

UFSM

Dissertação de Mestrado

**VITRIFICAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS**

Arnaldo Diniz Vieira

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2002

**VITRIFICAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS**

por

Arnaldo Diniz Vieira

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós – Graduação em Medicina Veterinária. Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Santa Maria, RS, Brasil.

2002

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS

elaborada por
Arnaldo Diniz Vieira

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
(Presidente/Orientadora)

Dra. Maria Gabriela Tavares Rheingantz

Dr. Ricardo Marques de Azambuja

Santa Maria, fevereiro de 2002

© 2002

Todos os direitos autorais reservados a Arnaldo Diniz Vieira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço. Avenida Luis de Camões, n.2090, Bairro Conta Dinheiro, Lages, SC.

Fone: 55 (0xx) 49 2252866 R 257; Fax: (0xx) 225 3401

Endereço eletrônico: vieiraad@bol.com.br

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. – Vitrificação.....	3
2.2. – Toxicidade dos crioprotetores.....	4
2.3. – Velocidade de resfriamento.....	5
2.4. – Aditivos protetores.....	6
2.5. – Condições de regeneração.....	6
2.6. – Estágio de desenvolvimento.....	7
3 – Capítulo 1 – Bezerros obtidos de oócitos bovinos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS.....	9
• Resumo.....	10
• Summary.....	11
• Introdução.....	12
• Material e métodos.....	14
- Coleta dos oócitos.....	14
- Tratamentos.....	15
- Vitrificação e aquecimento.....	15

- Maturação <i>in vitro</i>	16
- Fecundação <i>in vitro</i>	17
- Cultivo <i>in vitro</i>	17
- Avaliação embrionária.....	17
- Transferência embrionária.....	18
- Análise estatística.....	18
• Resultados.....	19
- Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	19
- Desenvolvimento embrionário <i>in vivo</i>	19
• Discussão.....	20
• Agradecimentos.....	22
• Referências.....	22
4 – DISCUSSÃO	28
5 – CONCLUSÕES.....	32
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a meus pais Otávio T. Vieira e Maria Salete F. Vieira, pela retidão de seus atos e por um dia terem decidido dispensar todos os seus esforços para oferecer a seus filhos o máximo em escolaridade. Hoje ofereço esta nova conquista, em reconhecimento e como um novo prêmio aos seus esforços.

Agradeço a Shirlei, minha esposa e aos meus filhos Arnaldo Filho, Eduardo e Alexandre, pela compreensão nos momentos de ausência e principalmente pelo apoio e incentivo no transcorrer desta etapa de nossas vidas.

Agradeço a Alceu Mezzalira, por ter me iniciado na pesquisa, compartilhando dos mesmos sonhos e moldando ideais. Também te ofereço essa conquista, que sabemos ser obra de uma extrema sincronia, estabelecida desde a época em que fui seu aluno de graduação. Além de um grande amigo, aproveitando o mais profundo sentido da palavra, só posso defini-lo como meu Mestre,.

Aos colegas Ricardo C. Lehmkuhl, Dilmar P. Barbieri e demais integrantes da equipe do laboratório de fisiopatologia da reprodução do CAV, obrigado pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas Maicon G. L. Pinto, Fábio G. Leivas e Daniela Brum e demais integrantes do laboratório de embriologia e reprodução animal da UFSM, obrigado pelo convívio e aprendizado.

A doutora Mara I. B. Rubin pelo apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos Srs. Jonas Lehmkuhl, Aldo Gava e André Thaler Neto, pela disponibilização das receptoras utilizadas neste trabalho.

Aos responsáveis pelo serviço de inspeção e aos respectivos frigoríficos Frigopar, Frigofox e Verdi pela colaboração na obtenção do material utilizado neste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias de Lages-SC, pela disponibilização de sua infra-estrutura e pelo apoio na realização deste trabalho.

Um agradecimento especial, a todas as outras pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões bovinos derivados de oócitos imaturos vitrificados pelo método OPS.....	19
-----------------	---	---	----

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS

AUTOR: ARNALDO DINIZ VIEIRA
ORIENTADOR: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
Santa Maria, RS, 22 de Fevereiro de 2002.

A constante evolução das biotécnicas da reprodução tem originado novos desafios em diferentes áreas. Na criobiologia, o atual desafio é a obtenção de uma adequada metodologia para a criopreservação de oócitos bovinos, especialmente no estágio imaturo. Com este propósito, foi conduzido o presente estudo que tem como objetivos avaliar o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS, além de avaliar o efeito do pré-tratamento com citocalasina D (CD) e a eficácia da solução crioprotetora composta por 20% de etileno glicol (EG) + 20% de dimetil sulfoxido (Me₂SO) + 0.5 M de sacarose (SAC). Oócitos obtidos de ovários de matadouro foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: controle (n=442), vitrificado (Vitri n=356) e tratado com 20µg/ml de CD durante 10 a 20 minutos e vitrificado (CDVitri n=355). Para a vitrificação, os oócitos foram expostos durante 30 segundos a solução SV50 (10% EG + 10% Me₂SO), seguido de 25 segundos na solução SV100 (20% EG+ 20% Me₂SO + 0,5M SAC), sendo envasados em grupos de 4 a 5 em cada OPS e mergulhados em nitrogênio líquido. O aquecimento foi realizado em dois passos de 5 minutos, com gradientes de sacarose

(0,26 e 0,16M). Após isso, todos os grupos foram submetidos simultaneamente aos mesmos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A viabilidade *in vitro* foi avaliada através das taxas de clivagem e blastocistos. Adicionalmente, a viabilidade *in vivo* foi avaliada pela transferência dos embriões (1 ou 2 por receptora), derivados de oócitos imaturos vitrificados, submetidos ou não a nova vitrificação no estágio de blastocisto. Não foram observadas diferenças estatísticas nas taxas de clivagem e blastocistos entre os grupos CDVitri (46,4% e 3,5%) e Vitri (49,0% e 6,1%) respectivamente, sendo ambos inferiores ($P < 0,05$) ao grupo controle (85,1% e 45,9%). Na avaliação *in vivo*, obteve-se o nascimento de uma fêmea e um macho do grupo Vitri (cinco receptoras) e uma fêmea do grupo CDVitri (duas receptoras). Esses resultados permitem concluir que o pré-tratamento com citocalasina D não melhora a viabilidade embrionária de oócitos bovinos imaturos vitrificados. Entretanto, a solução de vitrificação utilizada foi eficiente para criopreservação de oócitos imaturos, com a tecnologia OPS. Os embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados possibilitam a obtenção do nascimento de produtos normais e saudáveis, mesmo quando submetidos a nova vitrificação no estágio de blastocisto expandido.

Palavras Chave - bovino; oócito imaturo; vitrificação; OPS; citocalasina D; blastocistos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IMMATURE BOVINE OOCYTES VITRIFICATION

AUTHOR: ARNALDO DINIZ VIEIRA
ADVISER: MARA IOLANDA BATISTELLA RUBIN
Santa Maria, RS. February, 22, 2002.

