

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS
COM 1,2PROPANEDIOL

LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA VETERINÁRIA

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS
COM 1,2 PROPANEDIOL

LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO

SOB ORIENTAÇÃO DO PESQUISADOR

DR. WANDERLEI FERREIRA DE SÁ

Tese submetida como requisito parcial para a
obtenção do grau de Magister Scientiae em
Patologia Veterinária, Área de Concentração
Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação
Artificial

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

SETEMBRO, 1995

TÍTULO DA TESE

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS
COM 1,2 PROPANEDIOL**

AUTOR

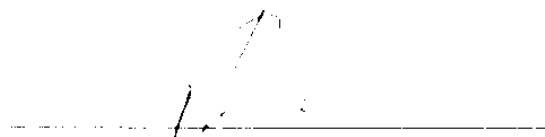
LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO

APROVADA EM: 21/09/2005

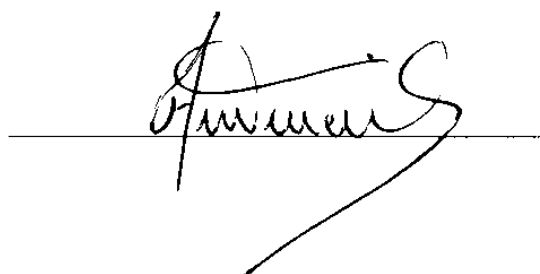
Dr. Wanderlei Ferreira de Sá
Orientador



Prof. ° Dr. Flamarion T. Albuquerque
Co-orientador



Dr. Ademir de Moraes Ferreira



À Deus, por ter-me fornecido força de vontade e perseverança.

À meus pais, Paulo Sérgio e Ana Tereza, pelo amor e dedicação.

À meus irmãos, Paulo Otávio, Ana Paula e Ana Fernanda, pela amizade e apoio.

À Alessandra, pela paciência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Comissão Orientadora, Dr. Wanderlei Ferreira de Sá e professor Dr. Flamarion Tenório Albuquerque, pela orientação, amizade e apoio que nos foi dispensada.

Ao Dr. Ademir de Moraes Ferreira e Professor Dr. Eduardo Paulino da Costa, pelas sugestões, apoio e amizade.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pela oportunidade oferecida para realização do curso.

Aos professores da UFRRJ, pela amizade e auxílio durante minha permanência na Instituição.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, pelo apoio técnico e financeiro.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos técnicos do Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA-CNPGL, Adirson Policarpo, Everaldo Lopes Alvim, Gilmar Pereira Alvim, João Batista Leal de Faria e Marcos Antônio de Freitas, pelo apoio, amizade e compreensão.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO, filho de Paulo Sérgio de Almeida Camargo e Ana Tereza de Almeida Camargo, nasceu em 31 de dezembro de 1967, na cidade de Itapeva, estado de São Paulo.

Ingressou em agosto de 1987 na Universidade Estadual de Londrina (UEL), diplomando-se em agosto de 1992 como Médico Veterinário.

Realizou diversos estágios na área de Clínica e Reprodução de Grandes Animais, entre eles estágio na Clínica Veterinária Itapeva, em Itapeva, durante o mês de julho de 1990; estágio sob orientação do Dr. Pedro Pelissari, em Itararé, durante o mês de agosto de 1991; estágio sob orientação do Dr. Delvan dos Santos, em Maringá, durante os meses de fevereiro e julho de 1992 e estágio no Centro Nacional de Gado de Leite, durante o mês de outubro de 1992.

Em março de 1993, iniciou Curso de Pós-Graduação a nível de mestrado, em Patologia Veterinária, com área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO DE TABELAS	ix
SUMÁRIO DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Criopreservação de ovócitos imaturos e maturados “in vitro”	4
2.1.1. Crioprotetores.....	6
2.1.2. Curvas de congelamento.....	10
2.2. Efeitos da criopreservação sobre os fusos de ovócitos mamíferos	12
2.2.1. Efeito da temperatura.....	13
2.2.2. Efeito dos crioprotetores.....	14
2.3. Efeito da criopreservação sobre as organelas citoplasmáticas	14
2.4. Papel das células do “cumulus” na criopreservação.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Colheita e manipulação dos ovários.....	17
3.2. Aspiração, manipulação e classificação dos ovócitos.....	17
3.3. Congelamento e descongelamento dos ovócitos	18
3.4. Maturação “in vitro” dos ovócitos.....	21
3.5. Avaliação dos ovócitos.....	21
3.6. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Colheita de ovários e aspiração de complexo ovócitos “cumulus” (COC)	22

4.2. COC recuperados (encontrados) após descongelamento.....	23
4.3. Efeito da criopreservação sobre a morfologia de COC.....	23
4.4. Efeito da criopreservação sobre a “zona pelucida”.....	26
4.5. Efeito da criopreservação sobre a maturação “in vitro” de ovócitos ..	29
5. CONCLUSÕES.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
7. ANEXOS.....	55

SUMÁRIO DE TABELAS

	página
TABELA 1. Resultados obtidos no congelamento clássico de ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos com diversos crioprotetores em concentrações diferentes	8
TABELA 2. Número e porcentagem de COC imaturos congelados com 1,6 M e 2,0 M de PROH, recuperados após descongelamento	23
TABELA 3. Efeito da criopreservação sobre a morfologia dos COC congelados em 1,6 M ou 2,0 M de PROH	24
TABELA 4. Efeito da criopreservação de COC sobre as células do “cumulus”	25
TABELA 5. Efeito da criopreservação com 1,6 M ou 2,0 M de PROH sobre a “zona pelúcida”	26
TABELA 6. Efeito da criopreservação sobre a maturação “in vitro” de ovócitos	30

SUMÁRIO DE FIGURAS

	página
FIGURA 1. COC imaturos de bovinos logo após a aspiração, considerados viáveis, contendo no mínimo 3 camadas de células do cúmulus compacta (40 x)	20
FIGURA 2. COC imaturos de bovinos criopreservados com PROH. As setas indicam ovócitos com morfologia anormal (40 x)..	27
FIGURA 3. COC imaturos de bovinos, criopreservados com PROH, apresentando morfologia normal (40 x)	28
FIGURA 4. Configuração cromossômica em metáfase I (bivalentes) de ovócito não congelado de bovino, após 24 h de maturação “in vitro” (1000 X)	33
FIGURA 5. Configuração cromossômica em metáfase I (bivalentes) de ovócito bovino, criopreservado com PROH, após 24 h de maturação “in vitro” (aumento de 1000 x)	34
FIGURA 6. Configuração cromossômica em metáfase II de ovócito não congelado de bovino, após 24 h de maturação “in vitro”. CP: conjunto de cromosomas pertencentes ao corpúsculo polar (1000 x)	35
FIGURA 7. Configuração cromossômica em metáfase II de ovócito bovino criopreservado com PROH, após 24 h de maturação “in vitro” CP: conjunto de cromosomas pertencentes ao corpúsculo polar (1000 x)	36
FIGURA 8. Condensação cromossômica de ovócitos bovinos, criopreservados com PROH, após 24 h de maturação “in vitro” (1000x)	38
FIGURA 9. Início de condensação cromossômica de ovócitos imaturos	

de bovinos, 90 minutos após a aspiração dos ovários (1000x)	39
FIGURA 10. Ovócito de bovino apresentando vesícula germinal (VG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi o Giemsa (400 x)	42
FIGURA 11. Ovócito de bovino apresentando vesícula germinal (VG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi a Orceína á 2 % (400 x)	43
FIGURA 12. Ovócito de bovino apresentando “breakdown” da vesícula germinal (BDVG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi a Orceína á 2 % (1000 x)	44

RESUMO

Estudou-se o comportamento de ovócitos imaturos bovinos submetidos à criopreservação clássica com duas concentrações diferentes do crioprotetor propanediol. Utilizou-se ovócitos imaturos, envoltos em células do “cumulus”, oriundos de bovinos abatidos em matadouro. Os ovócitos foram distribuídos em dois tratamentos e um grupo controle. No tratamento I utilizou-se 1,6 M de propanediol, no qual os ovócitos foram desidratados em três etapas crescentes (0,53 M; 1,06 M e 1,6 M, com 10 minutos cada etapa) à temperatura ambiente, e congelados pelo método clássico. Os ovócitos foram descongelados em água a 37°C por 30 segundos, e reidratados em três etapas decrescentes (1,6 M; 1,06 M e 0,53 M, acrescidos de 0,25 M de sacarose, com 7 minutos cada etapa). No tratamento II utilizou-se 2,0 M de propanediol em três etapas crescentes para desidratação dos ovócitos (0,7 M; 1,4 M e 2,0 M com 10 minutos cada), e reidratação também em três etapas decrescentes (2,0 M; 1,4 M e 0,7 M acrescidos de 0,25 M de sacarose, com 7 minutos cada etapa). O congelamento e descongelamento foram idênticos ao tratamento I. Após a reidratação os ovócitos de ambos os tratamentos foram lavados duas vezes em meio TCM 199, e levados para maturação “in vitro”. O grupo controle foi constituído de ovócitos recém colhidos (não congelados). Todos os ovócitos foram colocados para maturação por 24 h em meio TCM 199 com soro de vaca em estro e FSH em co-cultura com células da granulosa com 5 % CO₂ no ar a 39 °C. Os resultados foram semelhantes ($P>0,05$) para as duas molaridades de propanediol utilizado, quando se avaliou a morfologia, desnudamento, rompimento da “zona pelúcida” e expansão das células do “cumulus”. De 308 ovócitos analisados nos tratamentos I e II, 69,48 % apresentaram morfologia normal, com células do “cumulus” fracamente aderidas e 5,2 % apresentaram desnudamento. O rompimento da “zona pelúcida” não ocorreu após o descongelamento, o que foi observado em 19,15 % dos ovócitos após a maturação “in vitro”, quando do desnudamento. A expansão das células do “cumulus” após maturação foi observada em todos os ovócitos. A taxa de maturação nuclear não foi diferente ($P>0,05$) entre os ovócitos criopreservados. De 98 ovócitos criopreservados com 1,6 M, 2,04 % atingiram metáfase II e de 135 criopreservados com

2,0 M, nenhum atingiu a metafase II. Esses resultados diferem do grupo controle ($P < 0,05$), onde de 131 ovócitos, 84 % atingiram a metáfase II.

Verificou-se que a morfologia dos ovócitos, após descongelamento e expansão das células do “cumulus”, não foi relacionada com a taxa de maturação “in vitro”, e que a presença das células do “cumulus” na criopreservação pode propiciar maior proteção à “zona pelúcida”. O propandiol não foi um bom crioprotetor para ovócitos imaturos de bovinos nas duas concentrações usadas no método de criopreservação clássica.

Palavras-chave: bovinos, criopreservação, ovócitos

6 - ABSTRACT

The aims of this investigation were to study the ability of immature bovine oocytes to survive after cryopreservation, as well as their subsequent “in vitro” maturation, in two different concentration of 1,2 propanediol, following the standard procedure. Immature cumulus-oocytes complexes (COC) were obtained from cows at a slaughterhouse. The COCs were divided in two treatment groups and a control one. In the treatment group I, oocytes were dehydrated with 1.6 M propanediol at room temperature, in three increasing stepwise (0.53 M, 1.06 M and 1.6 M; 10 minutes each), and then frozen following the standard procedure. Oocytes were thawed at 37°C in a water bath for 30 seconds and rehydrated in three decreasing stepwise concentration of 1,2 propanediol (1.6 M, 1.06 M and 0.53 M; 7 minutes each), added of 0.25 M sucrose. In the treatment group II, oocytes were dehydrated with 2.0 M propanediol at room temperature, in three increasing stepwise (0.7 M, 1.4 M and 2.0 M; 10 minutes each), and then frozen and thawed by the same procedure of group 1. Oocytes were rehydrated in three decreasing stepwise concentration (2.0 M, 1.4 M and 0.7 M; 7 minutes each), added of 0.25 M sucrose. After rehydration, oocytes of both treatment groups were washed twice in TCM 199 medium followed by the “in vitro” maturation. The control group consisted of nonfrozen oocytes. Oocytes of all three groups were cultured in TCM 199 medium with 10 % of estrus cow serum (ECS), 20 mcg / ml FSH, 5 % CO₂ air in co-culture of granulosa cells at 39°C, for 24 h. The following characteristics were similar ($P>0.05$) for treatment groups 1 and 2: oocyte morphology, the rupture of zona pelucida, cumulus cells expansion and denuded oocytes. In 308 COC analysed in the two treatment groups, 69.48 % showed normal morphology and 5.2 % oocytes were denuded. However the cumulus cells of intact COC were weakly joined. The rupture of zona pelucida was observed in 19.5 % of the oocytes, but only when they were denuded in the process of mount on slides glass and fixation, after “in vitro” maturation. The cumulus cells expansion after “in vitro” maturation was observed in all COC. The “in vitro” maturation rate of cryopreserved oocytes were similar ($P>0.05$) for treatment groups 1 and 2. Metaphase II was reached by 2.04 % of 98 cryopreserved oocytes with 1.6 M propanediol. None of 135 cryopreserved oocytes with 2.0 M propanediol reached metaphase II. However, the result of

“in vitro” maturation of control group was significantly higher ($P<0.05$) than that of treatment 1 and 2. From 131 nonfrozen oocytes, 84 % reached metaphase II, being significantly different of the both treatment groups ($P<0.05$).

In conclusion, the results indicated that: a) the oocyte morphology after freezing and thawing, and cumulus cells expansion after “In vitro” maturation of immature bovine oocyte cryopreserved, were not related with the “in vitro” maturation rate; b) the presence of cumulus cells during cryopreservation may protect the zona pelucida freezing injuries; c) the two concentrations of 1,2 propanediol utilized did not protect the immature bovine oocyte, by the cryopreservation method used.

Keywords: bovine, cryopreservation, oocyte

1 - INTRODUÇÃO

O melhoramento animal tem como objetivo identificar e selecionar animais geneticamente superiores, visando melhoria da produtividade. Inúmeros métodos são utilizados para seleção de animais superiores, como os da seleção pelo pedigree e o teste de progênie. Estes métodos podem não ser muito confiáveis para características de baixa herdabilidade (seleção pelo pedigree) ou então exigir um intervalo entre gerações maior (teste de progênie).

A avaliação do indivíduo através das informações de desempenho de parentes, como seus ascendentes, colaterais (irmãos) e progênie, indica de maneira mais precisa seu mérito genético. Com a transferência e criopreservação de embriões, pode-se utilizar a avaliação do indivíduo através de seus parentes colaterais (irmãos), diminuindo o intervalo entre gerações. Utilizando-se técnicas de superovulação e transferência de embriões é possível aumentar a intensidade de seleção, pelo aumento da taxa reprodutiva das fêmeas. Para aumentar a eficiência da seleção é necessário ter um número grande de parentes, para melhor avaliação do mérito genético do indivíduo. Visando este aproveitamento tem-se criado núcleos de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET), onde se utiliza essas técnicas para se obter um maior número de irmãos e conseqüentemente um maior número de informações.

Outra técnica de grande utilidade no melhoramento animal é a fecundação “in vitro” (FIV), que permite o aproveitamento de um número muito maior de ovócitos do que a transferência de embriões (TE), pois a presença de um folículo dominante no ovário não afeta a colheita de ovócitos da maneira como afeta a resposta dos folículos ao hormônio FSH. Além disso, permite aspirar ovócitos mais de uma vez em um mesmo ciclo estral, com um melhor aproveitamento das ondas foliculares. Assim, a FIV pode proporcionar um aumento da intensidade de seleção, diminuindo o intervalo entre gerações de maneira mais acentuada do que a TE, por fornecer um número muito maior de irmãos. Outra perspectiva da FIV é sua utilização em conjunto com técnicas de sexagem, clonagem e de engenharia genética. A FIV é uma realidade prática em alguns países, como o Canadá, onde já há comércio de produtos oriundos dessa técnica. Outra vantagem

da FIV sobre a TE, é a produção de embriões de menor custo, devido ao grande número de estruturas com que se trabalha, e por ser menos dependente de resposta da doadora a hormônios.

O aproveitamento de gametas femininos para a produção de animais superiores implica também na necessidade do desenvolvimento de técnicas para conservação desses gametas, para serem utilizados no futuro. Dessa maneira, estudos têm sido desenvolvidos para a criopreservação de ovócitos. Essa técnica permitira a formação de bancos de gametas femininos, preservados indefinidamente para serem utilizados em pesquisa ou em aplicações comerciais, fornecendo ovócitos para o desenvolvimento de técnicas relacionadas a clonagem e a engenharia genética, e de animais superiores geneticamente para o melhoramento. A criopreservação de ovócitos também é importante para a conservação de espécies raras ou em extinção. Sua utilidade será ainda maior quando se puder recuperar ovócitos em folículos pré-antrais, pois o número de ovócitos disponíveis para a fecundação “in vitro” será maior do que a simples aspiração de ovócitos de folículos antrais, visto que uma fêmea bovina de quatorze anos possui aproximadamente 2,500 ovócitos em folículos pré-antrais. Pela criopreservação esses ovócitos em excesso serão conservados para serem utilizados “a posteriori”. A criopreservação terá também aplicação no aproveitamento de ovócitos oriundos de doadoras superovuladas, pois o excesso de ovócitos poderá ser preservado para fecundação “in vitro”, principalmente na falta de receptoras e no uso de doadoras inférteis, com riscos de perda da função ovariana ou que serão abatidas devido a doenças. Desse modo poderá haver um aproveitamento maior de fêmeas a serem descartadas.

