Vitrificação em Superfície Sólida; VG- Oócito Imaturo em Vesícula Germinativa; QVG- Oócito em Quebra de Vesícula germinativa; MII- Oócito Maduro em Metáfase II

Todavia, quando os dados foram comparados entre os métodos OPS e SSV, observou-se o método OPS foi aparentemente superior (11,5%) que o método SSV (4,8%) na maturação, entretanto, aparentemente, ambos foram inferiores que o grupo controle (65,9%) (tabela 4). Quanto à taxa de integridade de membrana, o método OPS também foi, aparentemente, superior (21%) que o SSV (8,9%) (tabela 7).

Tabela 6- Viabilidade de membrana de oócitos imaturos de bovinos vitrificados pelos métodos OPS e SSV com diferentes quantidades de copolímero.

Método	Copolímero (%)	Viabilidade		Total
		Lesionado	Íntegro	
		n (%)	n (%)	
OPS	0,0	96 (78,7)	26 (21,3)	122
	0,1%	119 (86,2)	19 (13,8)	138
	1,0%	97 (66,9)	48 (33,1)	145
SSV	0,0	116 (90,6)	12 (9,4)	128
	0,1%	74 (85,1)	13 (14,9)	87
	1,0%	110 (99,1)	1 (0,9)	111
Total		612	119	731

OPS- Vitrificação em Palheta Aberta Estendida; SSV- Vitrificação em Superfície Sólida; Copolímero- Diferentes concentrações de copolímero.

Tabela 7- Viabilidade de membrana de oócitos imaturos de bovinos vitrificados através dos métodos OPS e SSV.

Método	Viabilidade		Total
	Lesionado n (%)	Integro N (%)	
OPS	355 (78,5)	97 (21,5)	452
SSV	362 (91,2)	34 (8,9)	397
Controle	1 (1,2)	81 (98,8)	82
Total	718	212	931

Controle- Oócitos não vitrificados; OPS- Vitrificação em Palheta Aberta Estendida; SSV- Vitrificação em Superfície Sólida

4. Discussão

Através desta pesquisa observou-se que a vitrificação causou danos à membrana do oócito, os quais podem ter acarretado perda de viabilidade celular. A criopreservação é correlacionada com disrupção na arquitetura do citoesqueleto (Vieira *et al.*, 2002), o que se acredita ocasionar anomalias cromossomais, danos ao fuso meiótico (Fabbri *et al.*, 2000) e danos causados ao DNA (Men *et al.*, 2003). A correta organização dos microtúbulos do fuso é essencial para o alinhamento e segregação dos cromossomos (Fabbri *et al.*, 2000).

Oócitos mamíferos são considerados como as células mais difíceis de serem criopreservadas com sucesso, devido sua sensibilidade ao resfriamento e ao congelamento (Rojas *et al.*, 2004). Além disso, os gametas femininos apresentam estrutura celular complexa, e seus componentes são sensíveis à temperatura e a pressão osmótica. Em comparação com embriões, oócitos são células maiores e a superfície celular é menor com relação ao volume, o que dificulta a desidratação (Ambrosini *et al.*, 2006), sendo que as características da membrana plasmática também são diferentes (Fabbri *et al.*, 2000).

Nesta pesquisa também foram obtidos diferentes resultados com relação à lesão de membrana em oócitos maduros de camundongos e imaturos de bovinos. O estágio de desenvolvimento oocitário (imaturo ou maduro) pode afetar a propriedade criobiológica da membrana plasmática, da mitocôndria, elementos do citoesqueleto, e de outras organelas (Ambrosini *et al.*, 2006).

Oócitos imaturos são caracterizados por um grande núcleo diplóide em fase de prófase I, apresentam uma densa banda de filamentos de actina subjacente ao oolema e várias organelas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de golgi. Os oócitos maduros apresentam corpúsculo polar extruso e o núcleo em metáfase da segunda divisão meiótica,

caracterizado por um grande e periférico fuso, com microtúbulos se estendendo de pólo a pólo, onde os cromossomos se encontram alinhados na placa metafásica (Ambrosini *et al.*, 2006).