The development of reproductive biotechnology has been originating new challenges in many areas. In the cryobiology, the current challenge is to obtain an appropriate methodology for bovine oocyte cryopreservation, especially in the immature stage. This study was aimed to evaluate the *in vitro* and *in vivo* development of embryos derived from immature vitrified bovine oocytes, with OPS technology. In addition was evaluate the effect of the pre-treatment with cytochalasin D (CD), and the viability of a cryoprotectant solution composed by ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (Me₂SO) and sucrose (SUC), in the vitrification of immature bovine oocytes. The oocytes obtained of slaughterhouse bovine ovaries were randomly allocated in three groups: a control group (n=442), a vitrified group (Vitri n=356) and a group treated with 20µg/ml of CD during 10 to 20 minutes and vitrified (CDVitri n=355). For the vitrification procedure, the oocytes were exposed for 30 seconds to an VS50 solution (10% EG + 10% DMSO), followed by 25 seconds exposure to a VS100 solution (20% EG + 20% DMSO + 0.5M of SUC), loaded in groups of 4 to 5 in OPS and plunged in liquid nitrogen. The warming was performed in two steps of 5 minutes, with

sucrose gradients (0.26 and 0.16M) solutions. After that, all groups were submitted to the same *in vitro* maturation, fertilization and culture procedures. The *in vitro* viability was evaluated by the cleavage and blastocysts rates, and the *in vivo* viability was evaluated by the transfer of blastocysts derived from vitrified immature oocytes (1 or 2 for each recipient). No differences ($P>0.05$) were observed in the cleavage and blastocysts rates among the CDVetri (46.4% and 3.5%) and Vtri (49.0% and 6.1%) groups, respectively, and both were lower ($p<0.05$) than control group (85.1% and 45.9%). A female calf was obtained from CDVetri group (two recipients) and a female and a male calves birth from the Vtri group (five recipients), were obtained. These data indicate that the cytochalasin D pre-treatment do not improve viability of embryos derived from vitrified immature bovine oocytes. The OPS technology with a cryoprotectant solution composed by 20% EG + 20% Me₂SO and 0.5M SUC is effective for vitrification of immature oocytes. The embryos obtained from immature oocytes vitrified with this technology are fully competent to develop healthy offspring, even when submitted to a new vitrification procedure at blastocyst stage.

Key words - bovine; immature oocyte; vitrification; OPS; cytochalasin D, blastocysts.

1 – INTRODUÇÃO

Quando se considera a genética populacional, tanto a homozigose determinada por acasalamentos dentro de um grupo reduzido de indivíduos, quanto a contaminação genética em raças ou linhagens originadas pela seleção natural, aumentam o risco de extinção e reduzem o futuro aproveitamento de suas adaptações. Isto torna premente a necessidade de salvaguardar esse patrimônio, o que pode ser realizado através da criação de bancos de gametas masculinos e femininos. Esses bancos, além de fornecerem material para biotecnologias como a transgênese e engenharia molecular, permitiriam a manutenção ou a restituição da variabilidade genética dos grupos. Entretanto, apesar dos espermatozóides serem rotineiramente criopreservados, ainda se busca uma metodologia eficiente para criopreservação de oócitos. Isto teria um grande impacto sobre a preservação de recursos genéticos em função do aumento da capacidade feminina em produzir descendentes. Embora com resultados ainda modestos, a criopreservação de oócitos imaturos, em associação com técnicas de coleta de oócitos por punção folicular *in vivo*, possibilitaria o aproveitamento do potencial de animais criados em pontos distantes de centros equipados para produção *in vitro* de embriões.

Desta forma, é justificada a incessante busca por uma metodologia que possibilite melhorar os índices obtidos com a criopreservação dessas estruturas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS, submetidos ou não a nova vitrificação no estágio de blastocisto expandido. Em adição, avaliou-se a eficiência da solução crioprotetora composta por 20% de etileno glicol + 20% de dimetil sulfóxido + 0,5M de sacarose e também o efeito do pré-tratamento com citocalasina D sobre o potencial de desenvolvimento dos embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a década de 40, quando foi identificado o efeito do glicerol como aditivo crioprotetor celular (POLGE *et al.*, 1949), a criobiologia passou a ser uma importante ferramenta da reprodução assistida. Contudo, no caso de gametas femininos, sua forma, qualidade, origem e fatores espécie-específicos como teor lipídico, tamanho e estágio de desenvolvimento determinam a impossibilidade do uso de um método geral de criopreservação (VAJTA, 2000).

Dentre os principais mecanismos lesivos que podem ocorrer tanto no resfriamento quanto no aquecimento estão as alterações lipídicas de membranas e citoplasma, despolimerização de microfilamentos, inativação de organelas, efeitos osmóticos e tóxicos, lesões estruturais provocadas por cristais de gelo e fraturas (SHAW *et al.*, 2000). Atualmente, na reprodução assistida podem ser

reconhecidos dois processos de criopreservação, o congelamento (lento, rápido e ultra-rápido) e a vitrificação. No congelamento ocorre a nucleação de gelo na forma de pequenos cristais, permitindo contornar os danos através da sincronia entre resfriamento, desidratação celular e cristalização. Já na vitrificação, não há formação de cristais de gelo, pois nesse processo o líquido mantém sua distribuição molecular e iônica normal, tornando-se extremamente viscoso e super-resfriado, assumindo um estado sólido não estruturado (RALL, 1987; ARAV *et al.*, 1993). Tanto um processo quanto o outro apresentam suas vantagens e desvantagens, entretanto, a vitrificação tem se mostrado promissora na criopreservação de estruturas sensíveis a hipotermia, como é o caso de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, embriões produzidos *in vitro* e especialmente oócitos.

2.1. - VITRIFICAÇÃO

O estado vítreo é obtido com o bloqueio da cinética da cristalização através da obtenção de velocidades de resfriamento extremamente altas, do aumento da viscosidade do líquido ou do aumento da pressão hidrostática (FAHY *et al.*, 1984). Na criobiologia entretanto, este estado deve ser atingido a velocidades praticáveis, mediante o uso de estratégias de redução do volume da amostra e de aditivos crioprotetores e macromoléculas.

Apesar de amplamente conhecidas, essas estratégias não foram adequadamente associadas nos primeiros trabalhos de vitrificação, limitando a evolução da técnica.

2.2. - TOXICIDADE DOS CRIOPROTETORES

O emprego de altas concentrações de crioprotetores na vitrificação determinaram a necessidade de prevenir os danos provocados por estas substâncias. A concentração necessária para impedir a cristalização, induzir e manter o estado vítreo está relacionada com a capacidade de interação entre as moléculas de água. Entre os crioprotetores mais utilizados observa-se um decréscimo nessa habilidade no sentido do 1,2 propanediol, dimetil sulfóxido, etileno glicol até o glicerol (BAUDOT *et al.*, 2000). Contudo, o grau de toxicidade química intrínseca não obedece a mesma ordem, sendo o etileno glicol considerado o crioprotetor menos tóxico (BAUTISTA & KANAGAWA, 1998). Desta forma, o uso de dois ou mais crioprotetores associados permite a obtenção de um sinergismo entre aumento na capacidade de vitrificação e redução da toxicidade da solução. Isso ocorre em virtude da manutenção de uma alta molaridade aliada à redução da concentração individual, com redução da toxicidade por não haver um efeito aditivo nessa característica intrínseca (BAUTISTA & KANAGAWA, 1998; VAJTA, 2000).

