

Universidade do Estado de Santa Catarina
Centro de Ciências Agroveterinárias

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS
POR VITRIFICAÇÃO**

Rodrigo Marques dos Santos



CAV-UDESC

Lages, SC, Brasil

CAV-UDESC

Dissertação de Mestrado

**CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS POR
VITRIFICAÇÃO**

Rodrigo Marques dos Santos

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Lages, SC, Brasil

2005

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Santos, Rodrigo Marques dos

Criopreservação de ovócitos bovinos por
vitrificação / Rodrigo Marques dos Santos –
Lages, 2005.
29 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências
Agroveterinárias / UDESC.

1. Vácuo 2. Nitrogênio super-resfriado 3.
Vitrificação

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS POR VITRIFICAÇÃO

Por
Rodrigo Marques dos Santos

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**.

Lages, SC, Brasil.

2005

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

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

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS POR VITRIFICAÇÃO

Elaborada por

Rodrigo Marques dos Santos.

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Alceu Mezzalira
(Presidente/Orientador) –CAV/UDESC

Dra. Lígia M. Cantarelli Pegoraro
EMBRAPA – Clima Temperado

Dr. Marcel Frajblat
UNIVALI

Lages, janeiro de 2005.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACOES.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 – Características biológicas e sensibilidade dos ovócitos ao resfriamento	2
2.2 – Vitrificaco	4
2.3 – Evolução e estágio atual da vitrificaco de ovócitos	5
2.4 - Utilização do vácuo sobre o Nitrogênio (N ₂) líquido	6
2.5 – Metodologias empregadas na vitrificaco de ovócitos	7
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 – Obtenção dos ovócitos	10
3.2 – Grupos experimentais	10
3.3 – Vitrificaco e reaquecimento	11
3.4 – Produção de vácuo sobre o N ₂ Líquido	11
3.5 – Produção in vitro dos embriões	12
3.5.1 – Maturação in vitro	12
3.5.2 – Fecundação in vitro	13
3.5.3 – Cultivo in vitro	13
3.6 – Delineamento experimental e análise estatística	13

4 – RESULTADOS	14
4.1 – Produção de vácuo/Temperatura	14
4.2 – Taxa de clivagem	14
4.3 – Taxa de blastocistos.....	15
5 – DISCUSSÃO	17
6 – CONCLUSÕES	20
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
8- ANEXOS	28

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por me proporcionar este momento.

Agradeço aos meus pais, Abadi e Nair, que muitas vezes renunciaram seus sonhos em favor dos meus, ofereço esta nova conquista em reconhecimento aos seus esforços, muito obrigado!

Agradeço a Quéli, minha noiva, pela compreensão, companheirismo e principalmente pelo apoio e incentivo em todas as horas.

Agradeço ao Prof. Dr. Julio Viegas, por ter me iniciado na pesquisa, ofereço esta conquista.

Agradeço a Dra. Lígia M. C. Pegoraro, pelo incentivo e exemplo profissional.

Agradeço ao Prof. Alceu Mezzalira pela oportunidade, apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, Sandro, Gilvânio, Rodrigo Donatti, Luis Fernando, Lederson, Edson e Otávio, pelo incentivo e amizade.

À equipe do laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem, Diego, Joana Cláudia, Marcos, Marcio, Jader, Fabiano, Fernanda, Dennys e Kelyn, obrigado pelo convívio.

Ao Frigorífico Verdi e Fox, especialmente ao senhor Valdecir Ferreira, pela colaboração na obtenção do material utilizado neste trabalho.

Ao centro de Ciências Veterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, pela disponibilização de sua infra-estrutura para realização deste trabalho.

Ao Conselho Brasileiro de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento do projeto.

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo suporte da bolsa de pesquisa.

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

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Taxas de clivagem e de blastocistos de embriões bovinos derivados de ovócitos maturados (MII) e imaturos (VG), vitrificados em nitrogênio líquido submetido ao vácuo ou atmosfera normal de pressão.....15
- Tabela 2** – Taxas de clivagem e de blastocistos de ovócitos bovinos vitrificados imaturos ou após maturação16
- Tabela 3** – Taxas de clivagem e de blastocistos de ovócitos bovinos (VG e MII), vitrificados em nitrogênio líquido submetido ao vácuo ou atmosfera normal.....16

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA – Análise de Variância.

CCO's – Complexo *Cumulus*-Ovócitos.

DMSO – Dimetil Sulfóxido.

EG – Etileno Glicol.

FSH – Hormônio Folículo Estimulante.

GL-tip – Gel Loading Tip.

LF-Líquido Folicular.

LH – Hormônio Luteinizante.

M II – Metáfase II.

OPS – Open Pulled Straw.

PBS – Phosphated Buffered Saline Solution.

SEE – Soro de água em Estro.

SOFaaci – Synthetic Oviduct Fluid with amino acids and sodium citrate.

SSV – Solid Surface Vitrification.

TCM 199 - Tissue Culture Medium.

VG – Vesícula Germinativa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS POR VITRIFICAÇÃO

AUTOR: RODRIGO MARQUES DOS SANTOS

ORIENTADOR: PROF. Dr. ALCEU MEZZALIRA

Lages, SC, 12 de janeiro de 2005.