Muitos autores acreditam que em oócitos imaturos, ocorrem mais danos estruturais do que oócitos maturados (Hochi *et al.*, 1998; Le gal e Massip, 1999; Yang *et al.*, 2000 e Rojas *et al.*, 2004) e ainda consideram que neste sentido os resultados ainda são inconsistentes (Le gal e Massip, 1999; Hurt *et al.*, 2000; Men *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2004 Tharasanit *et al.*, 2006).

Muitos oócitos e embriões têm a capacidade de reparar estes danos plenamente ou parcialmente, podendo dar continuidade ao desenvolvimento normal (Vajta e Kuwayama, 2006). Estes autores afirmaram que o propósito da criopreservação é de minimizar os danos e auxiliar as células a se regenerarem.

Sem levar em consideração a ação do copolímero, o método OPS foi superior que o SSV, em diversas comparações. Como observado na integridade de membrana de oócitos de camundongos, (OPS 62,6% vs. SSV 53,1%), na maturação de oócitos bovinos (OPS 11,5% vs. SSV 4,8%) e na integridade de membrana de oócitos bovinos (OPS 21,5% vs. SSV 8,9%). No entanto, diversos autores obtiveram bons resultados com o uso do SSV como relatado por Li *et al.*, (2002) em oócitos bovinos, Begin *et al.*, (2003) em oócitos caprinos, Somfai *et al.*, (2006) em oócitos suínos e Zhang *et al.*, (2008) em ovinos.

Os métodos OPS e SSV foram propostos a fim de se obter melhores taxas de desenvolvimento, pois ambos utilizam pouco volume de meio e propiciam melhores taxas de congelamento e reaquecimento. Li *et al.*, (2002) relataram que em bovinos, apesar das diferenças existentes entre os dois métodos OPS e SSV, como crioprotetores, tempo de exposição, passos de congelamento e recipiente de armazenamento, ambos podem ser utilizados sem diferença. Chen *et al.*, 2000 relataram que oócitos de camundongos vitrificados através do método OPS obtiveram melhor resultado quanto à restauração do fuso meiótico quando comparados com oócitos vitrificados em palhetas convencionais. No entanto, oócitos vitrificados através de OPS são armazenados diretamente no N₂L e apresentam risco de infecção (Kuleshova e Shaw, 2000).

O método SSV foi considerado um método eficiente para a vitrificação de embriões de camundongos de oito células (Boonkusol *et al.*, 2006) e pronúcleos, os quais apresentam, assim como oócitos, maior sensibilidade à criopreservação (Bagis *et al.*, 2002). Através deste método foi possível o isolamento do material biológico do N₂L e também o aumento das taxas de congelamento, devido o contato do meio contendo os oócitos, com a superfície sólida em temperatura em torno de -150 °C à -180 °C. Além disso, este método tem sido utilizado com

sucesso em bovinos, sendo obtidas taxas de desenvolvimento ao estágio de blastocisto entre 15 e 41% (Dinnyes *et al.*, 2000).

O copolímero pareceu diminuir a toxicidade do meio de vitrificação, quando utilizada a concentração de 0,1%. Wowk (2005) relatou que os bloqueadores da formação de gelo, tanto os sintéticos como as proteínas anti-congelamento, atuam diretamente na molécula do gelo, enquanto os crioprotetores convencionais atuam através de interação com a água. Existe uma atração seletiva entre os bloqueadores e a superfície do gelo, sendo que estes exercem efeito significativo enquanto presentes em baixas concentrações, quando também, reduzem a toxicidade do meio crioprotetor. O copolímero é formado por uma macromolécula sintética de polivinil álcool (20% vinil acetato e 80% vinil acetato). Segundo Asada *et al.*, (2002), polímeros formados por polivinil álcool têm ação protetora nas membranas celulares durante o processo de congelamento.