Além da toxicidade dos crioprotetores, a alta molaridade determina um choque osmótico causador do chamado efeito de solução, além de lesões estruturais provocadas pela retração gerada durante a desidratação celular. Entretanto, a intensidade desses efeitos pode ser modulada pela concentração molar da solução de equilíbrio, temperatura ou período de exposição, permitindo a obtenção de uma maior equivalência entre desidratação e permeação dos crioprotetores.

2.3. - VELOCIDADE DE RESFRIAMENTO

Amostras de pequeno volume necessitam menores períodos para se resfriarem totalmente. Entretanto, a forma de acondicionamento da amostra pode limitar essa velocidade. No caso de palhetas seladas de 0,25ml, a taxa de resfriamento obtida é de aproximadamente 42°C/segundo, devido ao efeito de isolamento térmico. Considerando esse efeito, buscou-se o contato direto da amostra com o líquido refrigerante, o que permitiu a obtenção de velocidades superiores a 200°C/segundo, marcando o início da fase das chamadas metodologias abertas, como é o caso das “microdrops” (LANDA & TEPLA, 1990), “electron microscope grids” (MARTINO *et al.*, 1996), “open pulled straw - OPS” (VAJTA *et al.*, 1997), micropipeta de vidro (MEZZALIRA *et al.*, 1999) “minimun volume cooling” (HAMAWAKI *et al.*, 1999), “cryoloop” (LANE *et al.*, 1999) e “nylon mesh” (MATSUMOTO *et al.*, 2001).

Velocidades ainda maiores podem ser atingidas com a eliminação do efeito isolante determinado pela exposição ao vapor de nitrogênio em ebulição, o que é obtido pelo contato com uma superfície metálica resfriada “solid-surface vitrification” (DINNYÉS *et al.*, 2000) ou pelo contato direto com o líquido refrigerante submetido ao vácuo (ARAV *et al.*, 2000). Nesse caso, a redução da pressão sobre um líquido com volume constante induz o super-resfriamento, baixando a temperatura de -196 para até -210°C. Isso elimina temporariamente o vapor produzido pela ebulição observada sob condições atmosféricas normais, minimizando o efeito de isolamento térmico em torno da amostra.

A utilização de amostras de pequeno volume também proporciona altas velocidades de aquecimento prevenindo a desvitrificação das soluções.

2.4. - ADITIVOS PROTETORES

Visando melhorar a preservação da integridade funcional e estrutural, produtos como polipeptídios anticongelantes (ARAV *et al.*, 1994), antioxidantes (ZERON *et al.*, 1997) e açúcares (KULESHOVA *et al.*, 1999), têm sido utilizados com a finalidade de proteger a membrana plasmática. Ainda, ajustes entre tempo, temperatura e concentração das soluções, têm buscado uma permeação adequada e uma distribuição homogênea dos crioprotetores em todos os pontos da célula. Nesse aspecto, a ação das citocalasinas, micotoxinas que produzem estabilização citoesquelética, pode contribuir na preservação da viabilidade oocitária pós-aquecimento. Esse efeito seria determinado pelo aumento da elasticidade estrutural, (ISACHENKO *et al.*, 1998) e aumento da permeabilidade, decorrente da atuação sobre a organização da actina na região cortical dos oócitos (Le GAL *et al.*, 1994), facilitando assim o transporte de substâncias.

2.5. - CONDIÇÕES DE REGENERAÇÃO

As estruturas criopreservadas são invariavelmente submetidas a um grande estresse físico e químico (SHAW *et al.*, 2000), o que determina uma redução em sua capacidade de desenvolvimento. No caso de oócitos maturados, essa redução é da ordem de 20% (MEZZALIRA, 2001) e pode ser acentuada por condições inadequadas de manutenção. Os avanços na compreensão dos

processos metabólicos e as adequações na qualidade dos meios, são responsáveis por importantes melhorias nos índices de desenvolvimento das estruturas submetidas aos processos de criopreservação. Nesse campo, avaliações moleculares poderão definir quais os genes inativados ou ativados pelo estresse e de que forma sua expressão frente os meios e condições de manutenção disponibilizadas vão influenciar na capacidade de sobrevivência das estruturas.

2.6. – ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO

Durante o processo de maturação oocitária ocorrem alterações tanto na relação com as células do *Cumulus oophorus* quanto na sensibilidade ao resfriamento, posicionamento e ativação de organelas, condensação do material genético, na organização dos microfilamentos citoesqueléticos e na permeabilidade da membrana plasmática. No estágio imaturo, os oócitos dependem de fatores e substâncias supridas pelas células do *Cumulus oophorus* para que possam atingir a maturação. O tipo de organização dos filamentos citoesqueléticos e o coeficiente de permeabilidade da membrana citoplasmática limitam a capacidade de transporte de substâncias, fazendo com que oócitos imaturos sejam mais sensíveis a condições anisotônicas que os maturados (AGCA *et al.*, 2000). Nesse estágio, também pode ser observada uma faixa de transição térmica dos lipídios de membrana situada entre 13 e 20°C, que em oócitos maturados está mais centrada na faixa de 10°C (ARAV *et al.*, 1996).

Nos oócitos maturados, ou seja, no estágio de metáfase II da meiose II, a organização citoesquelética aliada ao maior coeficiente de permeabilidade de membrana permitem uma maior capacidade de adaptação osmótica. Entretanto, neste estágio o resfriamento determina problemas de despolimerização nos microtúbulos que formam os fusos meióticos, o que pode acarretar falhas na organização dos cromossomos na placa metafásica quando do aquecimento. Oócitos maturados também têm apresentado dificuldades de fecundação em função da precoce exocitose dos grânulos corticais, determinada pela ação de crioprotetores (FUKU *et al.*, 1995a).

A variedade de fatores que interferem direta ou indiretamente no sucesso da criopreservação de oócitos bovinos determina a necessidade de estudos cada vez mais detalhados das diferentes etapas da metodologia de vitrificação.

**3 – Capítulo 1 – BEZERROS OBTIDOS DE OÓCITOS
BOVINOS IMATUROS VITRIFICADOS COM A
TECNOLOGIA OPS**

(Calves Born After OPS vitrification of immature bovine oocytes)

VIEIRA, A.D.¹; MEZZALIRA, A.¹; BARBIERI, D.P.¹;
LEHMKUHL, R.C.¹; RUBIN, M.I.B.²; VAJTA, G.³

¹Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Lages, SC, Brasil.

²Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Department of Breeding and Genetics, Danish Institute of Agricultural Science,
Research Centre Foulum, Denmark.