A técnica de criopreservação de ovócitos não vem se desenvolvendo no mesmo ritmo ocorrido com os embriões, particularmente no caso dos bovinos. No entanto, recentes avanços e o estabelecimento de técnicas para a maturação, fecundação e cultivo “in vitro” de embriões, tem despertado novos interesses na preservação de ovócitos.

Reconhece-se que a capacidade de desenvolvimento de ovócitos mamíferos é extremamente limitada. Em geral, ovócitos bovinos criopreservados tem pouca capacidade de desenvolvimento quando comparado com embriões em estágios mais tardios, daí o insucesso no congelamento para a subsequente fecundação “in vitro” e para a produção de descendentes normais. Embora alguns embriões tenham sido produzidos e nascimentos ocorridos, oriundos de ovócitos criopreservados de camundongos fecundados “in vitro” e transferência do embrião, a taxa de desenvolvimento é muito baixa pelos métodos de criopreservação utilizados, sendo menores ainda com ovócitos bovinos.

Estudos têm demonstrado efeitos da criopreservação de ovócitos de camundongos sobre os microtubulos dos fusos, ativação parteiogenética, e indução de aneuploidia e poliploidia, enquanto outros demonstram que estes efeitos podem ser reversíveis ou diminuídos. As estruturas dos fusos de ovócitos maturados são as que mais sofrem no congelamento, e por ser a preservação desses fusos de fundamental importância, pode ser aconselhável congelar ovócitos em estágios de vesícula germinal (imatuross). Outro motivo para conservar ovócitos imatuross é o aproveitamento destes a campo, sendo congelados logo apos a aspiração, sem necessidade de um laboratório moderno e equipado, indispensável à maturação, fecundação e cultivo “in vitro” de embriões.

Entre os métodos de criopreservação de ovócitos, o congelamento clássico tem sido a mais utilizado, apesar de apresentar resultados inconsistentes em termos de eficiência e segurança. Como crioprotetor, o propanediol (PROH) tem sido um dos mais utilizados, embora também apresente resultados inconsistentes.

Este trabalho tem o objetivo de estudar a eficiência de duas concentrações (molaridades) diferentes de propanediol na criopreservação, pelo método clássico, de ovócitos imatuross de bovinos envolvidos em células do “cumulus”, verificando sua viabilidade apos descongelamento e subsequente maturação “in vitro”, visando obter maiores conhecimentos sobre esta técnica.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A sobrevivência de embriões e ovócitos a criopreservação é influenciada pelo tipo de crioprotetor utilizado, pela maneira como os ovócitos são expostos aos mesmos e pelo esquema de congelamento/descongelamento utilizado.

Atenção deve ser dada aos efeitos prejudiciais das baixas temperaturas e dos crioprotetores sobre os ovócitos mamíferos, provocando baixa viabilidade destes, pelo surgimento de aneuploidias, poliploidias, polispermia e taxa de fecundação reduzida. Estudos devem ser conduzidos sobre a criopreservação de ovócitos imaturos ou maturados “in vitro” afim de se diminuir prováveis efeitos nocivos sobre estas células.

2.1. CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS IMATUROS E MATURADOS "IN VITRO"

O ovócito maturado está em metáfase II, quando os cromossomos estão ligados às fibras dos fusos. Neste caso, certas condições de resfriamento e exposição das células a crioprotetores podem induzir a uma instabilidade dos fusos meióticos, provocando uma segregação anormal dos cromossomos no reinício da meiose na fecundação, podendo ocasionar anormalidades cromossômicas (PICKERING & JOHNSON, 1987). O ovócito imaturo está em prófase I, onde se inicia a condensação dos cromossomos e os fusos da metáfase I ainda não foram formados. Este fato pode reduzir as anormalidades que possam vir a ocorrer em relação ao fuso quando na criopreservação destes ovócitos imaturos (VAN BLERKOM, 1989).

As alterações na organização dos fusos de ovócitos maturados, resultantes da criopreservação, podem não ser significantes, quando do congelamento de ovócitos imaturos, e nem nas etapas subsequentes de maturação “in vitro”, mas baixa frequência de fecundação “in vitro” pode resultar em mudanças físico-químicas na zona pelúcida relacionadas a o resfriamento, prejudicando a penetração espermática (VAN BLERKOM, 1989).

Entre os trabalhos realizados com ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos, HERRLER et al. (1991) citam que ovócitos imaturos parecem ser mais sensíveis quando expostos a crioprotetores, obtendo melhor taxa de clivagem com ovócitos maturados “in vitro”. YANG et al. (1994) congelaram ovócitos imaturos de bovinos com células do “cumulus” (complexo ovócito-“cumulus”, COC) e concluíram que o desenvolvimento de ovócitos imaturos criopreservados, tanto no congelamento clássico como na vitrificação, é severamente prejudicado devido a danos ultraestruturais, sendo que somente uma proporção pôde completar a maturação, fecundação e clivagem “in vitro”. No entanto, ARAV et al. (1993) obtiveram melhores resultados com a vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos. SCHELLANDER et al. (1994) obtiveram taxas de clivagem semelhantes entre ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos, congelados com crioprotetores diferentes, através do método clássico. Os autores também observaram que os procedimentos de congelamento e descongelamento induziram a uma alta proporção de degeneração do citoplasma (62 % para ovócitos imaturos, observados após a maturação “in vitro”, e 72 % para maturados “in vitro”, observados após a fecundação “in vitro”)

A Tab. 1 mostra resultados de diversos autores sobre criopreservação, pelo método clássico, de ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos, com crioprotetores e concentrações diferentes. Os resultados de fecundação e clivagem “in vitro” são variados, demonstrando uma alteração do comportamento dos ovócitos frente a procedimentos semelhantes de congelamento.

Nos trabalhos com o congelamento clássico (Tab. 1), verifica-se que os resultados com ovócitos bovinos são variáveis, independente do estágio de meiose em que se encontram, mas melhores resultados foram obtidos com ovócitos maturados “in vitro” (FUKU et al., 1992; LIM et al., 1992; OTOI et al., 1993). Ovócitos de camundongos, maturados “in vivo”, produzem melhores resultados do que ovócitos imaturos, provavelmente devido a danos causados a organização dos microtubulos, refletindo na primeira divisão meiótica (SCHROEDER et al., 1990).

Alguns trabalhos analisaram a taxa de maturação “in vitro” de ovócitos bovinos congelados pelo método clássico. LIM et al. (1992) utilizaram ovócitos imaturos de bovinos envoltos em células do “cumulus” (complexo ovócito-“cumulus”, COC), congelados em glicerol, e obtiveram aproximadamente 35 % de maturação “in vitro” após cultivo por 24 h, enquanto de BEM et al. (1993) obtiveram 43,5 % de maturação utilizando ovócitos desnudos, congelados em propanediol (PROH). SCHELLANDER et al. (1994) observaram taxa geral de 38% de COC

imaturos congelados em glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO) e PROH, que permaneceram intactos após descongelamento e maturação “in vitro”, enquanto YANG et al. (1994) observaram taxas de 14,2 % e 8,3 % de maturação quando utilizaram COC com glicerol ou PROH, respectivamente

2.1.1. CRIOPROTETORES

Para o congelamento de ovócitos bovinos têm-se utilizado diversos crioprotetores, como o glicerol, DMSO (dimetil sulfoxido) e propanediol (PROH).

Alguns autores citados na Tab. 1 não mencionam se utilizaram ovócitos envoltos em células do “cumulus” (Complexo ovócito-”cumulus”, COC) (LIM et al., 1991; SUZUKI & MSHIKATA, 1992; SCHMIDT et al., 1995), mas a maioria dos autores o fez, com exceção de BEM et al. (1993) e XU & BETTERIDGE (1992).

A molaridade dos crioprotetores utilizada em inumeros experimentos variam de 1,0 a 1,6 M de glicerol (LIM et al., 1991; OTOI et al., 1993), de 1,0 a 2,0M de PROH (FUKU et al., 1992; SCHELLANDER et al., 1994) e de 1,0 a 1,6 M de DMSO (OTOI et al., 1993; SCHELLANDER et al., 1994).

Entre diversos crioprotetores, os mais utilizados são o glicerol e o propanediol (PROH). Melhores taxas de clivagem “in vitro” de ovócitos imaturos de bovinos congelados foram obtidas por SUZUKI & NISHIKATA (1992) com 1,4 M de glicerol mais 0,2 M de sucrose (16 %) e 1,6 M de PROH mais 0,1M de sucrose (35 %). No entanto outros autores utilizaram apenas o glicerol ou o propanediol e não obtiveram o mesmo sucesso (FUKU et al., 1992; SCHELLANDER et al., 1994). A variação nos resultados de clivagem obtidos com estes crioprotetores vai de 0 (WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992) até 35 % (SUZUKI & NISHIKATA, 1992), quando utilizados em ovócitos bovinos.

Apesar de SUZUKI & NISHIKATA (1992) terem obtidos uma maior porcentagem de clivagem “in vitro” (35 %) com ovócitos imaturos, apenas o congelamento com 1,6 M de PROH produziu embriões (3%), enquanto LIM et al. (1992) obtiveram uma taxa de clivagem menor (12,5%), mas com porcentagem de embriões semelhante (2,1 %), quando utilizaram 1,0 M de glicerol. Outros estudos não obtiveram embriões com 2,0 M de PROH em ovócitos imaturos de bovinos (FUKU et al., 1992). A taxa de clivagem “in vitro” de ovócitos congelados de bovinos, maturados “in vitro”, também possui uma variação ampla, de 3 % (SCHMIDT et al., 1995) a 31,3 % (LIM et al., 1992) quando utilizado o glicerol, e de 7,9 % (XU & BETTEFUDGE, 1992) a 22,4

%(OTOI et al., 1993) quando utilizado o PROH. A obtenção de embriões oriundos de ovócitos maturados “in vitro” e congelados, tem sido pouco superior a de ovócitos imaturos congelados. LIM et al. (1991) obtiveram 8,9 % de embriões, quando utilizaram 1,0 M de glicerol, enquanto FUKU et al. (1992) obtiveram 9,8 % de embriões com 2,0 M de PROH.

A maioria dos trabalhos com ovócitos imaturos de bovinos não cita os resultados da maturação nuclear, mas ao se analisar os trabalhos que avaliaram a taxa de maturação “in vitro”, verifica-se que houve também uma variação da resposta dos ovócitos imaturos congelados, durante o cultivo para maturação “in vitro”. O congelamento de ovócitos imaturos desnudados de bovinos com 0,625 M de glicerol ou com 2,0 M de PROH, através do método clássico, proporcionou taxas de maturação nuclear de 6,1 % para glicerol e 43,5 % para PROH (de BEM et al., 1993), enquanto LIM et al. (1992) obtiveram taxas de 34,8 % de maturação “in vitro”, quando utilizaram 1,0 M de glicerol para o congelamento de ovócitos com as células do “cumulus” (COC). YANG et al. (1994) observaram 14,2% de maturação “in vitro” com 1,0 M de glicerol e 8,3 % com 1,6 M de PROH.

Comparando diversos crioprotetores para o congelamento de ovócitos imaturos de bovinos, SUZUKI & NISHIKATA (1992) citam que o PROH pode ser mais apropriado quando comparado com glicerol, no entanto SCHELLANDER et al. (1994) não observaram diferenças nas taxas de clivagem “in vitro” entre glicerol, PROH e DMSO. OTOI et al. (1993) congelaram ovócitos maturados “in vitro” de bovinos e concluíram que PROH pode ser um crioprotetor mais eficiente para a sobrevivência dos ovócitos, enquanto SCHELLANDER et al. (1994) não encontraram nenhuma diferença entre PROH, glicerol e DMSO para ovócitos maturados (Tab. 1). SHAW & TROUSON (1989) concluíram que o PROH causa maiores perdas de ovócitos de camundongos, como resultado da ativação putenogenética e degeneração, do que a exposição ao DMSO, no entanto, para SCHALKOFF et al. (1989) tanto o DMSO como o PROH são insatisfatórios como crioprotetores de ovócitos.

Estudos de criopreservação também tem avaliado a morfologia dos ovócitos após o descongelamento e reidratação. Congelando ovócitos imaturos de bovinos, pelo método clássico, em 1,0 M de glicerol, LIM et al. (1992) observaram 33,3 % dos ovócitos imaturos congelados apresentando característica morfológica normal, enquanto FUKU et al. (1992) observaram valores semelhantes (30,7 %), quando congelaram ovócitos imaturos em 2,0 M de PROH. YANG et al. (1994) observaram valores de morfologia normal de 78,4 % e 80,9 %, quando congelaram ovócitos imaturos com 1,0 M de glicerol e 1,6 M de PROH mais 0,1 M de sucrose,

TABELA 1. Resultados obtidos no congelamento clássico de ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos com diversos crioprotetores e concentrações diferentes.

crioprotetor	ovócitos imaturos ¹			ovócitos maturados ¹		células do “cumulus” ²	referência
	mat. (%)	fec. (%)	cliv. (%)	fec. (%)	cliv. (%)		
0,625 M glicerol	6,1	-	-	-	-	(-)	de BEM et al., 1993
1,0 M glicerol	-	-	-	-	31,1	-	LIM et al., 1991
1,0 M glicerol	34,8	19,2	12,5	39,1	31,3	(+)	LIM et al., 1992
1,0 M glicerol	14,2	10	-	-	-	(+)	YANG et al., 1994
1,0 M glicerol	-	-	9,8	-	10,6	-	SCHELLANDER et al., 1994
1,4 M glicerol	-	-	0	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992
1,5 M glicerol	-	-	-	0	-	-	WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992
1,5 M glicerol	-	-	11,6	-	14,7	-	SHELLANDER et al., 1994
1,6 M glicerol	-	-	-	50,9	20,6	(+)	OTOI et al., 1993
10 % glicerol	-	-	-	29	3	-	SCHMIDT et al., 1995
1,4 M glicerol + 0,1 M sucrose	-	-	3	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992
1,4 M glicerol + 0,2 M sucrose	-	-	16	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992
1,0 M DMSO	-	-	5,5	-	18	-	SHELLANDER et al., 1994
1,5 M DMSO	-	-	4,6	-	8,8	-	SCHELLANDER et al., 1994
1,6 M DMSO	-	-	-	38,3	18,3	(+)	OTOI et al., 1993
1,0 M PROH	-	-	13,3	-	11,9	-	SCHELLANDER et al., 1994
1,4 M PROH	-	-	18	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992
1,5 M PROH	-	-	-	10,7	-	-	WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992
1,5 M PROH	-	-	-	37,5	7,9	(-)	XU & BETTERIDGE, 1992
1,5 M PROH	-	-	12,1	-	17,3	-	SCHELLANDER et al., 1994
1,6 M PROH	-	-	-	57,9	22,4	(+)	OTOI et al., 1993
1,6 M PROH	8,3	7,1	-	-	-	(+)	YANG et al., 1994
2,0 M PROH	-	9,1	1,5	51	16,2	(+)	FUKU et al., 1992
2,0 M PROH	43,5	-	-	-	-	(-)	de BEM et al., 1993
1,6 M PROH + 0,2 M sucrose	-	-	30	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992
1,6 M PROH + 0,1 M sucrose	-	-	35	-	-	-	SUZUKI & NISHIKATA, 1992

1- Mat.= maturação “in vitro”; fec.= fecundação “in vitro”; cliv.= clivagem “in vitro”

2- Células do “cumulus”: (-) ausência; (+) presença; - sem citação

respectivamente. SCHELLANDER et al. (1994) observaram uma alta proporção de degeneração do citoplasma quando congelaram ovócitos bovinos pelo método clássico com glicerol, PROH ou DMSO, e que apenas 38 % dos ovócitos imaturos congelados permaneceram intactos.

Ovócitos de camundongos também têm sido congelados em diversos crioprotetores, sendo os melhores resultados obtidos com 1,5 M de PROH (HERNANDEZ-LEDEZMA & WRIGHT Jr., 1989). LEE & CHEN (1991) obtiveram resultados semelhantes quando congelaram ovócitos imaturos de camundongos em 1,5 M de PROH ou em etilenoglicol (55,3 % e 59,9 % de viabilidade, respectivamente).

A toxicidade de um crioprotetor é relacionada à temperatura (KASAI et al., 1990), por esta razão a temperatura de manipulação de gametas e estruturas embrionárias deve ser observada e estudada.