Asada *et al.* (2002) relatam, em oócitos bovinos maduros, a utilização de polivinil álcool (PVA) no meio de vitrificação, em substituição ao soro fetal bovino. Estes autores obtiveram melhores resultados de desenvolvimento ao estágio de mórula utilizando a concentração de 0,1 % de PVA no meio. O PVA foi efetivo, também nesta concentração, na criopreservação de embriões ovinos (Naitana *et al.* 1997). Assim como na presente pesquisa, quando utilizada a concentração de 0,1% de copolímero, nos dois métodos de vitrificação, os dados de integridade de membrana de oócitos de camundongos foram superiores aos demais. No entanto, os tratamentos com 1% de copolímero foram inferiores aos outros, em ambos os métodos de vitrificação, no primeiro e no segundo experimento, com oócitos de camundongos.

Os dados de maturação entre 1,8% - 15,9%, obtidos nesta pesquisa, foram inferiores do que os obtidos por Yamada *et al.* (2007), os quais obtiveram 29,2% de maturação a partir de oócitos bovinos imaturos vitrificados. Estes autores utilizaram associação de 25% de EG e DMSO, e obtiveram taxa de MIV de 11,7% de maturação quando utilizaram 20% de EG e DMSO.

Cetin e Bastan (2006) obtiveram variação nos resultados de maturação em oócitos bovinos, devido ao tipo de crioprotetor utilizado. Estes autores obtiveram taxa de maturação de 34,1% utilizando 20% de EG na primeira solução e 40% na segunda solução, e apenas 14,9% de maturação utilizando DMSO, nas mesmas proporções, sendo que ambos os tratamentos foram inferiores ao controle (79,6%).

Nesta pesquisa, foi utilizada no método OPS a concentração de 9% DMSO e 10% EG, na primeira solução, e 20% de EG e 20% de DMSO na segunda solução. No método SSV, a

concentração na primeira solução foi de 4% de EG e na segunda solução, 35%. A baixa taxa de maturação obtida neste trabalho em oócitos bovinos imaturos vitrificados pode ter sido ocasionada devido à concentração de crioprotetores utilizada, tanto no método OPS quanto no SSV. Em bovinos, a técnica de vitrificação com uma solução que inclui o crioprotetor etilenoglicol a 20% tem resultado em taxas de clivagem de 38% a 49%, o que aparentemente é promissor (Vieira *et al.*, 2002).

Neste trabalho, também foi utilizada a suplementação do meio de maturação com cisteamina, como relatado por Balasubramanian e Rho, (2007) em oócitos bovinos. Estes autores correlacionaram a cisteamina como um reforço no desenvolvimento embrionário quando adicionada no meio de maturação. Segundo eles, a cisteamina adicionada ao meio de maturação também proporcionou resistência em embriões ao resfriamento. A cisteamina também foi utilizada no meio para maturação de oócitos de camundongos, e foi relatado que a presença da cisteamina pode afetar a taxa de maturação dos oócitos (Pasbakhsh *et al.*, 2007).

O desnudamento das células do *cumulus oophorus* para a vitrificação, não foi utilizado nesta pesquisa. Segundo Mezzalira *et al.*, (2005) o desnudamento das células do *cumulus oophorus* facilitaria a permeação dos crioprotetores. No entanto, algumas camadas das células do cumulus são necessárias para uma adequada fecundação, já que existem evidências que estas células estão envolvidas na interação entre os gametas feminino e masculino. Desta maneira, o desnudamento, mesmo que parcial, pode acarretar em efeitos negativos na posterior viabilidade dos oócitos (Mezzalira *et al.*, 2005). De certa forma, os baixos resultados procedentes da maturação, neste trabalho, podem ser ocasionados pelo não desnudamento, o que pode ter impedido a permeação dos crioprotetores de forma adequada.

Com relação ao estágio de maturação oocitário e o tipo de crioprotetor, Magnusson *et al.*, (2007) descreveram que em bovinos o desenvolvimento embrionário pós a vitrificação, pode ser afetado pelo estágio de maturação em que o oócito se encontra devido à diferente tolerância ao tipo de crioprotetor utilizado. Pedro *et al.* (1996) demonstraram que oócitos bovinos em VG são menos permeáveis ao EG que oócitos em MII. Além disso, esta pode ser uma das razões da variação de resultados obtidos pelos vários grupos de pesquisa na vitrificação de oócitos (Magnusson *et al.*, 2007). Rojas *et al.* (2004), relataram que oócitos suínos em MII são mais resistentes à vitrificação que oócitos em VG, utilizando EG como crioprotetor.