RESUMO

Neste estudo avaliou-se o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS, o efeito do pré-tratamento com citocalasina D (CD) e a solução crioprotetora composta por 20% de etileno glicol (EG) + 20% de dimetil sulfóxido (Me₂SO) + 0,5 M de sacarose (SAC). Oócitos obtidos de ovários de matadouro foram aleatoriamente distribuídos em três grupos: controle (n=442), vitrificado (Vitri n=356) e tratado com 20 µg/ml de CD durante 10 a 20 minutos e vitrificado (CDVitri n=355). Após a vitrificação e aquecimento, os oócitos de todos os grupos foram simultaneamente submetidos aos mesmos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A viabilidade *in vitro* foi avaliada através das taxas de clivagem e blastocistos, enquanto que a viabilidade *in vivo* foi avaliada pela transferência dos blastocistos (1 ou 2 por receptora) derivados dos grupos CDVitri e Vitri. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) nas taxas de clivagem e blastocistos entre os grupos CDVitri (46,4% e 3,5%) e Vitri (49,0% e 6,1%) respectivamente, sendo ambos inferiores ($P < 0,05$) ao grupo controle (85,1% e 45,9%). Após a transferência de 8 embriões do grupo Vitri (cinco receptoras), obteve-se o nascimento de uma fêmea e um macho. Já no grupo CDVitri, de 3 embriões transferidos obteve-se uma fêmea (duas receptoras). Esses resultados permitem concluir que o pré-tratamento com citocalasina D não melhora a viabilidade embrionária de oócitos bovinos imaturos vitrificados, entretanto, a solução de vitrificação utilizada é efetiva na criopreservação de oócitos imaturos, com a tecnologia OPS e os embriões obtidos com

essa tecnologia, possibilitam a obtenção do nascimento de produtos normais e saudáveis, mesmo quando submetidos a nova vitrificação no estágio de blastocisto expandido.

Palavras chave: bovino; imaturo; oócito; vitrificação; OPS; citocalasina D.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* development of embryos derived from immature vitrified bovine oocytes. In addition pre-treatment with cytochalasin D and a cryoprotectant solution composed by 20% ethylene glycol (EG) + 20% dimethyl sulfoxide (Me₂SO) and 0.5 M sucrose (SUC), with OPS technology, was also evaluated. Oocytes from slaughterhouse ovaries were allocated in three groups: a control group (n=442), a vitrified group (Vitri; n=356) and a group exposed to 20 µg/ml of CD for 10 to 20 minutes and vitrified subsequently (CDVitri; n=355). After vitrification and warming all groups were simultaneously submitted to *in vitro* maturation, fertilization and embryo culture. *In vitro* viability was assessed by cleavage and blastocyst rates and *in vivo* viability by transfer of blastocysts (1 or 2 per recipient) from CDVitri and Vitri groups. No differences were observed in cleavage and blastocyst rates between CDVitri (46.4% and 3.5%) and Vitri (49.0% and 6.1%) groups respectively, and both were lower (P<0.05) than control group (85.1% and 45.9%). A female calf was obtained from CDVitri group (two recipients) and a female and a male calf birth from the Vitri group (five recipients), were obtained. These data indicate that the

cytochalasin D pre-treatment do not improve viability of embryos derived from vitrified immature bovine oocytes; that OPS technology with a cryoprotectant solution composed by 20% EG + 20% Me₂SO and 0.5 M SUC is effective for vitrification of immature oocytes, and that embryos obtained from immature oocytes vitrified with this technology are fully competent to develop healthy offspring, even when submitted to a further vitrification procedure at blastocyst stage.

Key words: bovine; immature; oocyte; vitrification; OPS; cytochalasin D.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de oócitos é uma ferramenta de alto impacto na manutenção da variabilidade genética, na preservação de recursos genéticos, bem como para a indústria pecuária. Associada a outras biotecnologias, ainda poderia ser usada para aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas superiores. Porém, características biológicas intrínsecas dos oócitos (alta sensibilidade da membrana ao resfriamento, baixa área de superfície em relação ao volume e alto teor de lipídios) limitam o progresso nessa área (16). Vários problemas específicos relacionados com o estágio meiótico de maturação têm sido descritos (19). Em oócitos maturados, a hipotermia determina alterações microtubulares e o rompimento dos microfilamentos (1, 2, 9, 32). Estes problemas poderiam ser contornados com a criopreservação de oócitos imaturos (19), já que nesta fase eles não

apresentam sistema de fusos meióticos organizados e microtúbulos sensíveis ao resfriamento (16). No entanto, os melhores resultados obtidos com oócitos maturados (6, 21) levaram a criopreservação de oócitos imaturos a ser considerada menos viável, sendo então menos investigada. Porém, a obtenção de blastocistos (15, 18), gestações (28, 37) e até bezerros nascidos (14, 34), derivados de oócitos imaturos criopreservados, demonstram que a técnica é viável e atraente. A criopreservação de oócitos imaturos pode dispensar temporariamente a necessidade de um laboratório equipado para produção *in vitro* de embriões, podendo então ser aplicada no campo. Os baixos resultados verificados com oócitos imaturos, devem-se, ao menos em parte, a um inadequado procedimento de criopreservação. Muitas vezes, os efeitos do tempo de exposição a temperaturas entre 20 e 13°C (2), o baixo coeficiente de permeabilidade da membrana, a alta relação volume/superfície e a ruptura dos processos intercomunicantes (9), não são devidamente considerados. Estes processos e as “gap junctions” têm um papel importante na cooperação metabólica entre as células do *cumulus* e o oócito, durante o crescimento e a fase final de maturação (7, 8, 19). Apesar dos primeiros bezerros nascidos de oócitos imaturos criopreservados terem sido obtidos com o congelamento convencional, a vitrificação e o método ultra-rápido têm sido mais indicados (13, 23, 24, 31, 32) por permitirem a redução nos efeitos determinados pela hipotermia. Taxas de resfriamento elevadas, reduzem o tempo de exposição à zona crítica de temperatura (3, 36). A citocalasina apresentou um efeito positivo com oócitos suínos imaturos (12), provavelmente por proporcionar uma maior

flexibilidade ao citoesqueleto. Em oócitos caprinos, a citocalasina também atua na organização da actina, provavelmente ao nível cortical, melhorando a permeabilidade celular (17), em função das alterações na organização citoesquelética. Isto poderia preservar a funcionalidade dos processos intercomunicantes e permitir uma penetração mais rápida e uniforme dos crioprotetores, aumentando a viabilidade após a criopreservação. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de oócitos bovinos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS na produção de embriões e bezerros saudáveis. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos do pré-tratamento com citocalasina D e a solução crioprotetora composta de etileno glicol, dimetil sulfóxido e sacarose na vitrificação de oócitos bovinos imaturos.

MATERIAL E MÉTODOS

Exceto onde indicado, todos os reagentes químicos foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Nas manipulações de oócitos e embriões foram utilizadas placas de quatro poços obtidas da Nunc A/S (Roskilde, Denmark).

Coleta dos oócitos

Ovários bovinos coletados no matadouro foram mantidos a 35°C em solução salina fisiológica adicionada de penicilina (65 mg/l) e estreptomicina (50 mg/l), durante o transporte ao laboratório (4 horas). Os complexos cumulus-oócitos (CCO's) foram aspirados de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro através de uma

agulha 19G ligada a uma linha de vácuo com pressão de aspiração de 20 ml/minuto. Durante a seleção e até o início dos tratamentos, os CCO's foram mantidos em fluido folicular (FF) (20).

Tratamentos

Oócitos com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por células compactas do *Cumulus oophorus* foram aleatoriamente distribuídos em três grupos com 20 a 25 CCO's em 16 repetições. Utilizou-se um grupo de CCO's controle, um grupo de vitrificação direta (Vitri) e um grupo exposto a citocalasina D (CD) antes da vitrificação (CDVitri).