Este estudo teve como objetivo avaliar a vitrificação de ovócitos bovinos com o emprego de nitrogênio líquido em atmosfera normal ou submetido ao vácuo. Com um equipamento artesanal o nitrogênio foi submetido a uma pressão de vácuo de 300 mmHg durante 45 segundos, quando sua temperatura decresceu para -200°C . Os ovócitos foram vitrificados após 22 horas de maturação (Maturados - MII) em nitrogênio resfriado (G1), ou nitrogênio normal (G2), ou logo após a seleção (Imaturos - VG), em nitrogênio resfriado (G3), ou nitrogênio normal (G4). Para a vitrificação os ovócitos foram inicialmente expostos a uma solução com 10% EG + 10% DMSO, durante 30 segundos, e logo em seguida, a uma solução de vitrificação com 20% EG + 20% DMSO + 0,3 M Sacarose, durante 20 segundos. Grupos de 3 a 4 ovócitos foram envasados em cada OPS, que a seguir era mergulhada no nitrogênio. O reaquecimento foi realizado através da exposição por cinco minutos a cada concentração (0,30 e 0,15M) de sacarose. A fecundação (D0) foi realizada com 2×10^6 espermatozóides/mL, selecionados por “Swim-up” e incubados por 18 a 22 horas. Os prováveis zigotos foram cultivados em placas de quatro poços em meio SOFaaci, a 39°C , com 5% CO_2 e umidade saturada. As taxas de clivagem (D2) e de blastocistos (D8) observadas foram de 53,6% e 10,6% no G1, 43,5% e 6,7% no G2, 41,2% e 8,8% no G3 e 33,9% e 4,2% no G4. O nitrogênio super-resfriado, por ação do vácuo, proporcionou maiores taxas de desenvolvimento embrionário após a vitrificação de ovócitos bovinos imaturos ou maturados.

Palavras chave: Vácuo; Nitrogênio resfriado; Vitrificação; Criopreservação; Ovócitos bovinos.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias
Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

CRYOPRESERVATION OF BOVINE OOCYTES BY VITRIFICATION

AUTHOR: RODRIGO MARQUES DOS SANTOS

ADVISER: PROF. Dr. ALCEU MEZZALIRA

Lages, SC. January, 12, 2005.

The aim of this study was to evaluate the vitrification procedure performed with liquid nitrogen submitted to vacuum or normal atmosphere. With a home made pump, liquid nitrogen was submitted to 300 mmHg vacuum pressure for 45 seconds when its temperature decreased to -200°C . Oocytes were vitrified after 22 hours maturation (Matured - MII) in cooled nitrogen (G1) or normal nitrogen (G2), or just after selection (Immature - GV), with cooled nitrogen (G3), or normal nitrogen (G4). Vitrification was performed by 30 seconds exposure to a 10% EG + 10% DMSO solution, and just after to a 20% EG + 20% DMSO + 0.3M Sucrose, vitrification solution, for 20 seconds. Groups of 3 or 4 oocytes were loaded in each OPS and directly plunged in liquid nitrogen. The warming was performed by 5 minutes exposure steps to decreasing concentrations (0.3 and 0.15M) sucrose solution. Fertilization (Day 0) was performed with 2×10^6 spermatozoa/mL selected by Swim-up procedure and incubated for 18-22 hours. Presumptive zygotes were cultured in 4 well dishes with SOFaaci medium, at 39°C , with 5% CO_2 and saturated humidity. The cleavage (Day 2) and blastocyst (Day 8) rates observed were 53.6% and 10.6% in G1, 43.5% and 6.7% in G2, 41.2% and 8.8% in G3 and 33.9% and 4.2% in G4. The vacuum cooled nitrogen provides higher developmental rates following vitrification of immature and matured bovine oocytes.

Key words: Vacuum, Cooled nitrogen, Vitrification, Cryopreservation, Bovine oocytes.

1- INTRODUÇÃO:

A modernização da pecuária vem requerendo o aprimoramento e o desenvolvimento de novas tecnologias em diversas áreas do conhecimento. A reprodução é uma das áreas que tem determinado o crescimento da atividade, tornando-a mais competitiva e assim mais lucrativa. Dentre as biotecnologias relacionadas à reprodução, tem destaque a criopreservação, principalmente de ovócitos. Esta técnica é capaz de alavancar o desenvolvimento da pecuária, já que permitindo a preservação, maximiza o material genético de uma fêmea, como já acontece com a criopreservação do sêmen no macho. A otimização da técnica possibilitará a formação de bancos de germoplasma, mantendo a variabilidade genética entre as raças e também preservando raças que poderão ter importância no futuro. A possibilidade de preservar espécies selvagens em extinção, mantendo a diversidade genética animal, também é um fato a ser considerado. Além da preservação da biodiversidade animal, a criopreservação tem enorme importância na reprodução humana, como ferramenta auxiliar para o tratamento de diversos transtornos de fertilidade. Finalmente, a criopreservação representa ainda um apoio essencial na produção de embriões, na engenharia genética e nos procedimentos de transferência nuclear e clonagem de embriões.

Dentre as metodologias para criopreservação de ovócitos, a vitrificação tem sido apontada como uma importante alternativa, sendo sua viabilidade demonstrada em várias espécies, especialmente em bovinos. Nos últimos anos a pesquisa tem indicado que o aumento da velocidade de resfriamento e reaquecimento proporciona maior sobrevivência aos ovócitos criopreservados e isto é obtido através das metodologias de vitrificação. Os resultados obtidos com a criopreservação de ovócitos bovinos, especialmente os imaturos, são ainda muito baixos e pouco atrativos economicamente. Assim, o grande desafio é buscar um protocolo para melhorar e estabilizar os resultados, estabelecendo um método que possa ser aplicado para criopreservação de ovócitos de todas as espécies.