A ultra-estrutura dos oócitos imaturos sugere que os danos causados pela criopreservação podem estar associados à destruição dos contatos intercelulares, as junções gap, entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito. As junções gap apresentam um importante papel na

cooperação metabólica entre o oócito e as células do *cumulus oophorus* durante o processo de maturação (Hochi *et al.*, 1998).

Através dos dados de viabilidade de membrana obtidos no experimento com oócitos bovinos imaturos constatou-se que grande parte dos oócitos sofreu lesão de membrana. O grupo controle composto por oócitos não vitrificados, apresentou apenas 1,2% de lesão. A adição de copolímero à solução de vitrificação pareceu ser benéfica na concentração de 1%, quando utilizado o método OPS, melhorando taxas de integridade (33.1%) e maturação (15.9%).

Apesar de ainda ocorrerem lesões celulares quando ainda é utilizada a vitrificação, esta é considerada um método viável, método menos oneroso e prático. Vários métodos que utilizem menor volume de meio tem sido testados a fim de melhorar as taxas de resfriamento/aquecimento e proporcionar maior viabilidade após a vitrificação.

5. Conclusões

Através desta pesquisa pode-se concluir que ambos os métodos de vitrificação OPS e SSV podem ser utilizados para a vitrificação de oócitos maduros de camundongos, utilizando a concentração de 0,1% de copolímero, mantendo a integridade de membrana. No entanto, com relação à clivagem, somente o método SSV 0,0 não é indicado.

Quanto à criopreservação de oócitos imaturos bovinos, são necessários modificações em ambos os métodos, como uso de outros crioprotetores, ou, diferentes concentrações, considerando a toxicidade e a permeabilidade de cada crioprotetor, ou até mesmo, outros métodos de vitrificação que utilizem menor volume de meio, a fim de se obter maior taxa de resfriamento, para que desta forma possa ser aumentada a taxa de viabilidade e de maturação do gameta feminino bovino após a vitrificação.

6. Referências

- AGCA, Y.; LIU, J.; METER, A.T.; CRISTER, E.S.; CRISTER, J.K. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrana water and cryoprotectant permeability characteristics. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 408–415, 1998.
- AMAN R. R.; AND PARKS, J. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 50, 103–110, 1994.
- AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; PORCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Oocytes cryopreservation: State of art. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 250-262, 2006.
- ARAV, A.; SHEDU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and citotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 353-358, 1993.
- ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S.; FUKUI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1199- 1208, 2002.
- ATABAY, E. C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI S.; NAGANO M.; KOGA A.; KANAI Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 15-23, 2004.
- BAGIS, H.; ODAMAN, H.; SAGIRKAYA, DINNYÉS, A. Production of Transgenic mice from Vitrified Pronuclear-Stage Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 173-179, 2002.
- BALASUBRAMANIAN, S. & RHO, G. J. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 282-292, 2007.
- BEGIN, I.; BHATIA, B.; BALDASSARRE, H.; DINNYES, A.; KEEFER, C. L.; Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4 cell embryos using cryoloop (CLV) and solid surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v. 59, p. 1839-1850, 2003.
- BERNART, W.; KAMEL, M.; NEULEN, J.; BRECKWOLDT, M.; Influence of the developmental stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 9, p. 100-102, 1994.
- BOONKUSOL, D.; GAL, A. B.; BODO, S.; GORHONY, B.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A., Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 73: 700- 708, 2006.
- CETIN, Y. & BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science** v.92, p.29-36. 2006.

CHEN, S. -U; LIEN, Y. -R; CHEN, H. -F; CHAO, K. -H; HO, H. -N.; YANG, Y.-R. Open Pulled Straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. **Human Reproduction**, v. 15, n. 12, p. 2598-2603, 2000.

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

DHALI, A.; ANCHAMPARUTHY, V. M.; BUTLER, S. P.; PEARSON, R. E.; MULLARKI, I. K.; GWAZ DAUS KAS, F. C. **Theriogenology**, v. 68, p. 1292-1298, 2007.