Para ovócitos maturados de camundongos, o resfriamento à 4 °C na ausência do crioprotetor, ou a exposição à crioprotetores em temperaturas entre 20 e 37 °C, produz efeitos adversos na zona pelúcida, na organização dos fusos e cromosomas, e na taxa de fecundação "in vitro" (VICENT et al., 1990). Estes autores verificaram um efeito nocivo menor nos ovócitos, quando estes são colocados em crioprotetor previamente resfriado à 4°C, para a desidratação e reidratação, evitando assim a exposição dos ovócitos ao crioprotetor à 37°C. No entanto, a exposição de ovócitos maturados "in vitro" de bovinos à 4°C provoca completo desarranjo dos fusos, e após o reaquecimento a 39°C não há o retorno da morfologia normal dos fusos (AMAM & PARKS, 1994), demonstrando, talvez, uma maior sensibilidade dos ovócitos bovinos à criopreservação, do que ovócitos de camundongos.

Recentes estudos tem revisado o uso na criopreservação de proteínas anticongelantes ou proteínas "hysteresis" térmicas (THPs), que são encontradas no sangue de peixes antárticos. Estas proteínas protegem embriões e ovócitos durante a exposição à temperaturas criogênicas (-196 °C) e hipotérmicas (4°C), interagindo e estabilizando as membranas celulares. Sua função crioprotetora é dependente da concentração e tipo de THP utilizado. Para congelamento clássico, a concentração varia de 0, 1 a 1,0 mg/ml, enquanto para vitrificação é necessário mais do que 40 mg/ml (ARAV et al., 1994).

2.1.2. CURVAS DE CONGELAMENTO

Curva de congelamento refere-se á velocidade em que ocorre o congelamento. Existem diversos métodos de criopreservação com curvas de congelamento diferentes, cuja concentração e tipo de crioprotetor também podem ser diferentes. Os mais estudados com embriões e ovócitos de mamíferos são o método clássico, a vitrificação e o ultra-rápido.

O método clássico consiste de uma curva de congelamento lento, com início entre -6 e -7 °C, logo após a indução da cristalização, até entre -30 e -35°C (NIEMANN, 1991), com velocidade entre 0,3 a 0,6 °C por minuto (RODRIGUES, 1992). Normalmente utiliza-se o glicerol como crioprotetor de embriões bovinos, com aproximadamente 1,4 M ("NIEMA", 1991). Este método promove uma desidratação intracelular, impedindo a formação de cristais de gelo, e prolonga a exposição das células ao crioprotetor durante o congelamento clássico (LEEuw et al., 1991). Inclui cinco eventos de grande importância para a sobrevivência celular: o equilíbrio da célula com o crioprotetor, para esse penetrar e ter início a desidratação; a indução da cristalização do meio extracelular, para dar continuidade a desidratação e impedir a formação de gelo intracelular; a velocidade de congelamento, para haver tempo suficiente de desidratação, sendo esta a parte mais crítica do processo; o descongelamento rápido, para evitar a formação de cristais de gelo; e a remoção do crioprotetor e reidratação celular, que normalmente é realizada em várias etapas (banhos) (LEEuw et al., 1991).

Diversos trabalhos tem induzido a cristalização para congelamento de ovócitos bovinos em temperaturas que variam de -5,5 a -8 °C, e velocidades de congelamento entre 0,3 a 0,7°C/min (LIM et al., 1992; FUKU et al., 1992; OTOI et al., 1993; SCHELLANDER et al., 1994; OTOI et al., 1994). Estes últimos observaram que velocidades de congelamento de 0,3, 0,6 e 0,9°C/min não afetaram o desenvolvimento de ovócitos maturados “in vitro” de bovinos, sendo a taxa de fecundação “in vitro” de 19 %, 11,1 % e 12,5 %, respectivamente. Os resultados do congelamento de ovócitos maturados “in vitro” de bovinos pelo método clássico tem variado de 10,7 % (WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992) a 57,9 % (OTOI et al., 1993). A taxa de clivagem “in vitro” para estes ovócitos, utilizando o PROH, tem ficado entre 16,2 % (FUKU et al., 1992) e 30 % (SUZUKI & NISHIKATA, 1992) e com glicerol tem atingido 31,1 % (LIM et al., 1991). Entretanto a taxa de desenvolvimento embrionário “in vitro”, de zigoto a blastocisto, tem permanecido geralmente abaixo dos 6% (LIM et al., 1992; OTOI et al., 1993).

Os meios usados para congelamento clássico têm utilizado como base o PBS (LIM et al., 1992; OTOI et al., 1992) ou o TCM 199 (FUKU et al., 1992; WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992; OTOI et al., 1993), adicionados de 0,4 % de albumina sérica bovina (BSA) (LIM et al., 1991; LIM et al., 1992; FUKU et al., 1992) ou 5 a 20 % de soro fetal bovino (SFB) (OTOI et al., 1992; XU & BETTERIDGE, 1992; OTOI et al., 1993; de BEM et al., 1993). A desidratação dos ovócitos tem sido realizada em um único banho (etapa) ou em até três banhos (FUKU et al., 1992; SUZUKI & NISHIKATA, 1992; OTOI et al., 1992; OTOI et al., 1993; SCHELLANDER et al., 1994), enquanto a reidratação tem sido realizada em dois a quatro banhos (FUKU et al., 1992; OTOI et al., 1993; de BEM et al., 1993). Normalmente utiliza-se algum tipo de carboidrato para descongelamento de embriões, e no caso de ovócitos não tem sido muito diferente, utilizando-se normalmente a sucrose como carboidrato, com a molaridade variando entre 0,25 M e 0,5 M (FUKU et al., 1992; WATANABE & OLIVEIRA FILHO, 1992; de BEM et al., 1993). SCHELLANDER et al. (1994) não observaram nenhum efeito benéfico do uso de sucrose, lactose ou trehalose, tanto com 0,25 M ou 0,5 M, na reidratação de ovócitos imaturos bovinos, atingindo taxas de clivagem “in vitro” de 6,8 %, 12,6 %, 8,4 % e 8,6 % para os grupos controle, sucrose, lactose e trehalose, respectivamente.

Outro método para criopreservação de embriões e ovócitos mamíferos é o chamado vitrificação. Este método previne a formação de gelo intracelular utilizando o processo de vitrificação, isto é, induz a solidificação do meio por provocar uma extrema elevação na viscosidade do líquido durante o congelamento, sem a formação de cristais de gelo (RALL et al., 1987). Este método pode ser realizado através de uma combinação de resfriamento rápido (10 a 2000°C/min.) e altas concentrações de crioprotetores (6 a 7 M) (LEEUW et al., 1991). Normalmente são utilizados um ou mais crioprotetores em altas concentrações, como o glicerol, propanediol, etilenoglicol, DMSO, acetamida, sucrose (NIEMA, 1991).

Quando compararam o processo de vitrificação com o método clássico, FUKU et al. (1992) atingiram taxas de sobrevivência de ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos de 30,7 % e 53,3 %, respectivamente, quando congelados pelo método clássico com 2,0 M de PROH, contra 14,6 % e 14 % para a vitrificação. Também encontraram taxas de fecundação “in vitro” para ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de 9,1 % e 51 %, respectivamente, para o método clássico, e 7,7 % e 11,6 %, respectivamente, para a vitrificação. YANG et al. (1994) congelaram apenas ovócitos imaturos e encontraram 12,1 % de fecundação “in vitro” para a vitrificação, 10 % para o método clássico com 1,0 M de glicerol e 7,1 % para 1,6 M de PROH.

ARAV et al. (1993) obtiveram taxas de fecundação “in vitro” maiores (70 %), quando utilizaram a vitrificação para ovócitos imaturos de bovinos.

O método ultra-rápido é realizado com a exposição das estruturas a uma mistura de crioprotetores, e o mergulho das palhetas contendo as estruturas diretamente em nitrogênio líquido. Ao contrário da vitrificação, este método envolve a cristalização da água intra e extracelular. Para o sucesso deste protocolo é necessário a presença de um crioprotetor que penetre na célula, normalmente o glicerol, e outro que não penetre, como a sucrose (NIEMANN, 1991). Estas estruturas devem sofrer uma desidratação prévia, antes do congelamento, que pode ser obtida com a exposição das estruturas a altas concentrações do crioprotetor por um curto período, ou a exposição a concentrações mais baixas por um tempo maior. O descongelamento deve ser rápido, enquanto a reidratação realizada de maneira gradual (RODRIGUES, 1992). Alguns autores têm realizado uma desidratação parcial com a exposição de ovócitos mamíferos a uma solução com 0,25 ou 0,5 M de sucrose, seguida da exposição a uma solução contendo o crioprotetor que penetre na célula, juntamente com 0,5 M de sucrose (AIGNER et al., 1992; VAN DER ELST et al., 1993). Normalmente a concentração do crioprotetor varia de 2,0 a 3,5 M (NIEMANN, 1991).

Ovócitos de camundongos têm sido criopreservados, com relativo sucesso, através do método ultra-rápido. VAN DER ELST et al. (1993) encontraram alta porcentagem de ovócitos de camundongos morfológicamente normais (78 %), atingindo 59 % de zigotos que desenvolveram até estágio de duas células.

Comparando o método ultra-rápido com o clássico para ovócitos de camundongos, AIGNER et al. (1992) obtiveram taxa de sobrevivência de 69 % para ovócitos maturados “in vivo” de camundongos, congelados pelo método clássico com 1,5 M de DMSO, contra 94 % pelo método ultra-rápido. NOWSHARI et al. (1993) atingiram taxas de fecundação “in vitro” e de desenvolvimento de 74% e 65%, respectivamente, para o congelamento ultra-rápido com ovócitos maturados “in vivo” de camundongos.

2.2. EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE OS FUSOS DE OVÓCITOS MAMÍFEROS

2.2.1. EFEITO DA TEMPERATURA

Ovócitos maturados "in vivo" de camundongos expostos a temperaturas de 25, 4 e 0 °C, passam por uma ruptura ou desarranjo progressivo dos microtúbulos dos fusos (AIGNER et al., 1992) e provável dispersão dos cromosomais (PICKERING & JOHNSON, 1987). Os fusos de ovócitos bovinos também parecem ser sensíveis ao resfriamento a 25 e 4°C (PARKS & RUFFING, 1992).

Analisando o efeito do resfriamento sobre ovócitos maturados "in vivo" de camundongos, SATHANANTHAN et al. (1992) verificaram que os microtúbulos dos fusos despolimerizam a 0 °C ou a -7°C, mas repolimerizam ao reaquecimento a 37°C por duas horas, restaurando a estrutura normal dos fusos na maioria dos ovócitos. Estes autores encontraram que os cromosomas tendem a rotacionar em baixas temperaturas, mas que o deslocamento dos cromosomas fora da zona dos fusos foi raramente observado e conseqüentemente a dispersão dos cromosomas não foi observada na maioria dos ovócitos. Outros autores concordam que há recuperação dos fusos após uma hora á 37°C (RALL, 1992), mostrando configuração normal (AIGNER et al., 1992).

Segundo KOLA et al. (1988), pode aumentar em três vezes a incidência de zigotos com aneuploidia, tanto com o congelamento clássico como com a vitrificação. De acordo com estes autores, mesmo com a repolimerização dos fusos ao reaquecimento, pode haver um posicionamento anormal dos cromosomas, induzindo á uma segregação anormal. Desse modo, a união desta célula com um gameta normal resultaria em embriões com aneuploidia. No entanto, BOS-MICKICH & WHITTIGHAN (1991) e VAN DER ELST et al. (1993) não observaram aumento da aneuploidia em ovócitos de camundongos congelados, sendo que estes últimos verificaram apenas um aumento da poliploidia, e que a morfologia dos fusos meióticos tiveram pouco ou nenhum valor para influenciar as condições de poliploidia ou mesmo para aneuploidia. CARROLL et al. (1989) verificaram que a poliploidia talvez seja provocada pelo aumento da retenção do segundo corpúsculo polar.

O fato de surgir alta porcentagem de ovócitos com fusos intactos após uma ou três horas do descongelamento, sugere que o efeito do congelamento e descongelamento sobre a morfologia dos fusos e arranjo dos cromosomas é limitado, e pode não ser suficiente para explicar a redução da sobrevivência do ovócito e da fecundação (AIGNER et al., 1992). Portanto, devem ser

considerados os danos provocados pelo congelamento às outras estruturas citoplasmáticas. Os resultados destes autores não suportam a idéia de que a maioria dos ovócitos de camundongos deverá mostrar anormalidades acentuadas nos fusos depois da criopreservação, provocando desequilíbrio cromossomal, pelo contrário, alta porcentagem dos fusos foi observada mostrando morfologia normal após congelamento clássico e ultra-rápido.

2.2.2. EFEITO DOS CRIOPROTETORES

Os crioprotetores podem causar danos as células devido ao efeito osmótico ou toxicidade química, particularmente no citoesqueleto da célula (PARKS & RUFFING, 1992). VICENT et al. (1989) verificaram que a exposição de ovócitos de coelhos ao DMSO ou PROH induzem ao surgimento de microtúbulos no citoplasma e um desarranjo dos fusos, freqüentemente associadas com anomalias na posição do cromossoma. Esta anomalia foi a desorganização dos cromossomas na placa equatorial, mas quando comparado com o controle não houve deslocamento extensivo. Após a remoção do PROH, os fusos alterados foram reformados e os microtúbulos formados no citoplasma desapareceram progressivamente, o mesmo não foi observado com o DMSO.

Em ovócitos de hamster foi observado um efeito de despolimerização nos fusos, provocado pelo PROH, mas após a remoção do crioprotetor estes efeitos foram reversíveis. Esta reversão não foi observada com DMSO (TOBBACK et al., 1991). Desta maneira, o PROH pode ser superior como crioprotetor, durante as mudanças osmóticas e de volume que ocorrem durante o congelamento.

2.3. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE AS ORGANELAS CITOPLASMÁTICAS

Observando os efeitos da criopreservação sobre ovócitos maturados “in vivo” de camundongos, SATHANANTHAN et al. (1992) verificaram que algumas organelas citoplasmáticas, como retículo endoplasmático liso (REL), inclusões fibrilares e áreas ocupadas por glóbulos de lipídeos, são mais vulneráveis ao resfriamento do que as mitocôndrias, corpúsculos multivesiculares, microfilamenitos e grânulos corticais (GC). A maioria destas mudanças ocorridas durante o resfriamento foram reversíveis ao reaquecimento por duas horas, mas que a restauração não ocorreu completamente, desde que o REL e glóbulos de lipídeos

permaneceram desorganizados. Segundo este autor, parece que as membranas de certas organelas citoplasmáticas, como a retículo endoplasmático, Complexo de Golgi e o envelope nuclear, são particularmente susceptíveis ao resfriamento.

Analisando ovócitos imaturos bovinos após congelamento clássico e vitrificação, YANG et al. (1994) observaram diminuição ou desaparecimento das microvilosidades, ruptura da zona pelúcida e da membrana plasmática, desaparecimento da crista mitocondrial, diminuição da densidade da matriz mitocondrial, expansão da cisterna do retículo endoplasmático, destruição do Complexo de Golgi e microtúbulos e desconexão entre células do “cumulus” e do ovócito.

2.4. PAPEL DAS CÉLULAS DO "CUMULUS" NA CRIOPRESERVAÇÃO

Durante a maturação, o LH aumenta a taxa de maturação e o desenvolvimento embrionário após a fecundação. O LH pode atuar na maturação modificando o ambiente nutricional, aumentando a energia disponível para o ovócito suportar a fecundação e o desenvolvimento embrionário. As células do “cumulus” possuem um papel importante na maturação, pois pode intermediar a ação do LH na atividade metabólica do ovócito (BRACKETT & ZUELKE, 1993).

São duas as hipóteses para o início da maturação em resposta ao LH, a primeira é de que o LH poderia interromper a comunicação entre as células do “cumulus” e o ovócito, impedindo a passagem de algum fator inibitório do início da maturação para os ovócitos e vice-versa, e a segunda é de que esta gonadotrofina poderia induzir a secreção de um fator positivo produzido em células somáticas, como as células da granulosa e do “cumulus”, e que atingiriam o ovócito através das células do “cumulus” (DOWNS, 1993).

CHIAN et al. (1994) não observaram diferença na taxa de maturação “in vitro” e de penetração espermática entre ovócitos cultivados com ou sem células do “cumulus”, mas as células do “cumulus” afetaram significativamente a formação do pronúcleo masculino e no desenvolvimento subsequente do zigoto, evidenciando que a presença das células do “cumulus” durante a maturação é essencial para o desenvolvimento normal do ovócito após a fecundação. Esses trabalhos mostram que as células do “cumulus” possuem uma importância significativa na produção de embriões “in vitro” e desta maneira deve-se considerar a presença ou ausência destas células no congelamento de ovócitos imaturos.