Este estudo teve como objetivo avaliar a utilização de um equipamento artesanal para produzir uma condição de vácuo, bem como avaliar o efeito do nitrogênio líquido

submetido ao vácuo, na vitrificação de ovócitos bovinos imaturos e maturados, através da metodologia OPS.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

2.1 – Características biológicas e sensibilidade dos ovócitos ao resfriamento:

O congelamento de embriões é uma prática bem sucedida, porém na criopreservação de ovócitos os resultados ainda são pobres. Isto é ocasionado principalmente pelas baixas taxas de sobrevivência, fecundação e desenvolvimento embrionário. As maiores diferenças entre embriões e ovócitos são as características da membrana plasmática, presença de grânulos corticais e a metáfase II da meiose com seu sistema de fusos (Chen et al., 2003).

Comparando com embriões, o volume dos ovócitos é bem maior e por essa razão a relação superfície/volume celular é menor, dificultando assim, a sua desidratação (Fabbri et al., 2000). Além disso, os ovócitos apresentam um alto teor lipídico e um baixo coeficiente de permeabilidade. A elevada concentração e a variada distribuição dos lipídios intracelulares podem induzir a nucleação de gelo intracelular o que é associado à alta sensibilidade ao congelamento (Parks; Ruffing, 1992).

Após a fecundação ocorre um aumento de cálcio (Ca) livre no citoplasma, modificando a força iônica e o potencial de membrana (Gook et al., 1993). Estas alterações levam a uma mudança de conformação, facilitando a permeação de crioprotetores e água nos embriões, promovendo desidratação, reduzindo a formação intracelular de gelo e determinando maior taxa de sobrevivência. O incremento de resistência da membrana plasmática também intensifica a tolerância à pressão osmótica durante o reaquecimento. Estes fatores explicam a razão dos embriões serem mais tolerantes ao resfriamento e reaquecimento do que os ovócitos (Chen et al., 2003).

Outro fator que está envolvido com as particularidades da criopreservação de ovócitos são os danos causados no sistema de fusos meióticos durante a criopreservação. Ovócitos maturados (metáfase II) apresentam um sistema de fusos formados por microtúbulos que são constituídos pela polimerização por dímeros de

Tubulina α e β (Zhou et al., 2002). Os microtúbulos são organizados do centro para os pólos e os cromossomos ancorados aos pares, em forma de barril (Maro et al., 1986). Os fusos meióticos são cruciais para eventos como fecundação, término da meiose, formação de segundo corpúsculo polar, migração do pro-núcleo e formação do primeiro fuso mitótico. A desorganização do fuso meiótico resulta em dispersão cromossomal, impossibilita a fertilização e interrompe o desenvolvimento embrionário (Eroglu et al., 1998).

A exposição de ovócitos maturados (metáfase II) às altas concentrações de crioprotetores pode induzir as injúrias nos fusos meióticos durante os procedimentos de congelamento e reaquecimento em baixas temperaturas, levando a uma redução da viabilidade destas estruturas (Chen et al., 2000). Uma alternativa proposta para evitar estes danos é a criopreservação de ovócitos imaturos em fase de vesícula germinativa, porém estes apresentam menor condutividade hidráulica (Agca et al., 1997). Também é freqüente o rompimento das junções intercomunicantes do ovócito com as células do *cumulus oophorus*, que são fundamentais na cooperação metabólica durante o desenvolvimento e maturação ovocitária, parecendo ser este o principal sítio das lesões durante o congelamento (Hochi et al., 1997).

Estudos recentes realizados por Men et al. (2003) indicaram a possibilidade de que em parte os baixos resultados verificados na criopreservação de ovócitos poderiam ser devidos a apoptose. O processo de apoptose é um mecanismo de degeneração necessário para o desenvolvimento normal e homeostase dos tecidos. Segundo Wyllie (1980), este processo pode ser ativado em resposta a uma variedade de causas não fisiológicas, como temperatura, toxicidade, oxidação e radiação. Características morfológicas podem ser observadas nas células em apoptose, como a marginalização da cromatina e a formação de corpos de apoptose (Wyllie, 1997).

Diante das características particulares dos ovócitos, é importante que uma metodologia adequada às suas características seja empregada durante a criopreservação. A vitrificação pode ser considerada como a alternativa mais adequada e viável por proporcionar grande velocidade de resfriamento e reaquecimento, com reduzido tempo de exposição, além do pequeno volume de crioprotetor.

2.2 - Vitrificação:

Vitrificação é a solidificação de uma solução em baixas temperaturas, sem a formação de cristais de gelo (Vajta, 2000). O fenômeno é obtido com o aumento extremo da viscosidade, que requer grande velocidade de resfriamento e o uso de soluções crioprotetoras que impeçam a formação de cristais de gelo e aumentem a viscosidade em baixas temperaturas. Algum grau de vitrificação acontece em qualquer processo de criopreservação, com o aumento da concentração das soluções ao redor dos ovócitos ou embriões, determinadas pela retirada gradual da água na forma de gelo (Rall et al., 1984). Em criobiologia, o termo vitrificação se refere ao processo onde a solução inteira que contém a amostra biológica vitrifica completamente. O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeação, a concentração, o tempo de exposição e o volume do crioprotetor, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular sem, entretanto, provocar lesões de efeito osmótico ou tóxico (Rall; Fahy, 1985).