Vitrificação e aquecimento

Todos os procedimentos foram realizados sobre mesas aquecidas a 39°C e em sala climatizada a 24°C. Inicialmente, os CCO's do grupo CDVitri foram transferidos do FF para a solução de 20 µg/ml de CD em meio de manutenção (TCM-199 tamponado com HEPES e suplementado com 10% de soro de égua em estro - SEE) por 10 a 20 minutos. Durante esse período inicial foram vitrificados os CCO's do grupo Vitri. No processo de vitrificação (11, 36), os CCO's foram expostos por 30 segundos a solução SV50, composta por 10% (v/v) etileno glicol (EG) + 10% (v/v) dimetil sulfoxido (Me₂SO) em TCM-HEPES (Meio 199 tamponado com HEPES e suplementado com 20% de SEE). Após isso, os CCO's foram expostos por 25 segundos a solução SV100, composta por 20% (v/v) EG + 20% (v/v) Me₂SO + 0,5 M de sacarose (SAC) em TCM-HEPES. Quatro a cinco CCO's

contidos em 2 a 3 µl de SV100 foram envasados na OPS (Szigta Ltd, Melbourn, Australia) e mergulhados no nitrogênio líquido. Os CCO's do grupo CDVitri foram vitrificados imediatamente após os do Grupo Vitri, determinando um tempo total de 20 minutos para realização de todo o procedimento de vitrificação. Após isso, as OPS foram mantidas em nitrogênio líquido por pelo menos dois minutos, antes do procedimento de aquecimento, que foi iniciado por um diferente grupo a cada repetição.

Cada OPS foi exposta ao ar por 4 segundos antes da extremidade da palheta ser mergulhada em meio de manutenção com 0,26 M SAC. Após 5 minutos, os CCO's foram transferidos para um novo meio com 0,16 M SAC por mais 5 minutos, antes de serem transferidos para o meio de manutenção. Os CCO's do grupo controle foram transferidos do FF para o meio de manutenção ao final dos procedimentos de aquecimento. Sessenta minutos após iniciado o processo de vitrificação, os CCO's dos três grupos se encontravam em meio de manutenção, sendo simultaneamente submetidos aos mesmos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

Maturação *in vitro*

A maturação foi realizada em Meio TCM-199 saís de Earle (GIBCO BRL, Paisley, UK) adicionado de 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de rFSHh/ml, 0,5 µg/ml de LHb e 10% de SEE, (4), por 24 horas, em estufa a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

Fecundação *in vitro*

A fecundação foi realizada com sêmen congelado de um touro da raça charolesa, sendo os espermatozóides selecionados pelo método de migração ascendente “swim-up” (29). Os CCO's foram incubados com $1,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml por um período de 18 a 22 horas a 39°C em 5% de CO₂ e umidade máxima, em meio TALP-FERT adicionado de 30 µg/ml de heparina, 30 µg/ml de penicilinamina, 15 µM de hipotaurina e 1 µM de epinefrina (36).

Cultivo *in vitro*

Vinte e quatro horas após a inseminação, procedeu-se a remoção das células do *Cumulus oophorus* através de agitação mecânica e a transferência dos prováveis zigotos para placa contendo 400 µl de meio SOFaaci (10), suplementado com 30 µl/ml de aminoácidos essenciais (BME) e 10 µl/ml de aminoácidos não essenciais (MEM), com 5% de SEE e mantido sob óleo mineral. Após 24 horas de cultivo, a 39°C em 5% de CO₂ e umidade máxima realizou-se a avaliação da clivagem, sendo mantidas na placa apenas as estruturas clivadas. Após isso, a incubação foi realizada em bolsas plásticas (35) a 39°C, com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ durante o período de cultivo remanescente (162 horas).

Avaliação embrionária

A viabilidade embrionária *in vitro* foi determinada através da avaliação das taxas de clivagem e de blastocistos, obtidas às 48 e 192 horas após a inseminação, respectivamente.

Transferência embrionária

Os embriões obtidos de ambos tratamentos (n=11) foram transferidos (1 ou 2 por receptora) para 7 novilhas síncronas, de acordo com a disponibilidade de manifestação de cio natural. Na primeira transferência foram utilizados dois blastocistos do grupo Vitri. Os outros embriões foram submetidos a uma nova vitrificação no estágio de blastocisto, em função de falta de sincronia entre o ciclo das receptoras e seu desenvolvimento nas repetições. Para vitrificação, inicialmente os embriões foram expostos a solução SV50 por 1 minuto e em seguida expostos a solução SV100 por 25 segundos, sendo que esta última foi modificada pela remoção da sacarose do meio TCM-Hepes. Seis blastocistos vitrificados, derivados do grupo Vitri foram transferidos para quatro receptoras e três blastocistos vitrificados do grupo CDVitri foram transferidos para duas receptoras.

Análise estatística

Os dados foram submetidos a transformação pelo arco seno da raiz quadrada. Os valores transformados foram submetidos a análise de variância, utilizando-se o PROC GLM do pacote estatístico SAS. Quando a análise de variância revelou o efeito significativo ($P < 0,05$) dos tratamentos, os dados foram comparados pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

Desenvolvimento embrionário *in vitro*

Não foram observadas diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os grupos CDVetri (46,4% e 3,5%) e Vitri (49,0% e 6,1%), sendo ambos significativamente inferiores ($P<0,05$) ao grupo Controle (85,1% e 45,9%), em relação as taxas de clivagem e blastocistos, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos derivados de oócitos imaturos vitrificados pelo método OPS

Tratamentos	Oócitos n	Clivados n (%)	Blastocistos em D8 n (%)
Controle não vitrificado	442	377 (85,1) ^a	207 (45,9) ^a
CDVetri Citocalasina D + vitrificado	355	165 (46,4) ^b	13 (3,5) ^b
Vitri Vitrificado	356	175 (49,0) ^b	22 (6,1) ^b

^{a b} Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$).

Desenvolvimento embrionário *in vivo*

No grupo Vitri, duas das cinco receptoras ficaram prenhes. A primeira recebeu dois embriões, resultando no nascimento de uma fêmea normal e saudável. A segunda, recebeu dois embriões vitrificados no estágio de blastocisto, produzindo um macho normal e saudável. No grupo CDVetri foram utilizadas duas receptoras, das quais, a que recebeu dois embriões vitrificados no estágio de blastocisto produziu uma fêmea normal e saudável.

DISCUSSÃO

Muitos pesquisadores têm usado extensivamente a citocalasina como estabilizador do citoesqueleto em programas de reprodução assistida (22, 30) e alguns deles têm tratado os embriões com citocalasina associada a centrifugação para manter os grânulos lipídicos polarizados na periferia da célula (5, 27). Entretanto, estudos criobiológicos sobre o efeito de substâncias estabilizadoras do citoesqueleto do oócito são escassos na maioria das espécies, principalmente na bovina.