A remoção das células do “cumulus” antes da exposição de ovócitos de camundongos ao PROH ou ao etilenoglicol, foi associado com a redução da ativação partenogenética, sugerindo que a susceptibilidade dos ovócitos à ativação partenogenética pode ser modificada pelas células do “cumulus” e da “corona radiata” (SHAW & TROUSON, 1989).

Os danos causados as células do “cumulus”, durante o congelamento de ovócitos imaturos de camundongos, pode torná-los deficientes para suportar a maturação “in vitro” pós-descongelamento. Muitas células do “cumulus” apresentam-se picnóticas depois do congelamento e descongelamento, e os ovócitos estão freqüentemente desnudados como resultado da manipulação para maturação e fecundação “in vitro”. No entanto ovócitos imaturos desnudos de camundongos resultam em menor sobrevivência quando comparado com ovócitos envoltos em células do “cumulus” (SCHROEDER et al., 1990).

Congelando ovócitos maturados “in vivo” de camundongos com células do “cumulus” intacta, SATHANANTHAN et al. (1992) concluíram que estas células podem ter uma influência protetora sobre a zona cortical dos ovócitos, prevenindo a exocitose de grânulos corticais. Quando se adiciona SFB ao meio de congelamento de ovócitos de camundongos com células do “cumulus” intacta, é necessário maior tempo de lavagem pós-descongelamento, para a remoção do soro, do que para ovócitos desnudados, mas após o tempo de lavagem adequado são encontrados boas taxas de fecundação “in vitro” (GEORGE et al., 1992).

Congelando ovócitos imaturos desnudos de bovinos, de BEM et al. (1993) observaram taxa de maturação “in vitro” de 43,5 % com PROH e 6,1% com glicerol, no entanto YANG et al. (1994) utilizando complexo ovócitos-“cumulus” (COC) no congelamento, observaram taxa de maturação “in vitro” de 8,3 % com PROH e 14,2 % com glicerol. FUKU et al. (1992) não encontraram diferenças quando congelaram ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos com células do “cumulus” densa e compacta, classificada como classe A, e com células do “cumulus” compacta, mas esparsa ou então parcialmente desnudados, classificada como classe B. Os ovócitos imaturos de classe A obtiveram 29 % de morfologia normal após descongelamento, e os ovócitos de classe B obtiveram 32,2 %. Também não houve diferença na taxa de fecundação “in vitro”.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLHEITA E MANIPULAÇÃO DOS OVÁRIOS

Foram colhidos 995 ovócitos, aspirados de 218 ovários de fêmeas bovinas mestiças, com idade entre 2 e 12 anos, colhidos em matadouro distante 35 km do laboratório. Os ovários foram transportados acondicionados em frascos com solução fisiológica (0,9 % NaCl) contendo antibióticos (0,1 g/l de sulfato de estreptomicina), a temperatura entre 30 e 34°C, dentro de 3 h após a coleta. O processamento dos ovócitos ocorreu dentro de 4 h após a colheita dos ovários. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 1995, no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

3.2. ASPIRAÇÃO MANIPULAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS OVÓCITOS

Os folículos de tamanho acima de 1,5 milímetros foram puncionados com uma seringa de 3 ml e agulha 25 x 7. O conteúdo foi depositado em um calice cônico contendo meio Talp HEPES (BAVISTER et al., 1983), previamente aquecido a 37°C. Após um período de decantação de 10 min., o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com meio Talp HEPES e depositado em uma placa de Petri mantida em placa aquecedora a 38°C onde ocorreu a manipulação dos ovócitos. Os ovócitos foram encontrados com auxílio de um microscópio estereoscópio (Wild, modelo M 8), lavados por duas vezes em meio Talp HEPES e em seguida avaliados morfológicamente. Os ovócitos contendo células do “cumulus oophorus” compacto, com no mínimo 3 camadas (complexo ovócito-”cumulus”, COC) e citoplasma homogêneo foram classificados como viáveis (HAWK & WALL, 1994) e foram selecionados para o experimento (Fig. 1).

3.3. CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DOS OVÓCITOS

Neste experimento foram utilizados 541 ovócitos viáveis, divididos em dois tratamentos e um grupo controle. Todos os ovócitos foram congelados com suas respectivas células do "cumulus" (complexo ovócito-"cumulus", COC).

O meio utilizado para congelar e descongelar foi o TCM 199 (ANEXO 1), acrescido de 0,4 % de albumina sérica bovina (BSA fração V, MERK, ref. 12018). Os tratamentos utilizados para este experimento foram os seguintes:

Tratamento I

Foram utilizados 190 COC, congelados em 1,6 M de 1,2 propanediol (SIGMA, ref. P-1009) pelo método clássico. Logo após a lavagem dos COC em Talp Hepes, estes foram desidratados em três banhos (etapas), com quantias crescentes do crioprotetor, em dez minutos cada etapa, à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), de acordo como segue:

1º etapa: 0,53 M de 1,2 propanediol

2º etapa: 1,06 M de 1,2 propanediol

3º etapa: 1,6 M de 1,2 propanediol

Antes de completar a 3º etapa os COC foram envasados em palhetas de 0,25 ml. Ao término desta etapa foram levados a maquina de congelamento (BIO-COOL™, FTS Systems Inc., modelo BC-70-4A), previamente resfriada a -7 °C, onde permaneceram por 10 minutos para a estabilização, realizando-se logo em seguida o "seeding", seguido de mais 5 minutos para nova estabilização. Após este periodo a temperatura desceu de -7 a -32°C a uma velocidade de 0,5 °C/minuto. Atingindo -32°C as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Estas palhetas foram conservadas em nitrogênio líquido por no minimo uma semana.

O descongelamento foi feito em água a 37°C por 30 segundos, e a reidratação em temperatura ambiente, em 3 banhos (etapas) com quantias decrescentes do crioprotetor, adicionados de 0,25 M de sacarose (MERK, ref. 7651), com 7 minutos de duração para cada etapa, de acordo como segue:

1º etapa: 1,6 M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

2º etapa: 1,06M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

3º etapa: 0,53 M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

Tratamento II

Foram utilizados 220 COC congelados em 2,0 M de propanediol, pelo método clássico. A desidratação foi realizada da mesma maneira do tratamento I, contendo apenas concentrações diferentes do crioprotetor, que foram as seguintes:

1º etapa: 0,7 M de 1,2 propanediol

2º etapa: 1,4 M de 1,2 propanediol

3º etapa: 2,0 M de 1,2 propanediol

A curva de congelamento foi a mesma do tratamento I, assim como o descongelamento e reidratação, com as seguintes concentrações do crioprotetor:

1º etapa: 2,0 M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

2º etapa: 1,4 M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

3º etapa: 0,7 M de 1,2 propanediol + 0,25 M de sacarose

Logo após a reidratação, os COC, de ambos os tratamentos, foram lavados duas vezes em meio TCM 199 (COSTA et al., 1994). Após as lavagens, os COC foram colocados para maturar "in vitro".

Controle

Constituído de 131 COC não congelados (frescos), que foram levados para a maturação "in vitro" logo após serem selecionados e lavados em TCM 199 .

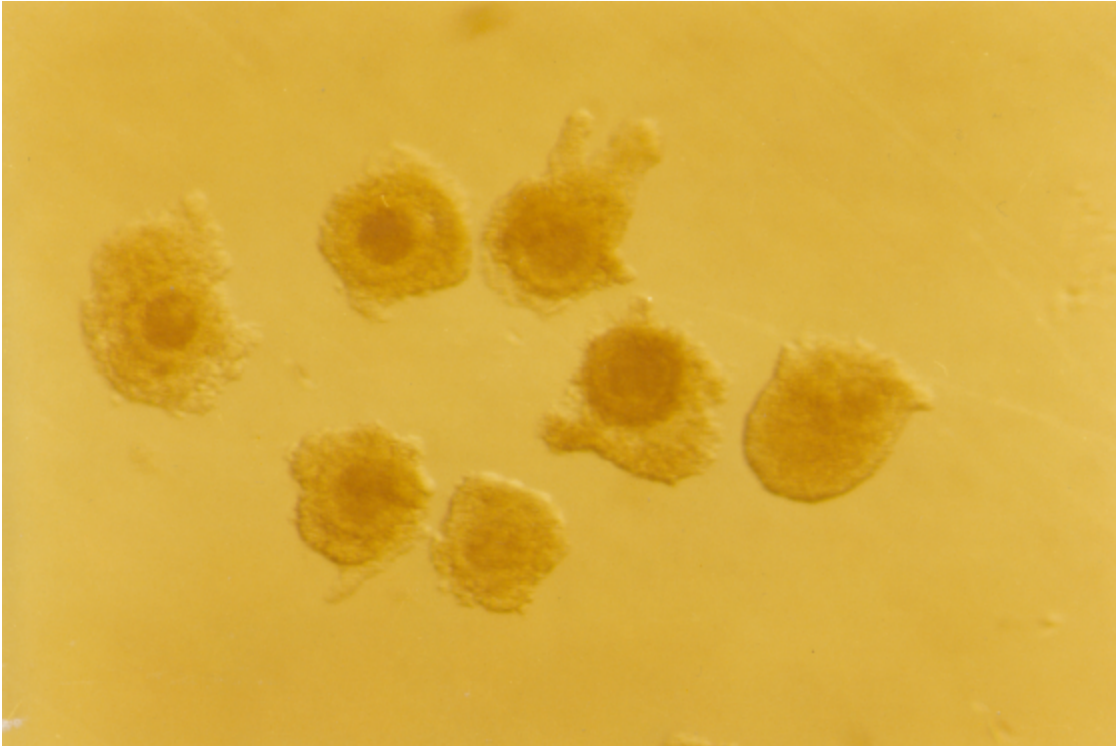


Figura 1 – COC imaturos bovinos logo após a aspiração, considerados viáveis, contendo no mínimo 3 camadas de células do cúmulus compacta (40 x).

3.4. MATURAÇÃO “IN VITRO” DOS OVÓCITOS

Os cultivos “in vitro” para todos os ovócitos foram realizados em placas de Petri de 35 milímetros de diâmetro, contendo 3 ml de TCM 199, previamente equilibrado durante uma hora a 39°C, e com 1,5 a 2 milhões de células da granulosa/ml em suspensão, conforme COSTA et al. (1994). Os cultivos foram realizados em estufa incubadora (NAPCO, modelo 6100) a 39°C, em atmosfera de 5 % de CO₂, 95 % de ar atmosférico e 95 % de umidade por 24 horas.

3.5. AVALIAÇÃO DOS OVÓCITOS

A avaliação da morfologia dos ovócitos foi realizada baseando-se nas condições das células do “cumulus” e a aparência do citoplasma. Os COC foram classificados em normais (com células do “cumulus” aderidas, compactas e homogêneas e ovócitos com citoplasma homogêneo e sem fragmentação) ou degenerados, e ovócitos com rompimento da zona pelúcida. Logo após a avaliação, todos os COC congelados foram levados para maturação “in vitro”. Após a maturação, os ovócitos foram desnudados, hipotônizados, fixados em lâminas e corados com Orceína a 2 % (COSTA, 1994). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (DIALUX, modelo 22 EB) com aumento de 1000 x, para verificação de maturação nuclear.

Para verificar se houve efeito do tempo entre a aspiração e o início do congelamento sobre o reinício da meiose, 60 ovócitos permaneceram por 90 minutos em meio Talp Hepes aquecido a 37°C. Estes ovócitos foram corados por três métodos diferentes: 20 foram corados pelo mesmo método utilizado com os ovócitos congelados e maturados “in vitro”, segundo COSTA (1994); 22 foram corados com Giemsa e 18 foram corados com 2 % de Orceína. O procedimento utilizado nos dois últimos métodos está listado no ANEXO 2.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de χ^2 (GOMES, 1977).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLHEITA DE OVÁRIOS E ASPIRAÇÃO DE COMPLEXOS OVÓCITO- "CUMULUS" (COC)

Os 218 ovários utilizados no experimento produziram 745 COC considerados viáveis, resultando em 3,48 COC viáveis por ovário, e 250 ovócitos parcial ou totalmente desnudos ou com células do "cumulus" expandidos, considerados inviáveis. Dos 745 COC, foram utilizados 541 (72,6 %) para o experimento e o restante para a rotina do laboratório.

A média de ovócitos viáveis por ovário obtida por este experimento (3,48) foi menor que os 6,2 ovócitos aptos a maturação "in vitro", obtidos por VERGOS et al. (1990), citados por GORDON (1990), mas semelhantes aos 3,62 ovócitos apresentando "cumulus" compacto ou com até 3 camadas, obtidos por COSTA (1994). A variação da população de ovócitos obtido por ovário é dependente da técnica utilizada, assim, GORDON (1990) comenta que a dissecação de folículos como método de obtenção dos ovócitos é superior ao método de aspiração, e ainda reduz os danos aos ovócitos. No entanto este método é mais laborioso e lento do que a aspiração. Atualmente utiliza-se apenas a aspiração dos folículos para a obtenção dos ovócitos.

Outro fator que pode alterar a quantidade de ovócitos obtidos é o estado de atividade ovariana. Animais com baixa condição corporal ou com acentuada restrição alimentar, podem ter uma atividade ovariana menor. SHORT & ADAMS (1988) comentam que o desenvolvimento folicular e a ovulação, podem ser alterados pela restrição de dieta energética e pela diminuição da condição corporal. FERREIRA (1993) também relata que a restrição alimentar por um tempo longo resulta em bloqueio da atividade ovariana luteínica cíclica. MURPHY et al. (1991) reportaram que a dieta afeta a dinâmica folicular em novilhas. Desse modo, animais com condição corporal baixa podem ter uma população de folículos terciários menor do que animais em boa condição corporal, e assim fornecer menor número de ovócitos para a maturação "in vitro".

4.2. COMPLEXOS OVÓCITO-"CUMULUS" (COC) RECUPERADOS APÓS DESCONGELAMENTO

Os números e porcentagens de COC recuperados após o descongelamento estão na Tab. 2. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o grupo congelado em 1,6 M ou em 2,0 M de PROH.

TABELA 2. Número e porcentagem de COC imaturos congelados com 1,6 M e 2,0 M de PROH, recuperados após descongelamento.

Tratamento	Total congelado n	COC encontrados n (%)
1,6 M PROH	190	150 (78,94 %)
2,0 M PROH	220	194 (88,18 %)
Total	410	344 (83,9 %)

As diferenças observadas não foram significativas estatisticamente ($P > 0,05$).

O total de COC recuperados após o descongelamento foi de 83,9 %. Esta taxa foi semelhante aos 86,25 % encontrado por FUKU et al. (1992) que utilizaram o congelamento clássico com 2,0 M de propanediol para COC imaturos de bovinos. Estes valores foram inferiores aos 94,1 % de ovócitos imaturos desnudos de bovinos, recuperados por de BEM et al. (1993). SCHELLANDER et al. (1994) obtiveram taxas entre 90 e 95 % de COC imaturos de bovinos recuperados após o descongelamento.

A perda de ovócitos pode ter ocorrido devido à destruição total das estruturas durante o congelamento e descongelamento, não restando vestígios, ou pelas perdas ocorridas durante a manipulação dos ovócitos no descongelamento e nas fases de reidratação.

4.3. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MORFOLOGIA DO COMPLEXO OVÓCITO-"CUMULUS" (COC).

Os resultados do congelamento e descongelamento sobre a morfologia dos COC estão na Tab. 3. A porcentagem de ovócitos com morfologia normal foi semelhante entre os dois

tratamentos ($P > 0,05$). Os ovócitos considerados com morfologia anormal apresentaram o citoplasma menos denso e com textura irregular, com presença de halos claros (vacúolos) e alguns ainda apresentavam o espaço perivitelino aumentado (Fig. 2).

Não observou-se diferença entre as congelações realizadas com 1,6 M ou com 2,0 M de propanediol na morfologia dos COC, produzindo um total de 69,48 % de COC com aparência morfológica normal. Essa taxa é superior aos 33,3 % de COC imaturos normais de bovinos encontrados por LIM et al. (1992) e aos 30,7 % de COC verificados por FUKU et al. (1992). CHEN et al. (1994), obtiveram 55,1 % de ovócitos maturados “in vitro” de camundongos quando utilizaram 1,5 M de propanediol.

TABELA 3. Efeito da criopreservação sobre a morfologia dos COC congelados em 1,6 M ou 2,0 M de PROH.

Tratamento	n	Número de COC com morfologia normal (%)
1,6 M PROH	136	97 (71,32)
2,0 M PROH	72	117 (68,02)
Total	308	214 (69,48)

As diferenças observadas não foram significativas estatisticamente ($P > 0,05$).

Entretanto os resultados são inferiores aos 78,1 % obtidos por de BEM et al. (1993), e aos 80,9 % observados por YANG et al. (1994), ambos utilizando PROH. SCHELLANDER et al. (1994) observaram 95 % de aparência morfológica normal em COC imaturos congelados pelo método clássico com glicerol, propanediol e DMSO, mas após a maturação “in vitro” apenas 38 % permaneceram intactos.