A estratégia da vitrificação é diferente do congelamento lento ou tradicional, uma vez que no congelamento lento a taxa de resfriamento possibilita manter um equilíbrio entre os vários fatores que podem resultar em injúrias, como a formação de cristais de gelo, fratura da zona, alterações de organelas intracelulares e do citoesqueleto (Massip, 1989; Dobrinsky, 1996; Kasai, 1997; Martino, 1996a; Saha, 1996). Na vitrificação, se elimina totalmente a formação de cristais de gelo intracelular, porém como consequência negativa do processo, existe uma grande probabilidade de ocorrer quase todos os danos, com exceção dos causados pela cristalização de gelo. Para contornar esses problemas, principalmente tóxicos e osmóticos, utilizam-se associações de diferentes crioprotetores. O emprego de substâncias químicas menos tóxicas, a combinação de duas ou três substâncias, incluindo pelo menos uma permeável, é um ponto chave para diminuir os danos na vitrificação (Fahy, 1984; Rall, 1989; Massip, 1995; Kasai, 1990; Smorag, 1994; Palasz, 1996).

Por outro lado, a vitrificação resultou em algumas consequências positivas, além da eliminação total da formação de cristais de gelo. O aumento da velocidade de resfriamento reduziu os danos produzidos pelas gotas lipídicas intracelulares, principalmente as contidas nas membranas e no citoesqueleto, por atravessar mais rapidamente as faixas críticas (+15°C a -5°C) de temperatura (Dobrinski, 1996; Martino, 1996b; Isachenko, 1998; Zeron, 1999).

A maioria dos atuais métodos de vitrificação está baseada no contato direto da solução crioprotetora com o nitrogênio líquido, sendo que o modo mais simples para estabelecer este contato é a imersão direta de embriões ou ovócitos no nitrogênio líquido. Isto foi sugerido por Landa; Tepla (1990) para embriões de camundongos, e a partir daí utilizado para embriões e ovócitos bovinos (Riha, 1991; Yang, 1999; Papis, 1999). Baseado nos resultados da vitrificação de embriões de *Drosophila* (Steponkus, 1990; Mazur, 1992), ovócitos bovinos foram vitrificados com o auxílio de grades de microscopia eletrônica, onde foram depositados, seguindo-se a imersão em nitrogênio líquido (Martino, 1996b; Arav, 1997). A taxa de resfriamento calculada foi de 14.000 a 24.000°C/minuto, semelhante às obtidas por Vajta et al. (1997) utilizando palhetas de 0,25 mL estiradas e abertas (OPS), aproximadamente 20.000°C/minuto. Velocidades semelhantes também foram obtidas utilizando outras metodologias de vitrificação, Mezzalira et al. (1999) utilizando micropipetas de vidro, Lane et al. (1999) utilizando cryoloop e Matsumoto et al. (2001) utilizando nylon mesh.

Velocidades ainda maiores podem ser atingidas com a eliminação do efeito isolante, determinado pela exposição ao vapor do nitrogênio líquido em ebulição o que é obtido pelo contato com uma superfície metálica resfriada “solid-surface vitrification” (Dinnyés et al., 1999).

2.3 – Evolução e estágio atual da vitrificação:

O fenômeno da vitrificação foi primeiramente investigado por Luyet em 1937, onde foi observado o potencial de certos crioprotetores em solidificarem sem a formação de cristais de gelo. Durante os primeiros estudos não estava claro como o procedimento de vitrificação poderia ser estabelecido. A vitrificação requer taxas muito altas de resfriamento e ao mesmo tempo proteção de substâncias potencialmente tóxicas, o que inicialmente levou a uma substituição deste por outros métodos de criopreservação. Rall; Fahy (1985) demonstraram pela primeira vez que embriões murinos poderiam ser criopreservados pela vitrificação, sendo que a partir dos resultados alcançados com a vitrificação de embriões de *Drosophila* (Steponkus, 1990; Mazur, 1992), a vitrificação passou a ser uma alternativa viável para criopreservação, de ovócitos. Subseqüentemente, foi reconhecido que as soluções para vitrificação

poderiam ser mais adequadas para a preservação de células e tecidos vivos do que as soluções que cristalizam, diminuindo os danos durante o resfriamento e reaquecimento (Kuleshova et al., 2002).

A partir da vitrificação de ovócitos bovinos em grades de microscopia eletrônica, imersas diretamente em nitrogênio líquido (Martino et al., 1996b; Arav; Zeron, 1997), seguido do desenvolvimento da tecnologia utilizando palhetas de 0,25 mL estiradas e abertas (OPS) (Vajta et. al., 1997), obteve-se um grande aumento na taxa de resfriamento, com resultados significativos, indicando a vitrificação como método potencial de criopreservação, principalmente de ovócitos. O aumento na velocidade de resfriamento determinou a redução no tempo de exposição aos crioprotetores, com redução dos danos. Assim foi possível o uso de menores concentrações de crioprotetores com a conseqüente redução da toxicidade. Estes resultados geraram uma grande procura por novos métodos, que aumentaram as taxas de resfriamento com sucesso notável (Hamawaki, 1999; Papis, 1999), sendo alcançado, por conseguinte, um avanço considerável na criopreservação de ovócitos e embriões.

Os novos protocolos de vitrificação resultaram em um avanço considerável em certas áreas da embriologia, sendo que os mais significativos foram na criopreservação de ovócitos bovinos. Recentemente resultados promissores foram obtidos com a vitrificação de ovócitos imaturos com a metodologia OPS (Vieira et al., 2002). Esses resultados associados ao nascimento de produtos saudáveis e normais, após vitrificação de ovócitos imaturos, abrem uma nova perspectiva para a criopreservação destas estruturas.