Em oócitos caprinos imaturos, ocorre um aumento no coeficiente de permeabilidade após a exposição à citocalasina D, alcançando o mesmo coeficiente observado em oócitos maturados (17), o que poderia determinar um aumento na viabilidade depois da criopreservação. Em oócitos imaturos de suínos, Isachenko *et al.* (12) observaram um efeito positivo do pré-tratamento com Citocalasina B na criopreservação de oócitos no estágio de vesícula germinativa. Mezzalira *et al.* (26), observaram que independente da concentração utilizada, a citocalasina B não produz efeito benéfico na criopreservação de oócitos maturados e de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* (25). Neste estudo, o pré-tratamento dos oócitos com citocalasina D não teve um efeito positivo na manutenção da viabilidade, indicando que os danos determinados pela criopreservação não foram prevenidos. Isto pode ser demonstrado inicialmente pela semelhança entre as taxas de clivagem observadas

nos tratamentos CDVitri (46,4%) e Vitri (49,0%). Esses índices são similares aos 42,1% obtidos por Suzuki *et al.* (34) com o congelamento convencional e superiores aos 25,6% alcançados por Le Gal & Massip, (18) com a vitrificação de oócitos imaturos. Os resultados do presente estudo demonstram um crescente desenvolvimento da criopreservação para oócitos imaturos por estarem muito próximos aos 50% obtidos por Vajta *et al.* (36) e dos 49.1% de Mezzalira *et al.* (25), que vitrificaram oócitos maturados.

Entretanto, esses índices de clivagem determinaram taxas de blastocistos de apenas 0,8% (34), 3,3% (18), 3,5% no grupo CDVitri e 6,1% no grupo Vitri, confirmando as observações de Fuku *et al.*, (7) que a taxa clivagem não é um parâmetro satisfatório para avaliação da viabilidade embrionária. Isto pode explicar a baixa correlação deste parâmetro com a capacidade de desenvolvimento após a ativação do genoma embrionário na grande maioria das pesquisas que envolvem a criopreservação.

Embora os resultados ainda sejam pouco satisfatórios para uso comercial, a elevação nas taxas de blastocistos caracteriza um avanço na criopreservação de oócitos imaturos. A obtenção de bezerros saudáveis e normais nesta pesquisa, aliada a outros relatos de nascimento (14, 34), sugerem que em alguns oócitos imaturos e em alguns embriões derivados dos mesmos, a criopreservação não gera danos suficientes para bloquear a posterior capacidade de desenvolvimento. A identificação desse mecanismo seletivo, poderia proporcionar um incremento nos resultados com a criopreservação dessas estruturas.

Neste estudo observou-se que o pré-tratamento com citocalasina D não aumenta a viabilidade dos embriões obtidos de oócitos bovinos imaturos vitrificados. No entanto, a solução crioprotetora composta de etileno glicol, dimetil sulfóxido e sacarose foi eficiente para vitrificação com a tecnologia OPS. O baixo custo, simplicidade de aplicação e a possibilidade de obtenção de bezerros normais e saudáveis a partir de oócitos imaturos vitrificados tornam esse método atraente para preservação e multiplicação dos recursos genéticos femininos. Porém, novos estudos devem ser conduzidos com o objetivo de melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Brasileiro de Pesquisa (CNPq), pela suporte da bolsa de pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Aman, R. R. and Parks, L. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **50**, 103 – 110 (1994).
2. Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S. B., Behboodi, E., Anderson, G. B. and Crowe, J. H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* **33**(6), 589 – 599 (1996).

3. Arav, A., Zeron, Y., Ocheretny. A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* **53**, Abstract 248 (2000).
4. Figueiró, G. M. “Bovine in vitro embryo production with estrum mare serum”. *In* Master dissertation, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, (2001).
5. Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G.J. and Downey, B.R. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology* **29**, 485 - 492 (1992).
6. Fuku, E., Xia, L. and Downey, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **32**, 139 – 156 (1995).
7. Fuku, E., Liu, J. and Downey, B. R. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 177 - 185 (1995).
8. Gordon, I. Oocyte recovery and maturation, p. 117, Ch II. *In* “Laboratory Production of Cattle Embryos”, 626 p. University Press, Cambridge. 1994.
9. Hochi, S., Kimura, K., Hirabayashi, M. Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. *Theriogenology* **47**, Abstract 345 (1997).
10. Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H. Greve, T., Callesen, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with

- sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52**, 683 – 700 (1999).
11. Hyttel, P., Vajta, G., Callesen, H. Vitrification of bovine oocytes with the Open Pulled Straw method: Ultrastructural consequences. *Mol. Reprod. Dev.* **56**, 80 – 88 (2000).
 12. Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* **36**, 250 – 253 (1998).
 13. Isachenko, V., Alabart, J. L., Nawroth, F., Isachenko, E., Vajta, G., Folch, J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryobiology* **22**, 157 – 162 (2001).
 14. Kubota, C., Yang, X., Dinnyes, A., Todoroki, J., Yamakuchi, H., Mizoshita, K., Inohac, S. and Tabara, N. In vitro survival frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Dev.* **51**(3), 281 – 286 (1998).
 15. Küchenmeister, U. and Kuwayama, M. *In vitro* blastocysts formation after vitrification of immature bovine oocytes. *Theriogenology* **47**, Abstract 348 (1997).
 16. Ledda, S., Leoni, G., Bogliolo, L., Naitana, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* **55**, 1359 - 1371 (2001).
 17. Le Gal, F. L., Gasqui, P. and Renard, J. P. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a

- quantitative analysis using goat oocytes as a model. *Cryobiology* **31**, 154 - 170 (1994).
18. Le Gal, F. and Massip, A. Development of thawed oocytes fertilized *in vitro* after vitrification by the open pulled straw method before or after *in vitro* maturation. In "Gametes: Development and Function" (A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne, L. Gianaroli Eds.), Serono Symposia, p. 554., Rome, 1998.
 19. Le Gal, F. and Massip, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, Cycloheximide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* **38**, 290 - 300 (1999).
 20. Lehmkuhl, R. C. "Development of bovine oocytes maintained in follicular fluid". In Master dissertation, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brazil, (2001).
 21. Lim, J. M., Fukui, Y. and Ono, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* **37**, 351 – 361 (1992).
 22. MacGrath, J. and Solter, D. Nuclear transplantation in the mouse embryo using microsurgery and cell fusion. *Science* **220**, 1300 - 1302 (1983).
 23. Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* **54**, 1059-1069 (1996).
 24. Martino, A., Pollard, J. W. and Leibo, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Develop.* **45**, 503 - 512 (1996).