A maioria dos ovócitos apresentou as células do “cumulus” aderidas após o descongelamento (Tab. 4 e Fig. 3), com um total de 5,2 % de ovócitos total ou parcialmente desnudos. Não houve diferença estatística entre os dois métodos de congelamento ($P > 0,05$). Após a maturação “in vitro” todos os ovócitos apresentaram expansão das células do “cumulus”.

Apesar das células do “cumulus” continuarem presentes nos ovócitos após o descongelamento, e de ter ocorrida a expansão após a maturação “in vitro”, estas células foram facilmente destacadas durante o processo de desnudamento para se realizar a fixação e coloração

dos ovócitos após a maturação. A duração do processo de desnudamento levou menos de três minutos para os ovócitos congelados em ambos os tratamentos, enquanto que para os ovócitos não congelados, após a maturação “in vitro”, este tempo foi de cinco minutos.

TABELA 4. Efeito da criopreservação de COC sobre as células do “cumulus”.

Tratamento	n	Número de ovócitos apresentando células do “cumulus” (%)
1,6 M PROH	136	125 (91,91)
2,0 M PROH	172	167 (97,09)
Total	308	292 (94,8)

As diferenças observadas não foram significativas estatisticamente ($P>0,05$).

A expansão das células do “cumulus” tem sido utilizada como critério de avaliação da maturação “in vitro” para ovócitos não congelados (LIU et al., 1991; BALL et al., 1983). Segundo SIRARD et al. (1992) a expansão das células do “cumulus” nos experimentos com co-cultura de células, é um bom indicador do status da maturação “in vitro” dos COC. As células do “cumulus” podem intermediar ou produzir diversos fatores que interferem na maturação e subsequente desenvolvimento do zigoto, podendo afetar o metabolismo do ovócito (BRACKET & ZUELKE, 1993; DOWNS, 1993; THIBAUT et al., 1987).

Neste ponto é interessante manter a integridade das células do “cumulus” e a sua comunicação com o ovócito, para propiciar um acúmulo de energia suficiente para permitir a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial “in vitro”, já que o ovócito necessita produzir todos os metabólitos necessários para que o zigoto recém formado desenvolva até que o genoma embrionário torne-se ativo (SIRARD et al., 1992). Dessa maneira, a presença das células do “cumulus” aderidos aos ovócitos após o descongelamento pode favorecer a maturação, posterior fecundação e desenvolvimento embrionário “in vitro”.

Neste experimento 94,8 % dos ovócitos apresentaram as células do “cumulus” após descongelamento, para ambos os tratamentos, e 100 % das células se expandiram após a maturação “in vitro”, indicando que mantiveram sua viabilidade após a criopreservação. Esses resultados concordam com os de DIDION et al. (1990) que observaram que as células do “cumulus” de ovócitos imaturos de suínos sobrevivem o congelamento, enquanto YANG et al.

(1994) encontraram 60 % de expansão das células do “cumulus” após o descongelamento, quando utilizaram COC de bovinos. No entanto as células do “cumulus” estavam fracamente aderidas aos ovócitos, o que foi observado durante a manipulação e no processo de desnudamento, ao serem facilmente destacadas. Isto pode implicar em insuficiente comunicação entre as células do “cumulus” e ovócito, interrompendo o transporte de metabólitos entre essas duas células, alterando a atividade metabólica do ovócito. Provavelmente este fato pode prejudicar a maturação, fecundação “in vitro” e o futuro desenvolvimento da célula após a fecundação. SCHROEDER et al. (1990) postulam que lesões nas células do “cumulus” durante o congelamento podem tornar os ovócitos deficientes para suportar a maturação “in vitro” e diminuir a sobrevivência pós-descongelamento.

4.4. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A ZONA PELÚCIDA

Não foi observado rompimento da zona pelúcida após descongelamento e reidratação. Porém, durante o processo de desnudamento, para fixação e coloração dos ovócitos após maturação “in vitro”, houve o rompimento da zona pelúcida para ambos os tratamentos (Tab. 5). Nos ovócitos do grupo controle não ocorreu rompimento da zona pelúcida, indicando assim, que houve alteração nas propriedades físicas da zona pelúcida de ovócitos congelados, tornando-as menos resistentes. Entretanto não houve diferença entre os tratamentos.

TABELA 5. Efeito da criopreservação com 1,6 M ou 2,0 M de PROH sobre a zona pelúcida.

Tratamento	n	Número de ovócitos com zona pelúcida rompida (%)
1,6 M PROH	136	27 (19,85)
2,0 M PROH	172	32 (18,60)
Total	308	59 (19,15)

As diferenças observadas não foram significativas estatisticamente ($P > 0,05$).

Este fato mostra que houve um enfraquecimento da mesma ou alteração de seus constituintes durante o congelamento e descongelamento, mas que não foi suficiente para rompê-la durante essas fases. Estas lesões são confirmadas por YANG et al. (1994) e SCHMIDT et al.

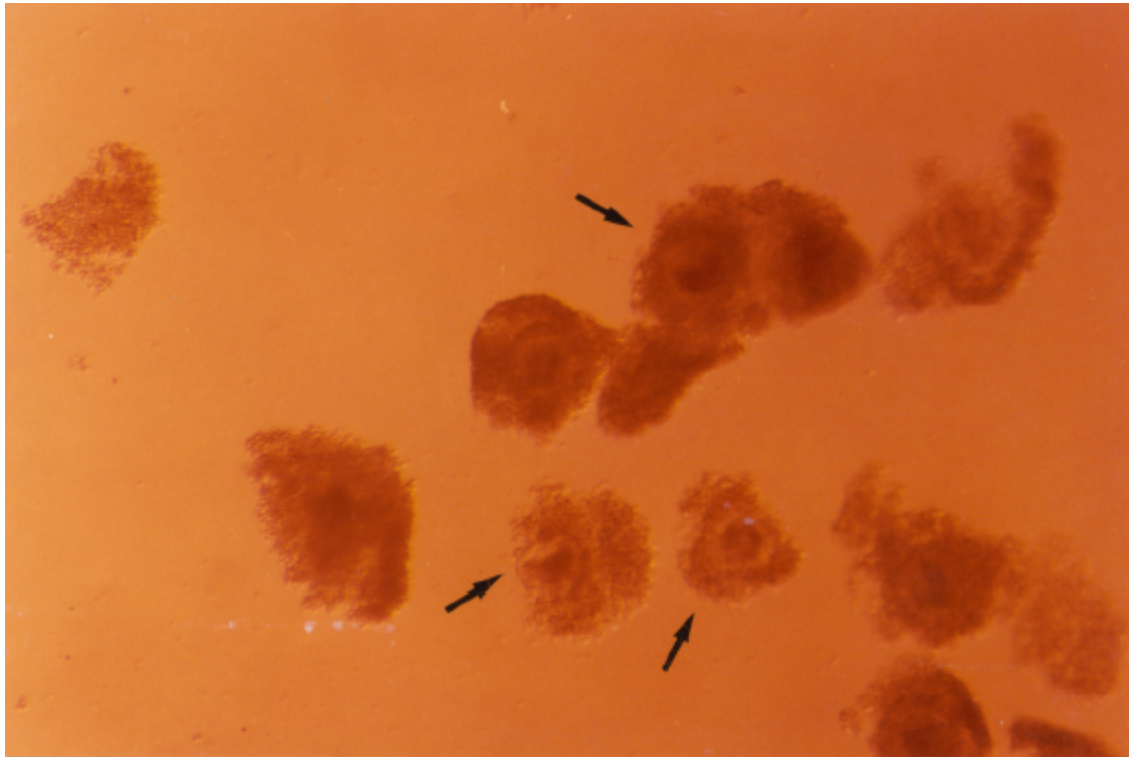


Figura 2 – COC imaturos bovinos, criopreservados com PROH. As setas indicam ovócitos com morfologia anormal. (40 x).

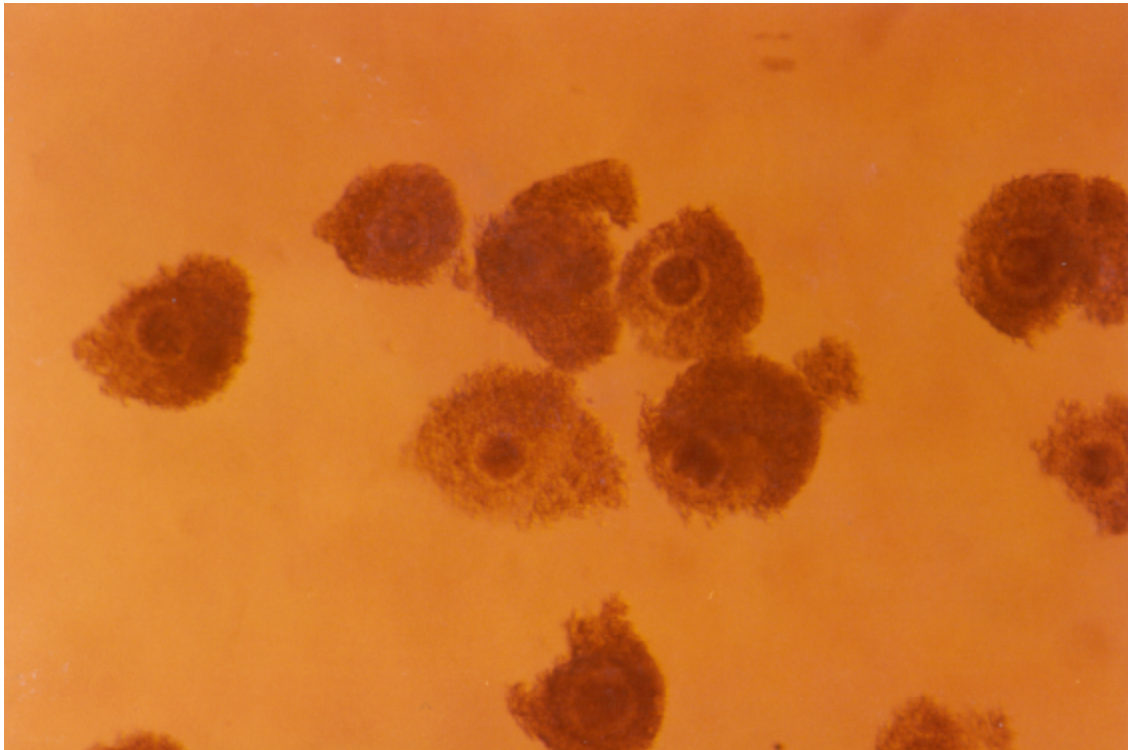


Figura 3 – COC imaturos bovinos, criopreservados com PROH, apresentando morfologia normal (40 x).

(1995) em ovócitos criopreservados, através de microscopia eletrônica. SATHANANTHAN et al. (1992) também observaram rompimento de zona pelúcida em ovócitos de camundongos. A taxa total de zona pelúcida rompida deste experimento (19,15 %), encontrado após o desnudamento, foi inferior aos 27,8 % obtidos por de BEM et al. (1993), onde este rompimento ocorreu no descongelamento de ovócitos imaturos desnudos de bovinos. Talvez a presença das células do “cumulus” possa ter um papel de proteção para a zona pelúcida durante o congelamento e descongelamento. TODOROW et al. (1989) observaram 26 % e 20 % de “zonas pelúcidas” danificadas após a criopreservação de ovócitos de camundongos e de hamster, respectivamente.

4.5. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A MATURAÇÃO “IN VITRO” DE OVÓCITOS

O número e porcentagem de ovócitos que atingiram metáfase I e metáfase II para ambos os tratamentos estão na Tab. 6. Observa-se um efeito adverso da criopreservação sobre os ovócitos dos grupos tratados, evitando que atinjam as fases de metáfase I e II. Não houve diferença ($P>0,05$) entre o congelamento com 1,6 e 2,0 M de PROH, mas houve entre as congelações e o grupo controle (ovócitos frescos) ($P<0,05$).

Na Fig. 4 e 5 observamos ovócitos frescos e criopreservados em metáfase I, e na Fig. 6 e 7 ovócitos frescos e criopreservados em metáfase II, respectivamente.

Dos 131 ovócitos do grupo controle, 11 pararam a maturação “in vitro” em metáfase I, 110 continuaram até metáfase II e 10 não apresentaram figuras cromosômicas. A taxa de maturação “in vitro” do grupo controle (84 %), encontrada neste experimento, foi superior aos 78 % encontrados por OCAÑA QUERO et al. (1994) e aos 80 % citados por GREVE & MADISON (1991), e inferiores aos 93,1 % encontrados por COSTA (1994).

Estes resultados demonstram que o PROH não foi eficiente como crioprotetor durante a criopreservação de COC imaturos bovinos, como utilizado nesse experimento.

Os valores de maturação “in vitro” obtidos com 1,6 M (2,04 %) e com 2,0 M (0 %) de PROH foram inferiores aos 43,5 % obtidos por de BEM et al. (1993) utilizando 2,0 M de PROH. Esses autores utilizaram ovócitos desnudos, reidratação em quatro banhos e a avaliação da maturação nuclear foi realizado somente com os ovócitos considerados com morfologia viável, ao contrário desse experimento, que utilizou COC, desidratação e reidratação em três banhos e avaliação da maturação nuclear em todos os ovócitos, independente da avaliação morfológica. Os

resultados de maturação “in vitro” do presente experimento também foram inferiores aos 8,3 % obtidos por YANG et al. (1994), utilizando COC e 1,6 M PROH com um banho para desidratação e reidratação.

TABELA 6. Efeito da criopreservação sobre a maturação “in vitro” de ovócitos.

Tratamento	n	Metáfase I n (%)	Metáfase II n (%)
1,6 M PROH	98	3 (3,06)	2 (2,04) ^a
2,0 M PROH	135	2 (1,48)	0 (0) ^a
Controle	131	11 (8,39)	110 (84,0) ^b

Colunas com diferentes letras sobrescritas são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$).

O uso de ovócitos desnudos pode não interferir na taxa de maturação “in vitro” (CHIAN et al., 1994), mas pode permitir a entrada e saída de agentes crioprotetores de maneira mais fácil (GEORGE et al., 1992), necessitando de um tempo menor para desidratação. No entanto devemos considerar que a presença das células do “cumulus” durante a maturação “in vitro” é importante para a fecundação e posterior desenvolvimento inicial “in vitro” do zigoto (CHIAN et al., 1994). Pensando neste fato, os ovócitos deste experimento foram criopreservados com suas células do “cumulus”, e passaram por três banhos de desidratação e reidratação, o que pode ser insuficiente para o trânsito do crioprotetor entre o meio extra e intracelular de COC. Isso mostra que talvez COC necessite um maior número de banhos para reidratação do que o utilizado por YANG et al. (1994) e no presente experimento. Entretanto, outros experimentos utilizando COC maturados “in vitro” banhados apenas uma ou três vezes obtiveram melhores resultados de fecundação “in vitro” (FUKU et al., 1992; OTOI et al., 1993). Parece que ovócitos imaturos são mais sensíveis durante as fases de desidratação e reidratação do que ovócitos maturados “in vitro”.

É comum a realização da seleção de COCs recém colhidos através da morfologia das células do “cumulus” e do citoplasma homogêneo e granuloso (DUNFORD et al., 1994; MILOVANOV & SIRARD, 1994). A seleção de ovócitos através da quantidade e compactação das células do “cumulus”, é um bom indicador do potencial da célula em desenvolver a blastocisto (MADISON et al., 1992). Para ovócitos maturados “in vitro” e criopreservados, OTOI et al.

(1993) verificaram que a capacidade de desenvolvimento parece não ser afetada pelo crioprotetor, quando se utiliza ovócitos morfológicamente normais após o descongelamento, para a fecundação “in vitro”.

As relações existentes entre ovócitos com células do “cumulus” compacta e sua capacidade de maturar “in vitro” e entre a expansão das células do “cumulus” e a maturação “in vitro”, verificada em ovócitos frescos, pode não existir quando se refere a ovócitos imaturos recém descongelados e reidratados ou após a maturação “in vitro” destes, ao contrário do verificado por OTOI et al. (1993). Neste experimento verificamos que apesar de 69,48 % dos COC apresentarem morfologia normal (Tab. 3), e o fato de ter ocorrido expansão das células do “cumulus”, após a maturação “in vitro”, em todos os ovócitos criopreservados encontramos uma taxa de maturação nuclear muito baixa (2,04 % e 0 % para 1,6 M e 2,0 M respectivamente), indicando que esses ovócitos não estavam aptos a maturar. Resultado semelhante foi observado por YANG et al. (1994) que encontraram 80,9 % de COC com morfologia normal e 60 % de expansão das células do “cumulus”, mas apenas 8,3 % maturaram “in vitro”. Talvez lesões importantes estejam ocorrendo a nível citoplasmático, sem afetar em demasia a morfologia dos ovócitos. Neste caso a avaliação após descongelamento e reidratação deve ser rigorosa, para se ter um número maior de ovócitos viáveis para a maturação “in vitro”. Ainda assim esta avaliação pode não indicar o número de ovócitos realmente aptos a maturar “in vitro”. O mesmo é válido para a avaliação após a maturação “in vitro”, já que a expansão das células do “cumulus” em COC criopreservados parece não ser um bom indicador da maturação, necessitando-se realizar a avaliação da maturação nuclear, pois nesse experimento obteve-se expansão das células do “cumulus” em todos os COC, após a maturação “in vitro”, e taxa de maturação nuclear extremamente baixa (2,04 % para 1,6 M e 0 % para 2,0 M de PROH), semelhante ao observado por YANG et al. (1994).