Outra área que a vitrificação passou a ter importância é a da clonagem de embriões. A vitrificação de embriões bovinos em fase de pré-compactação não diminuiu a capacidade de desenvolvimento e os blastômeros foram prosperamente utilizados como doadores para transferência nuclear (Booth, 1998; Peura, 1999).

2.4 – Utilização do vácuo sobre o nitrogênio líquido:

Uma das formas de se obter maiores velocidades de resfriamento é a aplicação de vácuo sobre o nitrogênio líquido. A redução da pressão sobre o nitrogênio líquido com volume constante, induz o super-resfriamento, baixando a temperatura de -196°C

para até -210°C (Arav et al., 2000; Nowshari; Brem, 2001), quando se forma uma espécie de floculação, denominada “slush.” Esta condição persiste por alguns minutos após o final da aplicação do vácuo, possibilitando a vitrificação de amostras. Ocorre ainda a supressão da ebulição ou a redução da liberação de vapor, quando da imersão da palheta neste nitrogênio líquido.

A vitrificação de ovócitos no nitrogênio líquido submetido ao vácuo proporciona um grande incremento na velocidade de resfriamento, principalmente na faixa de temperatura (entre $+20$ e -40°C), o que pode reduzir estes danos, e assim proporcionar maior viabilidade destas estruturas após o reaquecimento. Nowshari; Brem (2001) utilizando um equipamento de vácuo (Vit-Master[®]; Mini Tübe, Landeshut, Germany) obtiveram um incremento na taxa de resfriamento de 5.300 para $10.300^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, utilizando a metodologia OPS.

2.5 – Metodologias empregadas na vitrificação de ovócitos:

A técnica de vitrificação teve uma grande evolução, principalmente, devido ao desenvolvimento de novas metodologias, sendo que todas elas buscaram uma maior velocidade de resfriamento e reaquecimento.

Martino et al. (1996b) e Arav et al. (1997) utilizaram a vitrificação com o emprego de grades de microscopia eletrônica, onde é colocada a solução de vitrificação contendo as estruturas. Devido ao contato direto da grade com o nitrogênio líquido e o pequeno volume de solução (1 a $2\mu\text{l}$), este método proporciona uma rápida taxa de resfriamento e reaquecimento, apresentando ainda a vantagem de possibilitar a criopreservação de um grande número de estruturas simultaneamente.

A técnica de vitrificação usando “Nylon Mesh” descrita por Matsumoto et al. (2001) consiste no uso de uma tela de nylon com $60\mu\text{m}$ de espessura, confeccionadas em forma triangular, para facilitar o manuseio é amarrado um fio de algodão no nylon mesh. O nylon mesh contendo as estruturas a serem criopreservadas é mergulhado diretamente no nitrogênio líquido.

Mezzalira et al. (1999) utilizaram micropipetas de vidro confeccionadas através do aquecimento e estiramento de tubos de vidro (micro-hematócrito) até obter um diâmetro interno próximo a $0,35\text{mm}$. Estas micropipetas são utilizadas abertas e o envase das estruturas é feito por capilaridade. Uma vantagem da sua utilização é o seu

menor diâmetro em relação às OPS (0,87mm), o que deve proporcionar maior velocidade de resfriamento, além de facilitar o manuseio, realizado com elas próprias.

O método de vitrificação descrito por Dinnyés et al. (1999), “Solid-Surface Vittrification” (SSV), consiste em colocar os ovócitos em uma solução de equilíbrio, seguindo-se a passagem por três pequenas gotas de solução de vitrificação, quando são colocados diretamente sobre uma superfície metálica pré-resfriada (-150 a -180°C), parcialmente submersa em nitrogênio. O processo é realizado em menos de 30 segundos.

O método de vitrificação Cryoloop desenvolvido por Lane et al. (1999), é realizado através de uma espécie de laçada com 20µm de largura aproximadamente, utilizando um fio com 0,5 a 0,7mm de diâmetro. O cryoloop é imerso na solução de vitrificação para formar um “filme”, onde as estruturas a serem criopreservadas são depositadas, quando o cryoloop é mergulhado no nitrogênio líquido.

O método GL-tip (Gel-Loading Tip) foi descrito por Tominag et al. (2001), onde as estruturas são primeiramente colocadas em uma solução de equilíbrio por 2 minutos e em seguida transferidas para solução de vitrificação e envasadas por capilaridade para o gel contido na extremidade de uma palheta. É utilizado em torno de 0,7µl de solução de vitrificação e as estruturas ficam expostas a esta solução por 30 segundos, quando o GL-tip é mergulhado no nitrogênio.

O método “cryotop” descrito por Kuwayama et al. (2000), consiste em uma palheta de 0,25mL com a extremidade em forma de bisel, onde a solução de vitrificação contendo a estrutura a ser criopreservada é depositada em uma pequena gota na parede desta palheta, que a seguir é mergulhada diretamente no nitrogênio líquido. A taxa de resfriamento obtida com este método é de aproximadamente 23.000°C/min.