25. Mezzalira, A. “Cryopreservation and *in vitro* development of bovine oocytes treated with cytochalasin B”. *In* Doctoral thesis, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brazil, (2001).
26. 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. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. *Theriogenology* **57**, Abstract 472 (2002).
27. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashmann, R.J., Grupen, C.G., Seamark, R.F. and Nottle, M.B. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.* **51**, 618 - 622 (1994).
28. Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N. And Suzuki, T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology* **32**, 455 – 460 (1995).
29. Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S., Eyestone, W. H., First, N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* **25**, 591 – 600 (1986).
30. Prather, R.S. and First, N.L. Effect of cytochalasin-b and demecolcine on freeze-thaw survival of murine embryos *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **239**, 37 - 40 (1986).
31. Ruffing, N. A., Stephonkus, P. L., Pitt, R. E. and Parks, J. E. Osmometric behavior, hydraulic conductivity and incidence of

- intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology* **30**, 562 - 580 (1993).
32. Saunders, K. M. and Parks, J. E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **61**, 178 – 187 (1999).
33. Shaw, J. M., Oranratnachai, A. and Trounson, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* **53**, 59 - 72 (2000).
34. Suzuki, T., Boediono, A., Takagi, M., Saha, S. and Sumantri, C. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. *Cryobiology* **33**, 515 - 524 (1996).
35. Vajta, G., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. The Submarine Incubation System, a new tool in vitro embryo culture. A technique report. *Theriogenology* **48**, 1379 – 1385 (1997).
36. Vajta, G., Holm, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **51**, 53 - 58 (1998).
37. Yang, B. C., Ryu, L. S., Kim, I. H., Yeon, S. H., Choi, S. S., Son, D. S., Im, K. S. and Hwang, W. S. Effect of freezing of immature and mature bovine oocytes on their development to blastocyst *in vitro*. In “Proceedings, 8th World Confer. on An. Prod”, vol. II, pp. 950 – 951, Seoul, Korea, 1998.

4- DISCUSSÃO

Os baixos percentuais de desenvolvimento obtidos com a maioria dos métodos de criopreservação, especialmente com oócitos imaturos, têm determinado que em muitos trabalhos a progressão até o estágio de metáfase II, formação de pró núcleos ou clivagem, sejam utilizados como parâmetros de viabilidade após a criopreservação. Mesmo que esses parâmetros sejam indicativos de diferenças na viabilidade, quando se compara duas metodologias, eles não são suficientemente efetivos para prever a capacidade do futuro desenvolvimento dos embriões. FUKU *et al.* (1995b) observaram uma baixa correlação desses parâmetros com o posterior desenvolvimento embrionário.

Na criopreservação de oócitos bovinos imaturos, bons índices de clivagem já foram obtidos. SUZUKI *et al.* (1996) obtiveram 42,1% com o congelamento rápido e Le GAL & MASSIP, (1998) alcançaram 25,6% com a vitrificação. Os resultados verificados neste experimento, 46,4% e 49,0% nos grupos CDVitri e Vitri, respectivamente, são comparáveis aos melhores índices encontrados na literatura. Entretanto, mesmo com bons índices de clivagem as taxas de desenvolvimento ainda são consideradas muito pobres. Isto pode ser exemplificado pelos 0,8% de blastocistos obtidos por SUZUKI *et al.* (1996) e 3,6% obtidos por YANG *et al.* (1998), com congelamento rápido de oócitos bovinos imaturos. Com a vitrificação em OPS, Le GAL & MASSIP (1998) alcançaram 3,3% de blastocistos fazendo uso de etileno glicol, glicerol e galactose. Resultados semelhantes também foram observados na presente pesquisa com

3,5% de blastocistos em D8 no grupo CDVitri e 6,1% no grupo Vitri. Estes resultados reforçam as observações de FUKU *et al.* (1995b), de que a clivagem não é um parâmetro satisfatório para avaliação da viabilidade pós criopreservação. Mesmo que os resultados ainda não sejam satisfatórios para uso em larga escala, os 6,1% de blastocistos verificados no grupo Vitri, representam um incremento importante em relação aos resultados já obtidos. Isto caracteriza uma evolução na técnica de vitrificação. Embora os índices sejam baixos, a maior viabilidade (6,1%) observada no grupo Vitri, em relação aos 3,3% observados por Le GAL & MASSIP (1998), pode ter sido determinada pela maior permeabilidade e capacidade de manutenção do estado vítreo conferida pelo dimetil sulfóxido utilizado neste experimento, em relação ao glicerol, utilizado por aqueles autores.

A identificação das causas que determinam o baixo desenvolvimento embrionário após a criopreservação de oócitos, mesmo com boas taxas de clivagem, poderia representar uma contribuição importante para a adequar a metodologia de criopreservação. LUNA *et al.* (2001), utilizando a mesma solução de vitrificação empregada neste experimento, evidenciaram que com oócitos imaturos, a incidência de poliploidia é significativamente maior do que a observada com a vitrificação após 8, 12 ou 22 horas de maturação. Essas observações sugerem que a baixa capacidade de desenvolvimento embrionário após a criopreservação de oócitos imaturos pode ser decorrente de alterações genômicas.

Entretanto, relatos de nascimento de produtos (SUZUKI *et al.*, 1996; KUBOTA *et al.*, 1998) e os nascimentos obtidos a partir da

transferência de blastocistos expandidos, tanto do grupo Vitri quanto do grupo CDVitri, sugerem que em alguns oócitos o efeito da criopreservação não gera danos capazes de bloquear a capacidade de desenvolvimento embrionário posterior a clivagem. Desta forma, a evolução da técnica de criopreservação de oócitos imaturos depende da identificação dos mecanismos que permitem a evolução de alguns embriões, em relação aos demais.

Informações referentes ao efeito dos estabilizadores do citoesqueleto na criopreservação de oócitos são escassas, principalmente na espécie bovina. Com embriões bovinos produzidos *in vivo*, DOBRINSKI *et al.* (1995) obtiveram um incremento de 23 para 61% no percentual de desenvolvimento de mórulas e blastocistos vitrificados após tratamento com citocalasina B. Todavia, MEZZALIRA *et al.* (2002) observaram que independente da concentração utilizada, a citocalasina B não produz efeito benéfico na criopreservação de oócitos bovinos maturados, bem como na criopreservação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Em caprinos, oócitos imaturos aumentaram seu coeficiente de permeabilidade após serem expostos a citocalasina D, atingindo o mesmo coeficiente observado em oócitos maturados (Le GAL *et al.*, 1994), o que poderia determinar um aumento na viabilidade destas estruturas após a criopreservação. Na espécie suína, ISACHENKO *et al.* (1998), observaram um efeito positivo da citocalasina B sobre oócitos imaturos vitrificados. Entretanto, neste estudo o pré-tratamento dos oócitos com citocalasina D não teve influência positiva sobre a manutenção da viabilidade, indicando que seus efeitos não

foram suficientes para prevenir os danos causados pela criopreservação. Isto é demonstrado pela semelhança nas taxas de clivagem (46,4 e 49,0%) e de blastocistos (3,5 e 6,1%), entre os tratamentos CDVitri e Vitri, respectivamente. Embora a citocalasina D não tenha proporcionado um incremento na viabilidade de oócitos pós vitrificação, ela não exerceu um efeito negativo sobre o futuro desenvolvimento dos oócitos. Isto é demonstrado pelo nascimento de uma bezerra normal e saudável após transferência de blastocistos vitrificados, provenientes de oócitos do grupo CDVitri.

A facilidade de execução, o baixo custo e a possibilidade de aplicação direta no campo fazem da vitrificação de oócitos imaturos uma alternativa atraente de criopreservação, com possibilidade de aplicação em larga escala, permitindo o aproveitamento do potencial de fêmeas superiores e a preservação da variabilidade genética. As novas investigações que deverão ser conduzidas para solucionar os problemas ainda existentes poderão possibilitar a obtenção de melhores índices de desenvolvimento embrionário, num futuro próximo.

5 - CONCLUSÕES

- Embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados com a tecnologia OPS apresentam capacidade de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*, permitindo a obtenção de bezerros normais e saudáveis.