Verificou-se que a maioria dos COC criopreservados com 1,6 M e 2,0 M de PROH não foram aptos a atingir metáfase I ou metáfase II. No entanto os ovócitos apresentaram uma condensação dos cromosomas (Fig. 8), independente da concentração (molaridade) do PROH. Para verificar se esta condensação ocorreu antes do congelamento, ovócitos imaturos foram corados pelo mesmo procedimento utilizado com os ovócitos congelados. Os ovócitos permaneceram por 90 minutos em meio Talp Hepes aquecido a 37 °C tempo suficiente entre a colheita e início do congelamento. Esses ovócitos apresentaram uma condensação dos cromosomas menor do que os congelados e sem a observação de vesícula germinal (VG) (Fig. 9),

o que está de acordo com SUSS et al. (1988) ao verificarem que o processo de condensação pode ser induzido logo após a aspiração dos ovócitos dos folículos, mas que o período de condensação dos cromosomas, na ausência de FSH, vai de 8 a 10 h e na presença do hormônio vai até 13 h após o início da maturação “in vitro”. Esses autores encontraram 3 % de vesícula germinal (VG) e consideraram a condensação dos cromosomas sem a presença do núcleo como “breakdown” da vesícula germinal (BDVG, dissolução da membrana nuclear). No entanto SIRARD et al. (1989) encontraram que os ovócitos permanecem 6 h no estágio de VG após início da maturação “in vitro”, que a BDVG ocorre entre 6 e 8 h, e que a condensação da cromatina ocorre entre 8 e 10:30 h. Essa diferença entre os dois trabalhos talvez possa ser explicada pelos métodos de coloração, pois SUSS et al. (1988) utilizaram um método hipotônico, onde ocorre a ruptura da célula e provavelmente a ruptura da membrana nuclear e a coloração foi realizada com Giemsa, e SIRARD et al. (1989) utilizaram um método onde os ovócitos permanecem inteiros, mantendo a integridade das membranas das células, e coloração realizada com Orceína a 1 %. Desse modo, SUSS et al. (1988) não observaram a VG, pois provavelmente a membrana nuclear estava destruída, mas verificaram que a condensação dos cromosomas inicia-se logo após a aspiração. No entanto, como SIRARD et al. (1989) utilizaram um método que conserva a integridade do ovócitos, conseguiram observar a VG em maior número e por mais tempo.

O tempo de condensação dos cromosomas descrita por SIRARD et al. (1989), de 8 a 10:30 h, não é muito diferente do citado por SUSS et al. (1988), que observaram a condensação dos cromosomas até 13 h após o início da maturação “in vitro”, quando na presença de FSH.

Esses estudos demonstram que a condensação dos cromosomas inicia-se logo após a aspiração, mesmo o ovócito estando em estágio de VG, e que os cromosomas continuam se condensando até entrarem em metáfase I, o que ocorre após 10 h de cultivo (SIRARD et al., 1989).

O método utilizado no presente experimento para corar os ovócitos imaturos, foi semelhante ao utilizado por SUSS et al. (1988), com exceção do corante, onde a Giemsa foi substituída pela Orceína a 2 %, e em ambos, os achados foram semelhantes, com observação do início da condensação dos cromosomas em ovócitos imaturos e ausência de VG. Para confirmar os achados de SIRARD et al. (1989), utilizou-se também o método realizado por esses autores. Alguns ovócitos foram mantidos novamente em meio Talp Hepes á 37°C por 90 minutos antes de proceder a manipulação para a fixação. Estes ovócitos foram fixados de maneira a preservar a sua integridade (ANEXO 2), e corados com Orceína a 2 % ou com Giemsa. Neste método, diferente

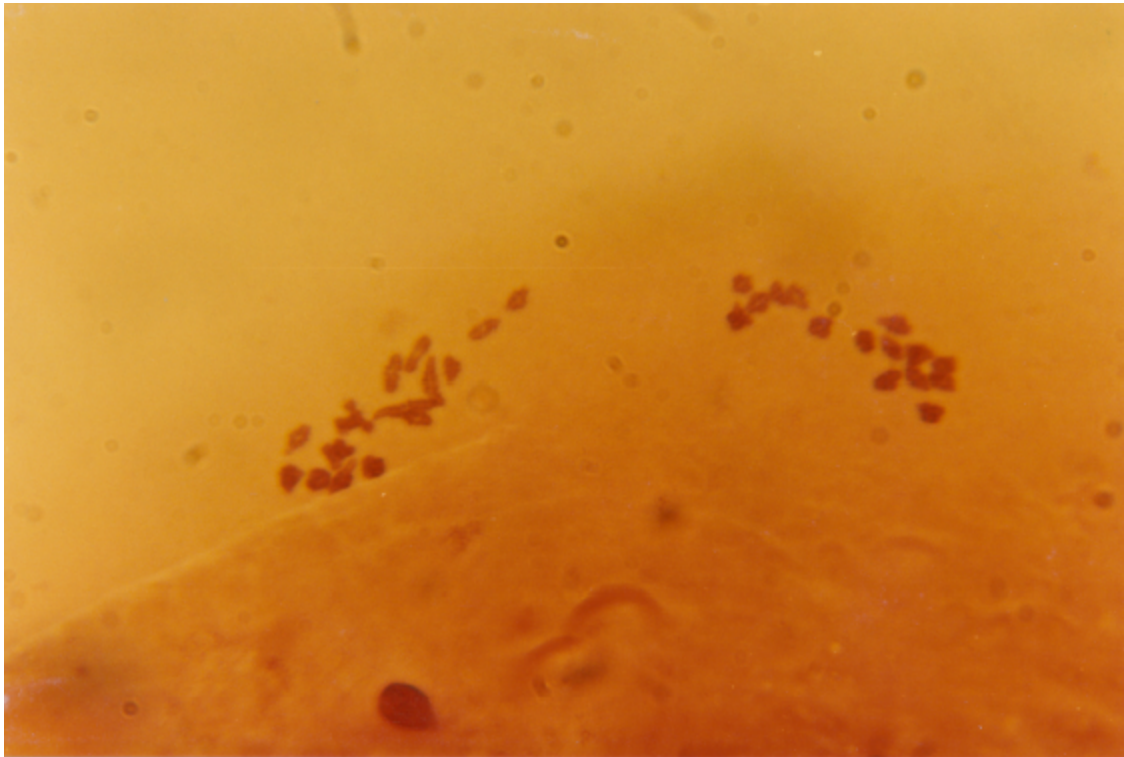


Figura 4 – Configuração cromossômica em metáfase I (bivalentes) de ovócito não congelado de bovino, após 24 h de maturação “in vitro” (1000 x).

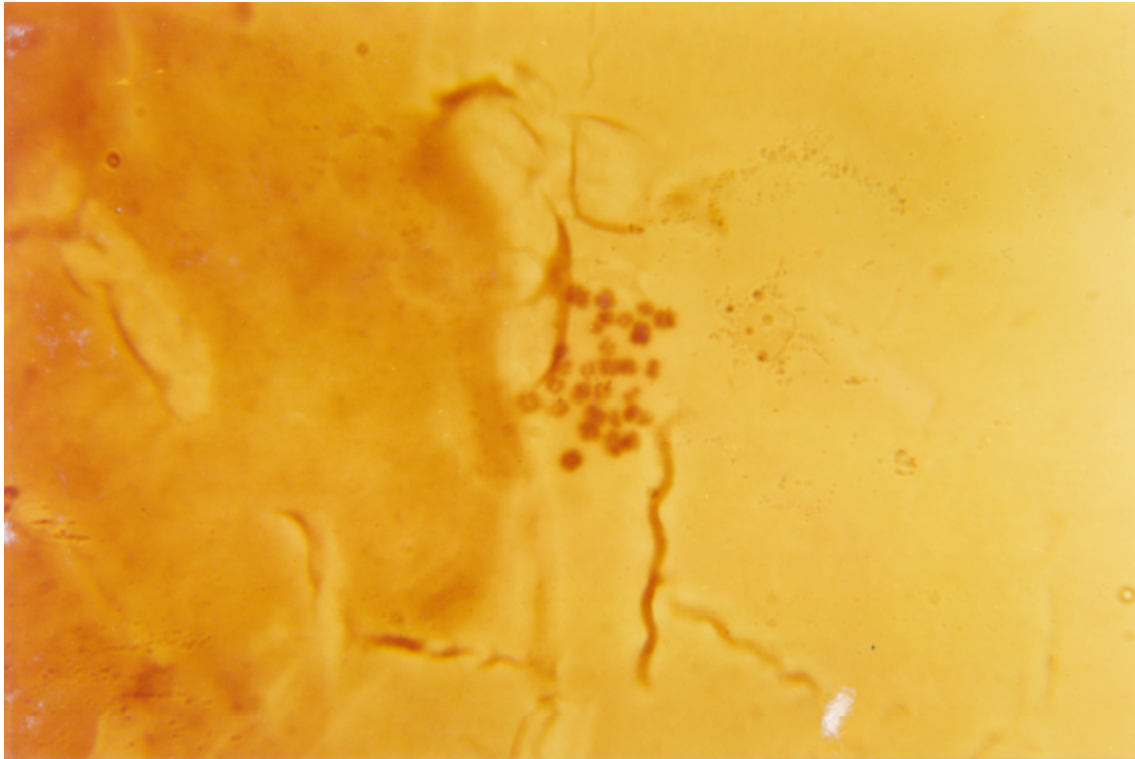


Figura 5 – Configuração cromossômica em metáfase I (bivalentes) de ovócito bovino, criopreservado com PROH, após 24 h de maturação “in vitro” (1000 x).

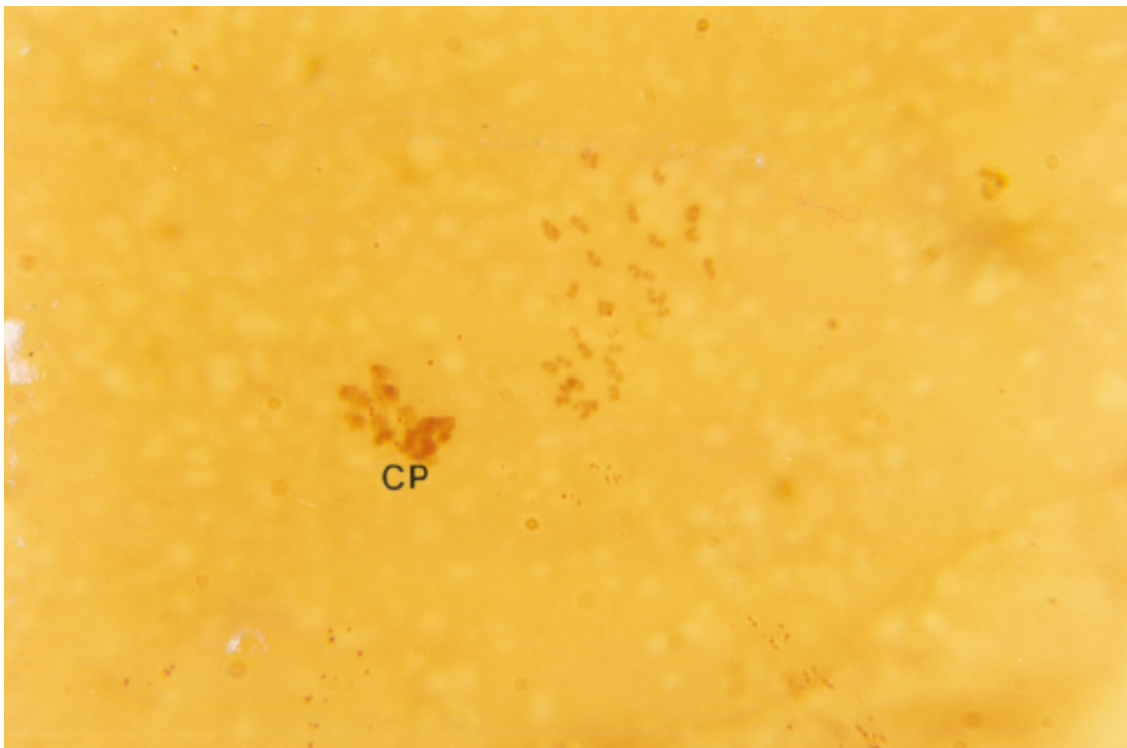


Figura 6 – Configuração cromossômica em metáfase II de ovócito não congelado de bovino, após 24 h de maturação “in vitro”. CP: conjunto de cromossomas pertencentes ao corpúsculo polar (1000 x).

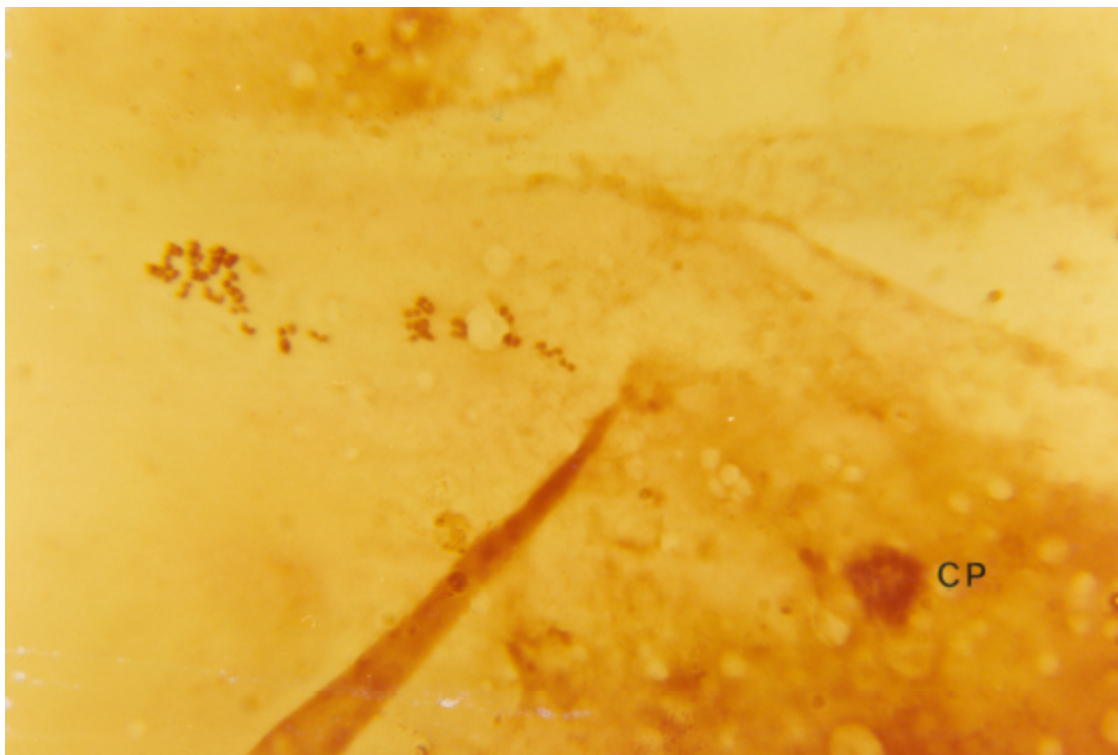


Figura 7 – Configuração cromossômica em metáfase II de ovócito bovino, criopreservado com PROH, após 24 h de maturação “in vitro”. CP: conjunto de cromossomas pertencentes ao corpúsculo polar (1000 x).

do método hipotônico realizado anteriormente, foram observadas VG com ambos os corantes, sendo que com a Orceína também foi possível observar o início da condensação dos cromosomas (Fig. 10 e Fig. 11) e a ausência da membrana nuclear, indicando ter havido “breakdown” da VG (BDVG) (Fig. 12). Assim verificou-se que há a presença de VG e BDVG em ovócitos imaturos após a aspiração, e que não foi observado a VG no procedimento hipotônico, talvez pela ruptura da membrana nuclear.

Desse modo, provavelmente a condensação dos cromosomas observada após a maturação “in vitro” dos ovócitos congelados (Fig. 6), não ocorreu antes do congelamento e sim durante o tempo de cultivo após o descongelamento e reidratação. Isto porque a condensação observada nos ovócitos imaturos (Fig. 7) foi em grau menor do que em ovócitos congelados. Essa condensação vai aumentando de acordo com o tempo de cultivo, podendo permanecer até 13 h, como foi observado por SUSS et al. (1988), até que os cromosomas entrem em metáfase I.