A velocidade de resfriamento quando uma palheta é mergulhada em nitrogênio líquido depende de vários fatores, tais como: o volume de substâncias crioprotetoras ao redor dos embriões, o diâmetro interno da palheta, a densidade da parede da palheta e a forma do contato direto entre o nitrogênio líquido e a solução contendo a estrutura. A metodologia OPS descrita por Vajta et al. (1997), utiliza uma palheta de inseminação artificial de 0,25 mL aquecida e estirada até ficar com metade do seu diâmetro original, reduz consideravelmente estes fatores. Os ovócitos e embriões são envasados nas OPS pelo efeito capilar e a taxa de resfriamento quando se mergulha a OPS diretamente no nitrogênio líquido é aproximadamente de 20.000°C/min (Vajta, 1998a). O tempo

requerido para equilíbrio-resfriamento é de 7 minutos e reaquecimento-rehidratação é de 15 minutos.

Uma vantagem do uso das OPS é a velocidade com que as estruturas podem ser envasadas e recuperadas, reduzindo o tempo de exposição dos embriões a concentrações muito altas de crioprotetores (Beebe et al., 2002). Outra vantagem é o uso de volumes muito pequenos, que ajudam a reduzir os danos na zona pelúcida que ocorrem durante o resfriamento e reaquecimento.

A maioria das técnicas está baseada no contato direto do nitrogênio líquido e a solução crioprotetora contendo os ovócitos ou embriões, que pode ser uma fonte de contaminação (Tedder, 1995; Fountain, 1997). Estes perigos podem ser evitados utilizando-se nitrogênio líquido filtrado ou envasando as estruturas em um recipiente hermético estéril antes do armazenamento (Vajta, 1998b; Lane, 1999). Com a metodologia OPS é possível a aplicação estéril da vitrificação, utilizando-se nitrogênio filtrado e posteriormente depositando a OPS dentro de uma palheta de 0,5 mL pré-resfriada em nitrogênio líquido. Esta palheta é lacrada evitando assim a contaminação durante o seu armazenamento.

Embora com grande diversidade metodológica e constituindo-se numa alternativa promissora, a vitrificação de ovócitos ainda não proporciona resultados economicamente atraentes, sendo necessárias investigações que possibilitem a adequação do método e a obtenção de maiores taxas de sobrevivência e viabilidade embrionária.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS:

O experimento foi conduzido no laboratório de reprodução animal Prof. Assis Roberto de Bem, localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages SC.

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

3.1 - Obtenção dos ovócitos:

Os ovários bovinos eram provenientes do frigorífico Fox, localizado nas proximidades do perímetro urbano de Lages SC e do frigorífico Verdi, localizado no município de Pouso Redondo SC, distante 100 km do laboratório. Os ovários foram transportados até o laboratório à temperatura de 29-35°C em PBS (Phosphated buffered saline solution), adicionado de penicilina (65 mg/L) e estreptomicina (50 mg/L). O tempo de transporte do frigorífico até o laboratório foi em média de 4 horas, sendo estes, transportados em recipiente isotérmico.

Os complexos cumulus-ovócitos (CCOs) foram aspirados através de uma bomba de vácuo, de folículos de 2 a 8 mm, os quais foram puncionados utilizando-se uma agulha 19G (Venescalp®, Feira de Santana, BA), acoplada a um tubo de ensaio com capacidade de 15 mL (Corning, NY, USA). Após a punção, o líquido folicular aspirado permaneceu por 5-10 minutos no tubo de ensaio para ocorrer a decantação, sendo em seguida removido o sedimento através de uma pipeta de Pasteur, e após depositado em placas de Petri (100x15mm, Corning, NY, USA) para ser realizada a busca dos CCOs.

A busca, seleção e manutenção dos CCOs foram realizadas em líquido folicular (LF), segundo Lehmkuhl et al. (2001). Foram utilizados apenas CCOs com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por camadas de células compactas do *cumulus*.

3.2 – Grupos experimentais:

Os CCOs foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais e um grupo controle. Cada grupo foi constituído por 15 a 18 ovócitos em cada repetição, sendo realizadas dez repetições.

O primeiro grupo (G1) foi constituído por 174 ovócitos maturados, vitrificados em nitrogênio (N₂) líquido submetido ao vácuo, o segundo grupo (G2) foi constituído por 170 ovócitos maturados, vitrificados em nitrogênio líquido em atmosfera normal de pressão, o terceiro grupo (G3) foi constituído por 172 ovócitos imaturos, vitrificados em nitrogênio líquido submetido ao vácuo, e o quarto grupo (G4) foi constituído por 175 ovócitos imaturos, vitrificados em nitrogênio líquido em atmosfera normal de

pressão. A cada rotina, um grupo de ovócitos foi submetido ao cultivo para controle (n=282), sem vitrificar.

3.3 - Vitrificação e reaquecimento:

Os procedimentos de vitrificação e reaquecimento foram realizados sobre mesas aquecidas a 37°C em sala climatizada a 25°C. O protocolo de vitrificação foi adaptado de Vajta et al. (1998a), com soluções modificadas pelo uso de soro de égua em estro (SEE). Três a quatro ovócitos foram envasados em cada OPS, sendo primeiramente expostos por 30 segundos a uma solução de equilíbrio, composta por 10% de Etileno Glicol (EG) + 10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) em meio de manutenção (TCM 199 sais Earle tamponado com Hepes) com 20% de SEE e, em seguida transferidos para a solução de vitrificação, composta por 20% de EG + 20% de DMSO + 0,5 M de sacarose em meio de manutenção com 20% de SEE. Dentro de um período de 20 segundos os CCOs foram envasados e mergulhados num ângulo de 45 graus, diretamente no nitrogênio líquido em atmosfera normal de pressão ou submetido ao vácuo, conforme o tratamento.