- Embriões derivados de oócitos imaturos vitrificados, submetidos a nova vitrificação no estágio de blastocisto expandido, possibilitam a obtenção de bezerros normais e saudáveis.
- O pré-tratamento com 20µg/ml de citocalasina D não aumenta o potencial de desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos imaturos e vitrificados com a tecnologia OPS.
- A solução de crioprotetora composta por 20% de etileno glicol, 20% de dimetil sulfóxido e 0,5 M de sacarose mostrou-se eficiente para a vitrificação de oócitos bovinos imaturos com a tecnologia OPS.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGCA, Y., LIU, J., RUTLEDJE, J. J. *et al.* Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.55, p.212-219, 2000.
- AMAN, R. R. and PARKS, L. E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.50, p.103–110, 1994.
- ARAV, A., SHEDU, D. and MATTIOLI, M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reprod. Fert.**, v.99, p.353–358, 1993.
- ARAV, A., RUBINSKY, B., SEREN, E. *et al.* The role of thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.41, p.107–112, 1994.

- ARAV, A., ZERON, Y., LESLIE, S. B. *et al.* Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, p.589–599, 1996.
- ARAV, A., ZERON, Y. and OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows succesful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.248, 2000. Abstract
- BAUDOT, A., ALGER, L., BOUTRON. Glass-forming tendency in the system water-dimehyl sulfoxide. **Cryobiology**, v.40, p.151–158, 2000.
- BAUTISTA, J. A. N. and KANAGAWA, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. **Jpn. J. Vet. Res.**, v. 45, n.4, p.183–191, 1998.
- DINNYÉS, A., DAÍ, Y., JIANG, S. *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod.**, v.63, p.513–518, 2000.
- DOBRINSKY, J. R., OVERSTROM, E. W., DUBY, R. T. *et al.* Effect of cytoskeletal stabilization on the development of bovine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.199, 1995. Abstract
- FAHY, G. M., MACFARANE, D. R., ANGELL, C. A. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407–426, 1984.

- FIGUEIRÓ, G.M. **Produção in vitro de embriões bovinos com soro de égua em estro**. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- FUKU, E., KOJIMA, T., SHIOYA, Y. *et al.* In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v.29, p.485-492 (1992).
- FUKU, E., XIA, L. and DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156 1995a.
- FUKU, E., LIU, J. and DOWNEY, B. R. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Mol. Reprod. Dev.**, n.40, p.177-185, 1995b.
- GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. In: **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Cambridge, University Press, 1994. cap.2, p.117.
- HOCHI, S., KIMURA, K. and HIRABAYASHI, M. Effect of nuclear stages during in vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.345, 1997. Abstract
- HAMAWAKI, A. KUWAYAMA, M. and HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.165, 1999. Abstract
- HOLM, P., BOOTH, P. J., SCHMIDT, M. H. *et al.* High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-

inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683–700, 1999.

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

ISACHENKO, V., SOLER, C. and ISACHENKO, E. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**, v.36, p.250–253, 1998.

ISACHENKO, V., ALABART, J. L., NAWROTH, F. *et al.* The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? **Cryobiology**, v.22, p.157–162, 2001.

KUBOTA, C., YANG, X., DINNYÉS, A. *et al.* In vitro survival frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, n.3, p.281–286, 1998.

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

KULESHOVA, L. L., MacFARLANE, D. R., TROUSON, A. O. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.119–130, 1999.

- LANDA, V. and TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8 – cell embryos in microdrops. **Folia Biol.**, v.36, p.153–158, 1990.
- LANE, M., SCHOOLCRAFT, W. B. and GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoolop containerless technique. **Fertil. Steril.**, v.72, p.1073-1078, 1999.
- LEDDA, S., LEONI, G., BOGLIOLO, L. *et al.* Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v.55, p.1359-1371, 2001.
- Le GAL, F. L., GASQUI, P. and RENARD, J. P. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model. **Cryobiology**, v.31, p.154-170, 1994.
- Le GAL, F. and MASSIP, A. Development of thawed oocytes fertilized *in vitro* after vitrification by the open pulled straw method before or after *in vitro* maturation. In **”Gametes: Development and Function”** (A. Lauria, F. Gandolfi, G. Enne, L. Gianaroli Eds.), Serono Symposia, p. 554., Rome, 1998.
- Le GAL, F. and MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, Cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v.38, p.290-300, 1999.
- LEHMKUHL, R. C. **Desenvolvimento de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular.** 2001. 16f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2001.

- LIM, J. M., FUKUI, Y. and ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.351–361, 1992.
- LUNA, H. S., FERRARI, I. and RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II completion of maturation. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.23–28, 2001.
- MacGRATH, J. and SOLTER, D. Nuclear transplantation in mouse embryo using microsurgery and cell fusion. **Science**, v.220, p.1300-1302, 1983.
- MARTINO, A., SONGSASEN, N. and LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1059-1069, 1996.
- MARTINO, A., POLLARD, J. W. and LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Develop.**, v.45, p.503-512, 1996.
- MATSUMOTO, H., JIANG, J. Y., TANAKA, T. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v.42, p.139–144, 2001.
- MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., MULLER, F. *et al.* Vitricação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, p.262, 1999. (Supl.).

- MEZZALIRA, A. **Criopreservação e desenvolvimento de oócitos bovinos tratados com citocalasina B.** 2001. 64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001.
- MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D., BARBIERI, D. P. *et al.* Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. **Theriogenology**, v.57, n. 1, p.472, 2002. Abstract
- NAGASHIMA, H., KASHIVAZAKI, N., ASHMANN, R. J. *et al.* Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biol. Reprod.** v.51, p.618-622, 1994.
- OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N. *et al.* *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455–60, 1995.
- PRATHER, R. S. and FIRST, N. L. Effect of cytochalasin-b and demecolcine on freeze-thaw survival of murine embryos in vitro. **J. Exp. Zool.** v.239, p.37-40, 1986
- PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591–600, 1986.
- POLGE, C., SMITH, A. U. and PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, v.164, p.666-668, 1949.
- RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387–402, 1987.

- RUFFING, N. A., STEPHONKUS, P. L., PITT, R. E. *et al.* Osmometric behavior, hydraulic conductivity and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology**, v.30, p.562-580, 1993.
- SAUNDERS, K. M. and PARKS, J. E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.61, p.178–187, 1999.
- SHAW, J. M., ORANRATNACHAI, A. and TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SUZUKI, T., BOEDIONO, A., TAKAGI, M. *et al.* Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. **Cryobiology**, v.33, p.515-524, 1996.
- VAJTA, G., BOOTH, P. J., HOLM, P. *et al.* 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., HOLM, M., BOOTH, P.J. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.
- VAJTA, G. Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre v.28, n.1, p.85-94, 2000. (Supl.)

YANG, B. C., RYU, L. S., KIM, I. H. *et al.* Effect of freezing of immature and mature bovine oocytes on their development to blastocyst *in vitro*. In: World Confer. on An. Prod., 8., vol. II, 1998, Seoul. **Proceedings** ... Seoul, 1998, p.950–951.

ZERON, Y., ARAV, A. and CROWE, J. H. The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the lipid phase transition in immature and mature bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.362, 1997.

Abstract