Essas observações indicam que os ovócitos congelados iniciaram a maturação, mas resta saber por qual motivo esta não foi adiante, parando na condensação dos cromosomas, não iniciando nem mesmo a metáfase I. O tempo de maturação “in vitro” utilizado neste experimento foi de 24 h com co-cultura de células da granulosa, tempo suficiente para que ocorra a maturação nuclear em ovócitos não criopreservados (COSTA, 1994). No entanto, com relação a ovócitos criopreservados, o tempo necessário para a maturação “in vitro” pode ser maior. LIM et al. (1992) utilizaram 24 h para maturação “in vitro” com co-cultura de células da granulosa, para ovócitos criopreservados de bovinos, e obtiveram 34,8 % de maturação nuclear, enquanto YANG et al. (1994) utilizaram 22 h e obtiveram 8,3 % de maturação “in vitro”. No entanto, de BEM et al. (1993) utilizaram 26 h de cultivo para maturação “in vitro” de ovócitos criopreservados e obtiveram 43,5% de maturação. Talvez o tempo maior de maturação utilizado por de BEM et al. (1993) tenha permitido que maior porcentagem de ovócitos alcançassem a metáfase II. Neste experimento a porcentagem de metáfase II para ovócitos criopreservados foi baixa após 24 h de maturação “in vitro”, no entanto a metáfase I também foi baixa. Isto pode indicar que o tempo de maturação necessário para COC possa ser maior do que as 26 h utilizado por de BEM et al. (1993), para permitir que os ovócitos atinjam a metáfase I e posteriormente a metáfase II, ou que não houve influência do tempo de maturação neste experimento, e sim que os efeitos da criopreservação podem estar impedindo que os ovócitos alcancem a metáfase I.

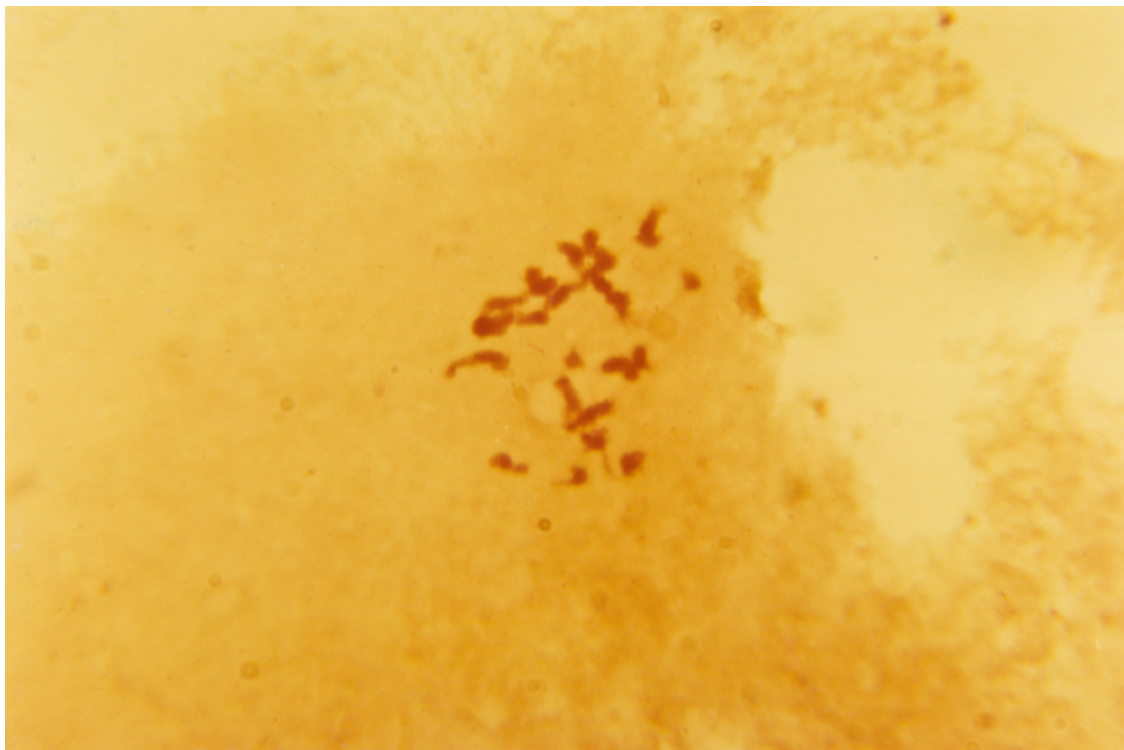


Figura 8 – Condensação cromossômica ovócito bovino, criopreservados com PROH, após 24 h de maturação “in vitro” (1000 x).

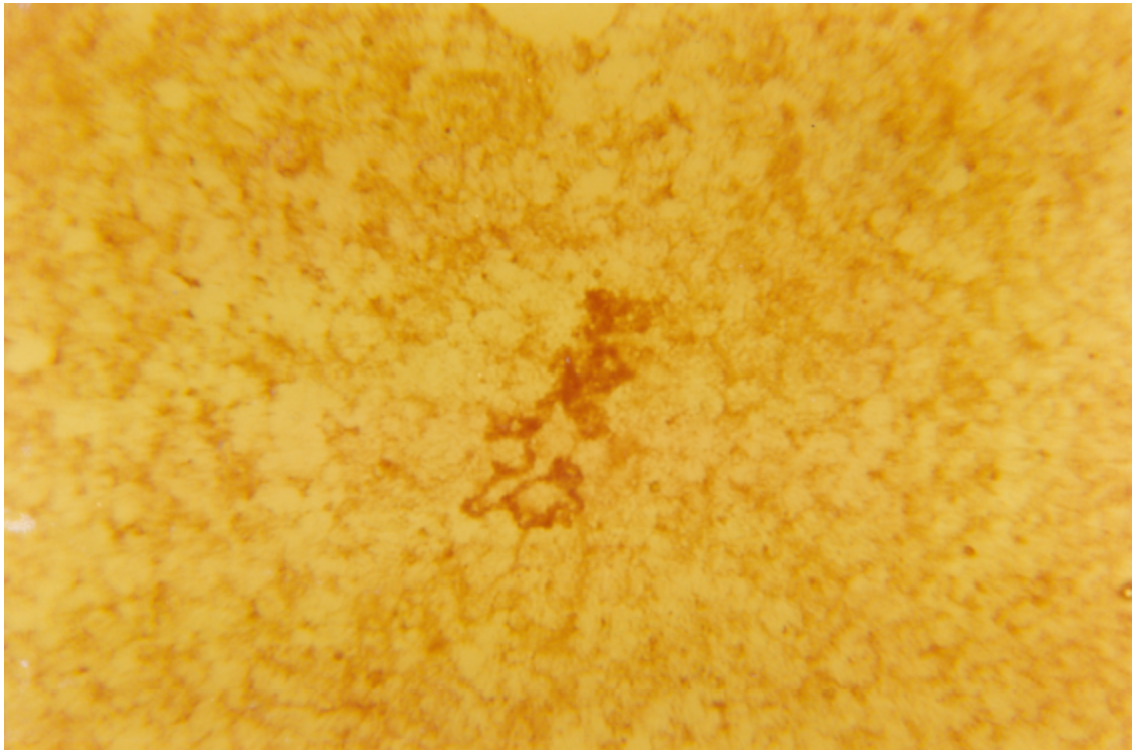


Figura 9 – Início de condensação cromossômica ovócitos bovinos, 90 minutos após a aspiração dos ovários (1000 x).

Alguns autores postulam que a BDVG e o início da condensação dos cromosomas são dependentes da síntese proteica (SIRARD et al., 1989; SIMON et al., 1989). SIRARD et al. (1989) verificaram que a cicloheximide, um inibidor da síntese proteica, bloqueia a BDGV quando adicionada nas 3 primeiras horas da maturação “in vitro”, e que inibe a metáfase I, permitindo apenas a condensação dos cromosomas, quando adicionada entre 6 e 9 h de maturação. KASTROP et al. (1990) encontraram mudanças na síntese proteica durante a BDVG, e observaram que a fosforilação de algumas proteínas ocorre principalmente antes da BDVG. MILOVANOV & SIRARD (1994) verificaram que a manutenção de cromosomas em metáfase depende da síntese contínua de proteínas, e que a inibição da síntese proteica pode levar ovócitos do estágio de metáfase para intérfase. Esses dados indicam a necessidade da síntese proteica para o reinício e continuação da meiose.

Alguns estudos analisaram a ultra-estrutura de ovócitos imaturos e maturados “in vitro” de bovinos após a criopreservação, pelo método clássico, com glicerol ou propanediol. YANG et al. (1994) verificaram que após a criopreservação com 1,0 M de glicerol ou com 1,6 M de PROH, COC imaturos de bovinos apresentaram um aumento da cisterna do retículo endoplasmático (RE), destruição do Complexo de Golgi, desaparecimento da crista mitocondrial e diminuição da densidade da matriz mitocondrial. Já SCHMIDT et al. (1995) analisando ovócitos maturados “in vitro” de bovinos, encontraram uma dilatação acentuada no retículo endoplasmático liso e nas mitocôndrias. Esses estudos indicam a vulnerabilidade dessas organelas citoplasmáticas no processo de criopreservação. Como o retículo endoplasmático (RE) encontra-se associado com ribossomas, ele desempenha um papel fundamental no acúmulo e processamento de proteínas. Assim como o Complexo de Golgi também é importante, pois recebe proteínas e lipídeos recém-sintetizados do retículo endoplasmático e os distribui, e também participa na formação de glicoproteínas, através da glicosilação (ALBEIRTS et al., 1994).

Desse modo, lesões nessas organelas durante a criopreservação podem prejudicar a síntese proteica ou diminuir o aproveitamento de proteínas. Se for utilizado ovócitos imaturos, em estágio de VG ou BDVG, essas lesões podem impedir que atinjam a metáfase, ocorrendo apenas a condensação dos cromosomas. As lesões podem afetar a síntese, glicosilação e secreção de proteínas, agindo semelhante a inibidores da síntese proteica. SIRARD et al. (1989) mostraram que a adição de cicloheximide entre 6 e 9 h após início da maturação “in vitro”, em ovócitos em BDVG, permitiu apenas a condensação dos cromosomas, evitando que alcançasse a metáfase I,

indicando que a síntese proteica é um pré-requisito para os ovócitos atingirem a maturação. O mesmo pode ter ocorrido com os ovócitos criopreservados, onde as lesões citoplasmáticas em ovócitos em VG ou BDVG permitiriam que esses apresentassem a condensação dos cromosomas, evitando a metáfase I, pois as principais lesões observadas no citoplasma são em nível de RE, Complexo de Golgi e mitocôndrias, organelas essenciais para a síntese e secreção proteica e para a produção de energia.

Outra hipótese para os ovócitos não terem prosseguido a meiose é descrita por SCHROEDER et al. (1990), segundo os quais ovócitos imaturos podem sofrer danos na organização dos microtúbulos durante a criopreservação, influenciando na 1ª divisão meiótica. Se para ocorrer a metáfase I são necessários os microtúbulos para a formação dos fusos, e como esses microtúbulos são estruturas proteicas, as lesões a nível de RE e Complexo de Golgi também podem afetar a formação dos fusos. Além disso, YANG et al. (1994) observaram que os microtúbulos podem ser destruídos na criopreservação, assim tanto a não formação e/ou a destruição dos microtúbulos podem prejudicar a formação dos fusos, evitando que os ovócitos atinjam a metáfase I.

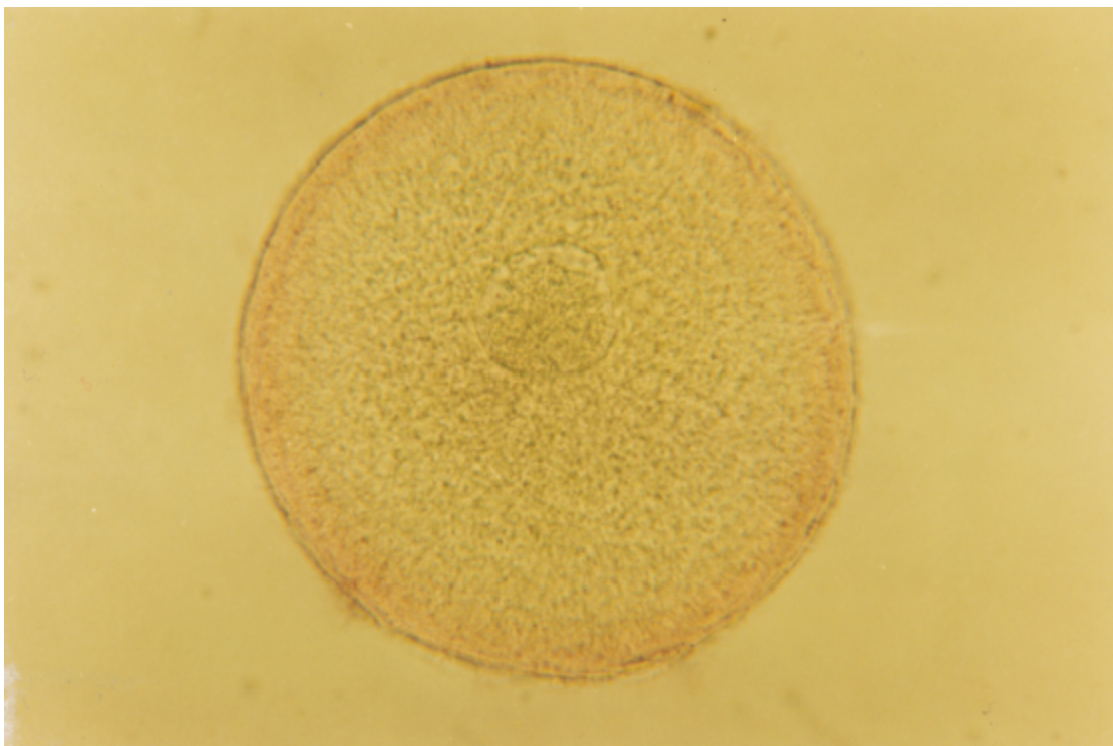


Figura 10 – Ovócito de bovino apresentando vesícula germinal (VG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi o Giemsa (400 x).

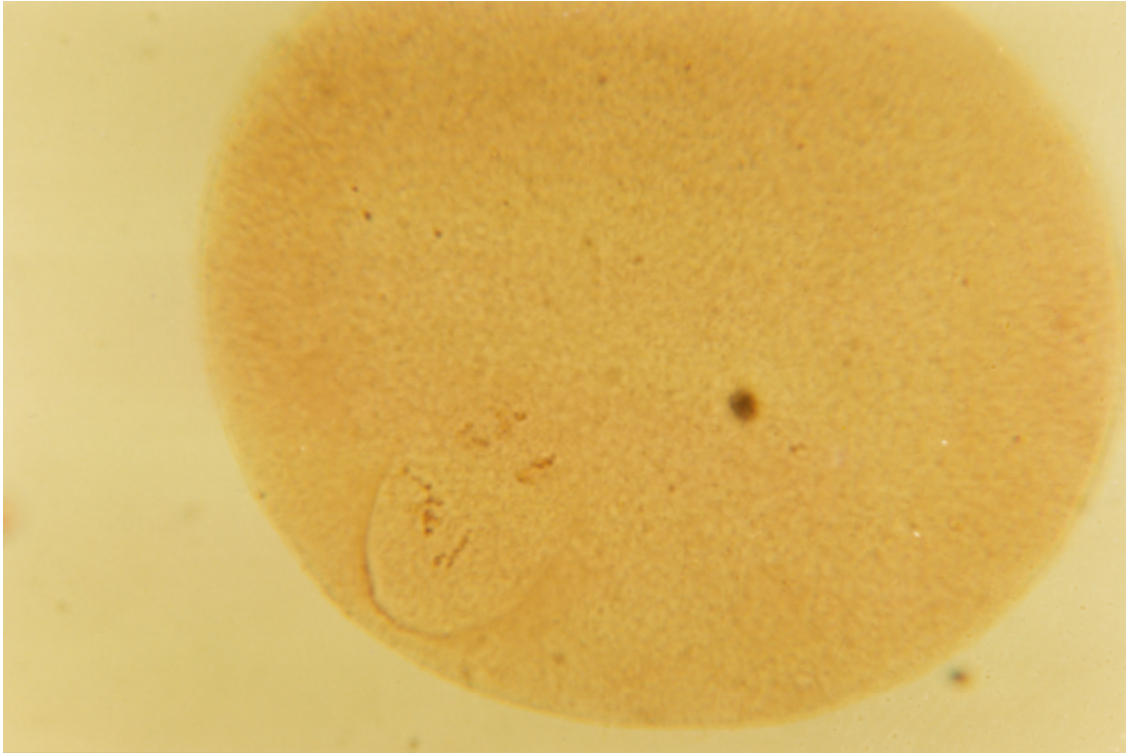


Figura 11 – Ovócito de bovino apresentando vesícula germinal (VG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi o Orceína à 2 % (400 x).