Para o reaquecimento, cada OPS foi exposta ao ar (sala climatizada a 25°C) por quatro segundos, sendo em seguida mergulhada em uma solução de 0,30 M de Sacarose, em meio de manutenção, acrescido de 10% de SEE. Os CCOs permaneceram nesta solução por 5 minutos, quando foram transferidos para uma solução de 0,15 M de Sacarose, em meio de manutenção, por mais 5 minutos, antes de serem transferidos para o meio de manutenção com 10% de SEE.

3.4 - Produção do vácuo sobre o nitrogênio (N₂) líquido:

A produção de vácuo sobre o nitrogênio líquido foi realizada através de uma bomba de vácuo adaptada através de mangueiras de silicone a um recipiente de acrílico hermeticamente fechado, sendo que no interior deste foi colocado outro recipiente de isopor com aproximadamente 300mL de nitrogênio líquido.

A bomba de vácuo permaneceu em funcionamento durante aproximadamente 45 segundos para cada OPS, sendo desligada no momento de mergulhar a OPS no

nitrogênio líquido submetido ao vácuo. Em seguida a OPS foi transferida para outro recipiente contendo nitrogênio líquido em atmosfera normal, onde permanecia até o reaquecimento.

O nitrogênio líquido foi submetido a uma pressão de vácuo de 300 mmHg durante 45 segundos aferido através de um vacuômetro (FANEM LTDA, São Paulo, Brasil), quando sua temperatura atingiu -200°C aferida através de termômetro digital Ioptherm 48 (IOPE – Inst. de Precisão Ltda, São Paulo, Brasil).

3.5 – Produção in vitro dos embriões:

3.5.1 – Maturação in vitro:

A maturação foi realizada em meio TCM 199-Sais de Earle (Gibco BRL, Paisley, NK) adicionado de 26,2mM de NaHCO₃, 25mM de Hepes, 0,2mM de Piruvato de Sódio com 0,01UI de FSH/mL (Folltropin™ - Bioniche, Canada), 0,5µg/mL de LH (Lutropin™ – Bioniche, Canada) e 10% de SEE.

Os grupos 1 e 2, compostos por ovócitos maturados, foram submetidos a maturação por 22 horas em estufa (Haeraeus Instruments GmbH, Germany) a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada. Em seguida foi realizada a retirada parcial das células do *cumulus*, com a utilização da enzima Hialuronidase (0,5UI/µl) durante dois minutos. Logo após o desnudamento parcial dos ovócitos dos grupos 1 e 2, estes foram vitrificados, reaquecidos e submetidos a mais 2 horas de maturação, totalizando 24 horas de maturação.

Os grupos 3 e 4, compostos de ovócitos imaturos, foram vitrificados, reaquecidos, e em seguida, submetidos a maturação por 24 horas, em estufa a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

O grupo controle foi submetido a 24 horas de maturação sob as mesmas condições dos grupos experimentais.

3.5.2 – Fecundação in vitro:

Após as 24 horas de maturação foi realizada a fecundação dos grupos experimentais e do grupo controle, com sêmen congelado de um touro da raça Red Angus, sendo os espermatozóides selecionados pelo método de migração ascendente “Swim-up”, em meio TALP-SPERM. Os CCOs foram incubados com $2,0 \times 10^6$ espermatozóides/mL por um período de 18 horas em estufa a 39°C em 5% de CO₂ e umidade saturada, em meio TALP-FERT adicionado de 30µg/mL de Heparina, 30µg/mL de Penicilinamina, 15µM de Hipotaurina e 1µM de Epinefrina.

3.5.3 – Cultivo in vitro:

Dezoito horas após a fecundação procedeu-se a remoção das células do *cumulus* através de agitação mecânica e a transferência dos prováveis zigotos para uma placa de quatro poços contendo 400µl de meio SOFaaci, suplementado com 5% de SEE, mantido sob óleo mineral. Após 24 horas de cultivo em estufa a 39°C em 5% de CO₂ e umidade saturada, realizou-se a avaliação da clivagem, sendo mantida na placa somente as estruturas clivadas. Em seguida a placa contendo as estruturas clivadas foi incubada em estufa a 39°C com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de nitrogênio durante o período de cultivo remanescente (162 horas).

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

3.6 – Delineamento experimental e análise estatística:

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e a análise das taxas de clivagem e de blastocistos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias pelo método Bonferroni, com nível de

significância de 5%. Todas as avaliações foram efetuadas sobre o número inicial de ovócitos utilizados.

4 – RESULTADOS:

4.1 – Produção de vácuo / Temperatura:

Com 45 segundos de funcionamento da bomba, a pressão de vácuo no nitrogênio líquido foi de 300 mmHg, obtendo-se uma temperatura de -200°C no momento da imersão da OPS. Foi observada uma diminuição da vaporização do nitrogênio líquido submetido ao vácuo, não sendo, porém, observado a sua floculação (slushing).

4.2 – Taxa de clivagem:

A taxa média de clivagem do grupo controle foi de 78,7%. Como demonstrado na tabela 01, dentre os grupos criopreservados o melhor percentual de clivagem foi obtido com ovócitos maturados e vitrificados com vácuo (G1 - 53,6%), que foi superior ($P < 0,05$) aos demais grupos. Não foram observadas diferenças nos grupos que utilizaram ovócitos imaturos vitrificados com vácuo (G3 - 41,2%) ou atmosfera normal (G4 - 33,9%). O emprego do vácuo na vitrificação de ovócitos imaturos (G3) possibilitou a obtenção de taxas de clivagem semelhantes às obtidas com ovócitos maturados e vitrificados em atmosfera normal (G4).