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

FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M. R.; ROCCHETTA, G.; CIOTTI, P. M.; MAGRINI, O.; SERACCHIOLI, R.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Technical aspects of oocytes Cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 39-42, 2000.

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**, n. 49, p. 787-796, 1998.

HUANG, J.Y.J.; CHEN, H. Y.; PARK, J. Y. S. P.; TAN, S. L.; CHIAN, R. C. Comparison of spindle and chromosome configuration in vitro- and in vivo- matured mouse oocytes after vitrification. **Fertility and Sterility**, in press online, 2007.

JUTTE, N. H. P. M.; HEYSE, P.; JANSEN, H. G.; BRUNING, G. J.; AND ZEILMAKER, G. H. Vitrification of mouse islets of Langerhans: Comparison with a more conventional freezing method. **Cryobiology** v. 24, p. 292-302, 1987a.

JUTTE, N. H. P. M.; HEYSE, P.; JANSEN, H. G.; BRUNING G. J.; AND ZEILMAKER, G. H. Vitrification of human islets of Langerhans. **Cryobiology**, v. 24, p.403–411, 1987b.

KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S. E.; MIYAKE, T.; AND SAKURAI, T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1042 1046, 1992.

KULESHOVA, L. L. & SHAW, J. M. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2604-2609, 2000.

Le GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, n. 4, p. 290-300, 1999.

LI, X.; SU, L.; LI, Y. JI, W.; DINNYÉS, A. Vitrification of yunnan yellow cattle oocytes: work in progress. **Theriogenology**, v.58, 1253-1260, 2002.

MACEDO Jr., M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA Jr., T.; BORDIGNON, J.; SERRET C.G., RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, n. 92, p.334-348, 2006.

MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W. B.; GOISSIS, M. D.; YAMADA, C.; TAVARES, L. M. T.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Reproduction Science**, article in press, 2007.

MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, 1095–1103, 2002.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.245-250, 2003.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M.F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M.I.B. Vitrificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos à citocalasina B. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n.5, p.260-265, 2002.

MEZZALIRA, A.; CUCCO, D. C.; BUNN, S. CRUZ, F. B. WERLICH, D. E.; VIEIRA, A. D., SANTOS, R. M. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n.2, p. 109-114, 2005.

NAITANA, S.; LEDDA, S.; LOI, P.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; DATTENA, M. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserved ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 247-256, 1997.

PASBAKSH, P.; ROSHANDEH, A. M.; MOOGHAHI, M. H. N.; ABDOLVAHHABI, M.; AKBARI, M.; SHOKRGOZAR, M. A.; SOBHANI, A. Effects of cysteamine on in vitro maturation of mouse oocytes (IVM) in two media. **Toxicology Letters**, v. 172S, p. S1-S240, 2007.

PEDRO, P. B.; KASAI, M.; MAMMARU, Y.; YOKOYAMA, E.; EDASHIGE, K. Changes in the permeability to different cryoprotectants of bovine oocytes and embryos during maturation and development. **13th International Congress Anim. Reprod.**, v. 3, p. P15-19, 1996.

RALL, W.F.& FAHY, G. M. Ice Free cryopreservation of mouse embryos at – 196° C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.

ROJAS, C.; PALOMO, M. J.; ALBARRACÍN, J. L.; MOGAS, T. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, Microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v. 49, p. 211-220, 2004.

SOMFAI, T.; DINNYÉS, A.; SAGE, D.; MOROSÁN, M.; CARNWATH, J. W.; OZAWA, K. K.; NIEMANN, H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). **Theriogenology**, v. 66, p. 415-422, 2006.

STACHECKI, J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. Detrimental effects of sodium during Mouse oocytes Cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 395-400, 1998.

THARASANIT, T., COLENBRANDER, B., STOUT, T.A.E. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 627-637, 2006.

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

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

VAJTA, G. & KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p. 236-244, 2006.

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

VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J. L. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine In Vitro-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. online, p. 00899, 2007.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C. M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S. B.; FAHY, G. M. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

WOWK, B.; Anomalous high activity of a subfraction of polyvinyl alcohol ice blocker. **Cryobiology**, n. 50, p. 325-331, 2005.