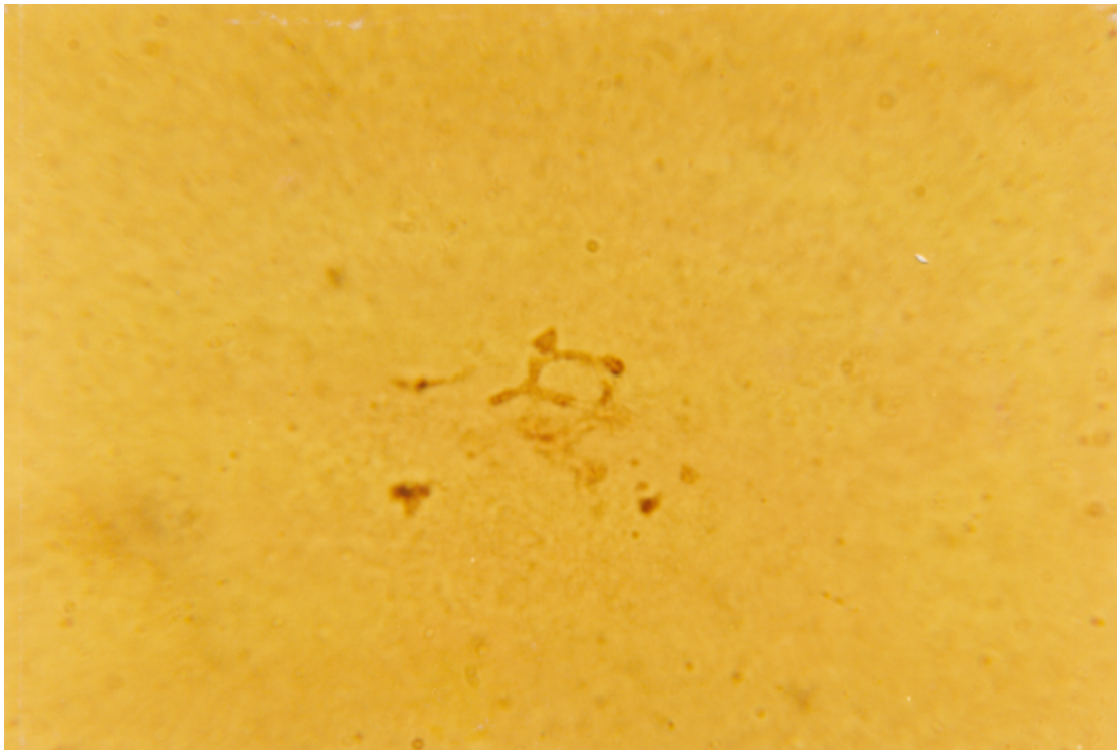


Figura 12 – Ovócito de bovino apresentando ‘breakdown’ da vesícula germinal (BDVG), após 90 minutos da aspiração dos ovários. O corante utilizado foi a Orceína à 2 % (1000 x).

5- CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o propanediol, nas molaridades de 1,6 e 2,0, não foi eficiente para a crioproteção de COC imaturos bovinos, pela técnica utilizada. A baixa taxa de metáfase I e II pode ser devida a lesões citoplasmáticas em nível de retículo endoplasmático, Complexo de Golgi e mitocôndrias, capazes de alterar a síntese proteica, permitindo que os ovócitos alcancem apenas a condensação dos cromosomas, e/ou de prejudicar a formação dos fusos da meiose I.

A relação entre morfologia de ovócitos descongelados e reidratados com sua capacidade de maturar “in vitro”, pode não ser proporcional, pois a porcentagem de ovócitos com morfologia normal foi bem superior a taxa de maturação “in vitro” encontrada, assim como a expansão das células do “cumulus” também não foi um bom indicador da maturação “in vitro”, como ocorre com ovócitos frescos. A criopreservação das células do “cumulus” junto aos ovócitos provocou uma proteção maior a “zona pelúcida”, pois não foi observado rompimento desta após descongelamento e maturação “in vitro”, no entanto suas propriedades foram afetadas, pois estavam mais susceptíveis a danos físicos, o que foi observado durante o desnudamento. Talvez COC imaturos sejam mais susceptíveis durante as etapas de desidratação e reidratação, necessitando de maior tempo para entrada e saída dos agentes protetores.

Enfim, a criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos necessita ser mais estudada, em seus diversos aspectos e fases, tendo em vista os baixos resultados encontrados na literatura mundial, inclusive o deste trabalho.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIGNER, S.; VAN DER ELST, J.; SIEBZEHRUB, E.; WILDT, L.; LANG, N.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. The influence of slow and ultrarapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Human Reproduction**, v. 6, p. 857-864, 1992.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. Molecular biology of the cell. 3^o ed. New York & London: Garland Publishing Inc., 1994. 1294 p.
- AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 103-110, 1994.
- ARAV, A.; RUBINSKY, B.; SEREN, E.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P. The role of thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107-112, 1994.
- ARAV, A.; SHEHU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 353-358, 1993.
- BALL, G.D.; LEIBFRIED, M.L.; LENZ, R.W.; AX, R.L.; FIRST, N.L. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 13, p. 112, 1983.
- BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235-243, 1983.

- BOS-MICKICH, A.; WHITTIGHAN, D.J. Parthenogenetic activation of frozen-thawed mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Abstract Series 7, p. 18, 1991.
- BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 43-64, 1993.
- CARROLL, J.; WARNES, G.M.; MATTHEWS, C.D. Increased in digyny explain polyploid after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 85, p. 489-494, 1989.
- CHEN, J.C.; JI, W.Z.; SHANG, E.Y.; YANG, S.C.; ZON, R.J. Cryopreservation of kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. **Theriogenology**, v. 41, p. 174, 1994.
- CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 41, p. 1499-1508, 1994.
- COSTA, E.P. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "in vitro". Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1994. 155 p. Dissertação (tese de Doutorado).
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; COSTA, A.H.A.; SÁ, W.F. Cultivo "in vitro" de ovócitos de bovinos em diferentes sistemas. I- Efeito na maturação nuclear. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA, 14, Belo Horizonte, 1994, **Anais...**, Belo Horizonte, 1994. p. 70.
- de BEM, A.R.; FREITAS, V.C.; SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; PEGORARO RUMPF, L.M. Cryopreservation of immature oocyte of bovine using 1,2 propanediol and glycerol as cryoprotector. In: RÉUNION ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 9, 1993, Lyon, **Anais...**, Lyon: 1993. p. 184.

- DIDION, B.A.; POMP, D.; MARTIN, M.J.; HOMANICS, G.E.; MARKET, C.L. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2803-2810, 1990.
- DOWNS, S.M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 65-79, 1993.
- DURNFORD, R.; STUBBINGS, R.B.; AINSWORTH, L. Evaluation of culture systems containing bovine oviduct epithelial cells or granulosa cells to mature and maintain the developmental competence of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 42, p. 261-272, 1994.
- FERREIRA, A. de M. Nutrição e atividade ovariana em bovinos: uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 1077-1093, 1993.
- FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y.; MARCUS, G.J.; DOWNEY, B.R. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 29, p. 485-492, 1992.
- GEORGE, M.A.; JONHSON, M.H.; VICENT, L. Use of fetal bovine serum to protect against zona hardening during preparation of mouse oocytes for cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 7, p. 408-412, 1992.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 7ª ed., Piracicaba, Nobel, 1977. 430 p.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. In: SYMPOSIUM ON ADVANCED TOPICS IN ANIMAL REPRODUCTION, 3, Jaboticabal, 1990. **Proceedings...**, Jaboticabal, 1990. p. 63-87.
- GREVE, T.; MADISON, V. *In vitro* fertilization in cattle: a review. **Reproduction Nutrition Development**, v. 31, p. 147-157, 1991.

- HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v. 41, p. 1571-1583, 1994.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J.; WRIGHT Jr, R.W. Deep freezing of mouse one-cell embryos and oocytes using different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 32, p. 735-743, 1989.
- HERRLER, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. Effects of cryoprotectants on fertilization and cleavage of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 35, p. 212, 1991.
- KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 91-97, 1990.
- KASTROP, P.M.M.; BEVERS, M.M.; DESTREE, O.H.J.; KRUIP, Th.A.M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during oocyte maturation in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 305-310, 1990.
- KOLA, I.; KIRBY, C.; SHAW, J.; DAVEY, A.; TROUSON, A. Vitrification of mouse oocytes result in aneuploid zygotes and malformed fetuses. **Teratology**, v. 38, p. 467-474, 1988.
- LEE, C.; CHEN, X. In vitro maturation, fertilization and development of mouse G.V. stage oocytes after freezing and thawing. **Theriogenology**, v. 35, p. 230, 1991.
- LEEUW, A.M.; RALL, W.F.; den DAAS, J.H.G.; KRUIP, Th.A.M. Comparative studies of the efficacy of rapid cryopreservation methods for bovine embryos. In: REUNION ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 7, 1991, Cambridge, **Anais...**, Cambridge: 1991 p. 77-86.
- LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 35, p. 1225-1235, 1991.

- LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stage followed by in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 37, p. 351-361, 1992.
- LIU, J.M.; JIN, Z.Q.; ZHAO, X.X.; ZHU, Y.D. The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. **Veterinary Research Communications**, v. 15, p. 257-260, 1991.
- MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 1-11, 1992.
- MILOVANOV, C.; SIRARD, M.A. Manipulation of chromosome condensation by protein synthesis inhibitors and cyclic AMP during maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 819-827, 1994.
- MURPHY, M.G.; ENRIGHT, W.J.; CROWE, M.A.; McCONNELL, K.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during oestrous cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 333-338, 1991.
- NIEMANN, H.; Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, p. 109-124, 1991.
- NOWSHARI, M.A.; NAYUDU, P.L.; HODGE, J.K. Cryopreservation of mouse oocytes by ultrarapid versus conventional freezing methods. **Journal of Reproduction and Fertility**, Abstract Series 11, p. 65, 1993.
- OCAÑA QUERO, J.M.; MORENO MILLAN, M.; VALERA CORDOBA, M.; RODERO FRANGUILLO, A. The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 41, p. 405-411, 1994.

- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed bovine embryos derived from frozen matured oocytes. **Theriogenology**, v. 38, p. 711-719, 1992.
- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 40, p. 801-807, 1993.
- OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; TAKAGI, M.; SUZUKI, T. Developmental competence of bovine oocytes frozen at different cooling rates. **Cryobiology**, v. 31, p. 344-348, 1994.
- PARKS, J.E.; RUFFING, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 37, p. 59-73, 1992.
- PICKERING, S.J.; JOHNSON, M.H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. **Human Reproduction**, v. 2, p. 207-216, 1987.
- RAFFERTY, K.A. Methods in experimental embryology of the mouse. Johns Hopkins press, Baltimore, 1980.
- RALL, W.F. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 237-245, 1992.
- RALL, W.F.; WOOD, M.G.; KIRBY, C.; WHITTIGHAM, D.G. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification, **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 499-504, 1987.
- RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7, 1992, Jaboticabal, **Anais...**, Jaboticabal: 1992. p. 55-79.

- SATHANANTHAN, H.S.; KIRBY, C.; TROUSON, A.; PHILIPATOS, D.; SHAW, J. The effects of cooling mouse oocytes. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 9, p. 139-148, 1992.
- SCHALKOFF, M.E.; OSKOWITZ, S.P.; POWERS, R.D. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 379-393, 1989.
- SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLI, F.; BREM, G. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 909-915, 1994.
- SCHMIDT, M.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro matured bovine oocytes after controlled freezing in 10 % glycerol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 281-290, 1995.
- SCHROEDER, A.C.; CHAMPLIN, A.K.; MOBRAATEN, L.E.; EPPIG, J.J. Development capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 43-50, 1990.
- SHAW, J.M.; TROUSON, A.O. Parthenogenetic activation of unfertilized mouse oocytes by exposure to 1,2 propanediol is influenced by temperature, oocyte age and cumulus removal. **Gamete Research**, v. 24, p. 269-279, 1989.
- SHORT, R.E.; ADAMS, D.C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 68, p. 29-39, 1988.
- SIMON, M.; JÍLEK, F.; FULKA Jr, J. Effect of cycloheximide upon maturation of bovine oocytes. **Reproduction Nutrition Development**, v. 29, p. 533-540, 1989.

- SIRARD, M.A.; COENEN, K.; BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 37, p. 39-57, 1992.
- SIRARD, M.A.; FLORMAN, H.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; BARNES, F.L.; SIMS, M.L.; FIRST, N.L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 1257-1263, 1989.
- SUSS, U.; WUTHRICH, K.; STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 871-880, 1988.
- SUZUKI, T.; NISHIKATA, Y. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method in vitro. **Theriogenology**, v. 37, p. 306, 1992.
- THIBAUT, C.; SZOLLOSI, D.; GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 27, p. 865-896, 1987.
- TOBBACK, C.; HOUGH, S.; FOOTE, R.H. A procedure for cryopreservation of hamster oocytes yielding highly conserved oocytes suitable for sperm penetration tests. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 184-188, 1991.
- TODOROW, S.J.; SIEBZEHR, E.R.; KOCH, R.; WILDT, L.; LANG, N. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster. **Human Reproduction**, v. 4, p. 805-811, 1989.
- VAN BLERKOM, J. Maturation at high frequency of germinal-vesicle-stage mouse oocytes after cryopreservation : alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. **Human Reproduction**, v. 4, p. 883-898, 1989.

- VAN DER ELST, J.; NERINCKX, S.; VAN STEIRTEGHEM, A. Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploidy at the pronucleate stage, reduced cell numbers in blastocysts and impaired fetal development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 25-32, 1993.
- VICENT, C.; GARNIER, V.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Solvent effects on cytoskeletal organization and in vivo survival after freezing of rabbit oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 809-820, 1989.
- VICENT, C.; PICKERING, S.J.; JOHNSON, M.H. The hardening effect of dimethyl sulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 253-259, 1990.
- WATANABE,Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Fecundação “in vitro” de oócitos bovinos criopreservados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7, 1992, Jaboticabal, **Anais...**, Jaboticabal: 1992. p. 100.
- XU, K.P.; BETTERIDGE, K.J. Cryopreservation of bovine oocytes using propylene glycol: preliminary results. **Theriogenology**, v. 37, p. 324, 1992.
- YANG, Q.Z.; SUN, Q.Y.; LIU, G.Y. QIN, P.C.; FENG, H.L. Developmental competence and ultrastructure damage of cryopreserved G.V. stage bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 41, p. 342, 1994.

7- ANEXOS

ANEXO 1- Meio TCM 199, utilizado para congelamento de ovócitos imaturos de bovinos.

Produto	Quantidade
Ácido ascórbico	0,0075 g
Sulfato de estreptomicina	0,005 g
TCM 199 com sais de Earle ¹	0,7944 g
Hepes	6,29 mM
Lactato de Cálcio	2,75 mM
NaHCO ₃	34,82 mM
Piruvato	2,27 mM
Penicilina G sódica	5000 UI
H ₂ O tridestilada (qsp)	100 ml

1- SIGMA, ref. M-5017

ANEXO 2- Procedimento utilizado para fixação e coloração de ovócitos imaturos bovinos.

Foram adotadas as seguintes etapas para a execução da técnica:

- 1- Desnudamento dos ovócitos imaturos, conforme técnica descrita por COSTA (1994).
- 2- Preparação da lâmina, colocando duas colunas de uma mistura de parafina e vaselina, preparada conforme RAFFERTY (1980), sobre a lâmina, com distância entre si suficiente para encaixar uma laminula sobre elas.
- 3- Colocar ovócitos desnudos sobre a lâmina, entre as colunas de parafina, com uma pequena quantidade de líquido.
- 4- Colocar laminula sobre a parafina e pressioná-la, permitindo que escorra um pouco de líquido pelas bordas, mas evitando que os ovócitos estourem.
- 5- Colocar lâmina preparada com os ovócitos em recipiente contendo 1/3 de metanol: ácido acético 3:1, permitindo que o líquido suba na lâmina por capilaridade, permanecendo por 12 a 24 h para a fixação.
- 6- Após a fixação, colocar o corante (Orceína a 2 % ou Giemsa) entre a lâmina e laminula com a ajuda de papel de filtro, deixando o corante por 2 a 3 minutos.
- 7- Proceder a lavagem da lâmina. Se o corante utilizado foi a Orceína a 2 %, colocar a lâmina em um recipiente contendo 1/3 de ácido acético a 20 % em água destilada e com a ajuda de um papel de filtro fazer com que o ácido acético penetre entre a lâmina e laminula, fazendo a retirada do corante. Se utilizado o Giemsa, realizar a lavagem com água destilada somente, e se necessário utilizar papel de filtro para fazer a água penetrar entre lâmina e laminula.
- 8- Após a retirada do corante vedar as bordas com esmalte e analisar em microscópio óptico, utilizando aumentos de 400 x e 1000 x em óleo de imersão.