YAMADA, C.; CAETANO, H. V. A.; SIMÕES, R.; NICACIO, A. C.; FEITOSA, W. B.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. VISINTIN, J. A. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparision of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.

YANG, C.B.; YANG, B.S.; SEONG, H. M. Effects of vitrification methods and polivinilpirrolidone supplementation on the viability of immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.266, 2000.

ZHANG, J.; NEDAMBALE, T. L.; YANG, M.; LI, J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. **Animal Reproduction Science**, article in press, 2008

2. Conclusão Geral

Através desta pesquisa pode-se concluir que ambos os métodos de vitrificação, OPS e SSV, podem ser utilizados para a vitrificação de oócitos maduros de camundongos, utilizando a concentração de 0,1% de copolímero, mantendo a integridade de membrana. No entanto, com relação à clivagem, somente o método SSV sem o copolímero não é indicado.

Quanto à criopreservação de oócitos imaturos bovinos, são necessários modificações em ambos os métodos, como uso de outros crioprotetores, ou, diferentes concentrações, considerando a toxicidade e a permeabilidade de cada crioprotetor, ou até mesmo, outros métodos de vitrificação que utilizem menor volume de meio, a fim de se obter maior taxa de resfriamento, para que desta forma possa ser aumentada a taxa de viabilidade e de maturação do gameta feminino bovino após a vitrificação.

3. Considerações Finais

Este trabalho utilizou integridade de membrana, taxa de clivagem e taxa de maturação como indicadores da viabilidade oocitária pós vitrificação. Como continuidade a esta pesquisa, são necessários testes de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, taxa de prenhez e taxa de nascimento, para se obter o efeito dos métodos de vitrificação OPS e SSV, assim como, da adição de copolímero, também sobre estes parâmetros.

4. Referências Gerais

AGCA, Y.; LIU, J.; METER, A.T.; CRISTER, E.S.; CRISTER, J.K. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrana water and cryoprotectant permeability characteristics. **Molecular Reproduction Development**, v. 49, p. 408–415, 1998.

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

AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; PORCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Oocytes cryopreservation: State of art. **Reproductive Toxicology**, v. 22, p. 250-262, 2006.

ARAV, A.; SHEDU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and citotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil**, v. 99, p. 353-358, 1993.

ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S.; FUKUI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1199- 1208, 2002.

ATABAY, E. C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI S.; NAGANO M.; KOGA A.; KANAI Y. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nucleus transfer. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 15-23, 2004.

BAGIS, H.; ODAMAN, H.; SAGIRKAYA, DINNYÉS, A. Production of Transgenic mice from Vitrified Pronuclear-Stage Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 173-179, 2002.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. J. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 282-292, 2007.

BEGIN, I.; BHATIA, B.; BALDASSARRE, H.; DINNYES, A.; KEEFER, C. L.; Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4 cell embryos using cryoloop (CLV) and solid surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v. 59, p. 1839-1850, 2003.

BERNART, W.; KAMEL, M.; NEULEN, J.; BRECKWOLDT, M.; Influence of the developmental stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 9, p. 100-102, 1994.

BOONKUSOL, D.; GAL, A. B.; BODO, S.; GORHONY, B.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A., Gene expression profiles and in vitro development following

vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 73: 700- 708, 2006.

CARROL, J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D.G. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 606-612, 1993.

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

CHEN, S. -U; LIEN, Y. -R; CHEN, H. -F; CHAO, K. -H; HO, H. -N.; YANG, Y.-R. Open Pulled Straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. **Human Reproduction**, v. 15, n. 12, p. 2598-2603, 2000.

COHEN, J; INGE, K. L.; WIKER, S. R.; WRIGHT, G. FEHILLY, C. B.; TURNER, T. G. Jr. Duration of storage of cryopreserved human embryos. **Journal of in vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v. 5, n. 5, p. 301-303, 1988.

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. 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**, n. 115S, p. S2-S7, 2004.

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

DHALI, A.; ANCHAMPARUTHY, V. M.; BUTLER, S. P.; PEARSON, R. E.; MULLARKI, I. K.; GWAZ DAUS KAS, F. C. **Theriogenology**, v. 68, p. 1292-1298, 2007.

FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M. R.; ROCCHETTA, G.; CIOTTI, P. M.; MAGRINI, O.; SERACCHIOLI, R.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Technical aspects of oocytes Cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 39-42, 2000.

FRIEDLER, S.; GINDICE, L. C.; LAMB, E. J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v.49, n. 5, p. 743-764, 1988.

GALBINSKI, S.; BOS-MIKICH, A., FERRARI, A. N. Viabilidade e Fertilização in vitro de oócitos bovinos após a vitrificação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.25, n. 8, p. 553-559, 2003.

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**, n. 49, p. 787-796, 1998.

HUANG, J.Y.; CHEN, H. Y.; TAN, S. L.; CHIAN R. C. Effect of choline supplemented, sodium depleted slow-freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 4, p. 1093-1100, 2007.

HUNTER, J.E.; FULLER, B. J.; BERNARD, A.; JACKSON, A.; SHAW, R. W. Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotetants, initial studies on fertilization and embryonic development. **Human Reproduction**, v. 10, p. 1184-1188, 1995.

HURT, A. E., LANDIN, F., SEIDEL, G. E., SQUIRES, E. L. Vitrification of immature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose using open-pulled straws. **Theriogenology**, v. 51, 1303–1310, 2000.

JUTTE, N. H. P. M.; HEYSE, P.; JANSEN, H. G.; BRUNING, G. J.; AND ZEILMAKER, G. H. Vitrification of mouse islets of Langerhans: Comparison with a more conventional freezing method. **Cryobiology** v. 24, n. 4, p. 292-302, 1987a.

JUTTE, N. H. P. M.; HEYSE, P.; JANSEN, H. G.; BRUNING G. J.; AND ZEILMAKER, G. H. Vitrification of human islets of Langerhans. **Cryobiology**, v. 24, n. 5, p. 403–411, 1987b.

KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S. E.; MIYAKE, T.; AND SAKURAI, T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol based solution by a simple method. **Biology Reproduction**, v. 46, p. 1042 1046, 1992.

KO, C-S; DING, D.C.; CHU, T. W.; CHU, Y. N.; CHEN, I. C.; CHEN, W. H.; WU, G. J. Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different Cryopreservation methods. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3-4, p. 272-282, 2008.

KÜCHENMEISTER, U.; KUWAYAMA, M. *In vitro* blastocyst formation after vitrification of immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 47, p. 348, 1997.

KULESHOVA, L. L. & SHAW, J. M. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2604-2609, 2000.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; AND GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 5, p. 1073–1078, 1999.

Le GAL, F.; MASSIP, A. Development of thawed oocytes fertilized in vitro after vitrification by the Open Pulled Straw method before or after in vitro maturation. **Gametes: Development and Function**, p. 554, 1998.

Le GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, n. 4, p. 290-300, 1999.

LI, X.; SU, L.; LI, Y. JI, W.; DINNYÉS, A. Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: work in progress. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1253-1260, 2002.

LIM, J. M.; KO, J. J.; HWANG, W. S.; CHUNG, H. M.; NIWA, K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1303-1310, 1999.

LUYET, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, v.1, p.1–14, 1937.

MACEDO Jr., M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA Jr., T.; BORDIGNON, J.; SERRET C.G., RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, n. 92, n. 3-4, p. 334-348, 2006.

MAGNUSSON, V.; FEITOSA, W. B.; GOISSIS, M. D.; YAMADA, C.; TAVARES, L. M. T.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. **Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages**. *Animal Reproduction Science*, article in press, 2007.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, 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, n. 2, p. 139-144, 2001.

MEN, H.; CHEN, W.; SHANG, E.; YANG, S.; ZOU, R. Cryopreservation of Kunming mouse oocytes using slow cooling, ultra-rapid cooling and vitrification protocols. **Theriogenology**, v. 47, p. 1423-1431, 1997.

MEN, H., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, 1095–1103, 2002.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. **Molecular Reproduction Development**, v.64, p.245-250, 2003.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D.; BARBIERI, D. P.; MACHADO, M.F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M.I.B. Vitificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos à citocalasina B. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n.5, p.260-265, 2002.

MEZZALIRA, A.; CUCCO, D. C.; BUNN, S.; CRUZ, F. B.; WERLICH, D. E.; VIEIRA, A. D.; SANTOS, R. M. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n.2, p. 109-114, 2005.

MIKICH, A. B.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. C. Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e ultraestrutura de oócitos de *Mus musculus*: estudo preliminar. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.18, p.54, 1988.

NAITANA, S.; LEDDA, S.; LOI, P.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; DATTENA, M. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserved ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 247-256, 1997.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v. 37, p.77-85, 1998.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.15, p. 651– 658, 2000.

PASBAKHS, P.; ROSHANDEH, A. M.; MOOGHAHI, M. H. N.; ABDOLVAHHABI, M.; AKBARI, M.; SHOKRGOZAR, M. A.; SOBHANI, A. Effects of cysteamine on in vitro maturation of mouse oocytes (IVM) in two media. **Toxicology Letters**, v. 172S, p. S1-S240, 2007.

PEDRO, P. B.; KASAI, M.; MAMMARU, Y.; YOKOYAMA, E.; EDASHIGE, K. Changes in the permeability to different cryoprotectants of bovine oocytes and embryos during maturation and development. **13th International Congress Anim. Reprod.**, v. 3, p. P15-19, 1996.

QUINN, P. Cryopreservation of Mouse oocytes using Sodium-Depleted Media: Comparison of Hepes-HTF and PBS-Based Formulations. **Fertility & Sterility**, v. 83, suppl 2, p. S24, 2005.

RALL, W.F.; FAHY, G. M. Ice Free cryopreservation of mouse embryos at – 196° C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.

ROJAS, C.; PALOMO, M. J.; ALBARRACÍN, J. L.; MOGAS, T. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v. 49, p. 211-220, 2004.

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

SOMFAI, T.; DINNYÉS, A.; SAGE, D.; MOROSÁN, M.; CARNWATH, J. W.; OZAWA, K. K.; NIEMANN, H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). **Theriogenology**, v. 66, p. 415-422, 2006.

STACHECKI, J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. Detrimental effects of sodium during Mouse oocytes Cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 395-400, 1998.

SUZUKI, T.; TAKAGI, M.; BOEDIONO, A. Calves obtained after transfer of frozen-thawed bovine immature oocytes cryopreserved in various cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 45, n.1, p. 361, 1996.

THARASANIT, T., COLENBRANDER, B., STOUT, T.A.E. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, 73, 627–637, 2006.

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

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

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p. 236-244, 2006.

VAN BLERKOM, J. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation: alteration in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. **Human Reproduction**, v. 4, p.883-898, 1989.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C. H.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; ROOSENDAAL, E. van.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human reproduction**, v. 18, n. 7, p. 1504-1511, 2003.

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

VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J. L. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine In Vitro-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. online, p. 00899, 2007.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to 196 degrees e 269 degrees C. **Science**, v.178, p.411-414, 1972.

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

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C. M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S. B.; FAHY, G. M. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

WOWK, B.; Anomalous high activity of a subfraction of polyvinyl alcohol ice blocker. **Cryobiology**, n. 50, p. 325-331, 2005.

WU, B.; TONG, J.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine germinal vesicle-stage oocytes on formation of microtubules and the meiotic spindle. **Theriogenology**, v. 49, n.1, p. 177, 1998.

WURTH, Y. A.; BLINDERS, J. M. C.; RALL, W. F.; KRUIP, T. H. A. M. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following Cryopreservation and single embryo transfer. **Theriogenology**, v. 42, p. 1275-1284, 1994.

YAMADA, C.; CAETANO, H. V. A.; SIMÕES, R.; NICACIO, A. C.; FEITOSA, W. B.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. VISINTIN, J. A. Immature bovine oocyte cryopreservation: Comparision of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.

YANG, C.B.; YANG, B.S.; SEONG, H. M. Effects of vitrification methods and polivinilpirrolidone supplementation on the viability of immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.266, 2000.

ZHANG, J.; NEDAMBALE, T. L.; YANG, M.; LI, J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. **Animal Reproduction Science**, article in press, 2008