Quando não se considerou o efeito do vácuo, (Tabela 2), as taxas de clivagem para ovócitos VG (37,5%) e MII (48,5%) foram semelhantes ($P > 0,05$), demonstrando que não houve efeito do estágio de maturação.

4.3 – Taxa de Blastocistos:

A taxa média de blastocistos obtida no grupo controle foi de 30,8%. Com ovócitos vitrificados após a maturação, maior taxa de blastocistos ($P<0,05$) foi obtida com a utilização do nitrogênio líquido sob vácuo (10,6%) em relação ao nitrogênio líquido em atmosfera normal de pressão (6,7%), como pode ser observado na tabela 01.

TABELA 1. Taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos derivados de ovócitos maturados (MII) e imaturos (VG), vitrificados em nitrogênio líquido submetido ao vácuo ou em atmosfera normal de pressão.

Tratamentos	Repetições	Ovócitos	Clivagem	Blastocistos
		n	(%)	(%)
G1 MII / Vácuo	10	174	53,6 ^a	10,6 ^a
G2 MII / Pressão Normal	10	170	43,5 ^b	6,7 ^{bc}
G3 VG / Vácuo	10	172	41,2 ^{bc}	8,8 ^{ab}
G4 VG / Pressão Normal	10	175	33,9 ^c	4,2 ^c

^{a,b,c} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0,05$).

Como demonstra a tabela 01, também com ovócitos imaturos a utilização do vácuo proporcionou um aumento significativo na taxa de blastocistos de 4,2% para 8,8%, índice este que é semelhante ao obtido após vitrificação de ovócitos maturados (10,6%). Quando se empregou nitrogênio líquido em atmosfera normal, também não se observou diferença ($P<0,05$) na taxa de blastocistos, após a vitrificação de ovócitos imaturos ou maturados, entretanto estes resultados foram inferiores àqueles obtidos com o emprego de vácuo (Tabela 01).

Como demonstrado na tabela 02, quando apenas o estágio de maturação foi considerado, não foi observada diferença estatística ($P<0,05$) entre as taxas de blastocistos obtidas de ovócitos vitrificados imaturos (6,8%) ou após a maturação (8,9%).

TABELA 2: Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas de ovócitos bovinos vitrificados imaturos ou após a maturação.

Tratamentos	Ovócitos	Clivagem	Blastocistos
	n	(%)	(%)
Imaturos VG	347	37,5 ^a	6,8 ^a
Maturados MII	344	48,5 ^a	8,9 ^a

^a Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística ($P > 0,05$).

Na tabela 3, demonstra-se que quando o estágio de maturação não foi considerado, as taxas de clivagem não diferiram com o emprego do vácuo na vitrificação de ovócitos bovinos. Entretanto, a taxa de blastocistos foi significativamente superior ($P < 0,05$) com sua utilização de nitrogênio submetido ao vácuo (9.7%) em relação à atmosfera normal.

TABELA 3: Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas de ovócitos bovinos (VG e MII), vitrificados em nitrogênio líquido submetido ao vácuo ou atmosfera normal.

Tratamentos	Ovócitos	Clivagem	Blastocistos
	n	(%)	(%)
Nitrogênio – Vácuo	346	47,5 ^a	9,7 ^a
Nitrogênio – Atmosfera Normal	345	38,7 ^a	5,4 ^b

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

5 – DISCUSS AO:

O super-resfriamento do nitrogênio líquido permite um significativo aumento na velocidade de resfriamento (até 4 vezes). Neste estudo, o equipamento artesanal utilizado com este propósito, empregou uma pressão de vácuo de 300 mmHg durante 45 segundos, o que proporcionou um decréscimo da temperatura para -200°C . Esta queda de temperatura é inferior à obtida por Arav (2000), na criopreservação de ovócitos bovinos (-210°C) e por Nowshari; Brem (2001), na vitrificação de embriões de camundongo (-212°C) em estágio de pro-núcleo. Embora não atingindo temperaturas tão baixas quanto às obtidas pelos demais autores, que utilizaram um equipamento comercial (Vitmaster®), e mesmo sem observar a floculação (slush) no nitrogênio líquido, descrita nestes trabalhos, foi observada uma nítida redução da ebulição, quando da imersão da OPS contendo os ovócitos. Mesmo não sendo possível aferir a velocidade de resfriamento obtida nestas condições, a redução da ebulição possibilita uma maior transferência de calor entre a OPS e o nitrogênio líquido, aumentando a velocidade de resfriamento e assim reduzindo os riscos de injúrias.

A vitrificação é uma das principais alternativas para a criopreservação de ovócitos. Em função dos melhores resultados obtidos com ovócitos maturados, a criopreservação de ovócitos imaturos tem sido considerada menos viável e assim menos investigada (Yang et al., 1998; Le Gal; Massip, 1999). Entretanto, avanços importantes foram alcançados na última década, com a obtenção de gestações (Otoi et al., 1995; Yang et al., 1998) e bezeros nascidos, (Kubota et al., 1998; Vieira et al., 2002) provenientes de ovócitos imaturos criopreservados. Neste estudo, o super-resfriamento do nitrogênio líquido possibilitou a obtenção de idêntica viabilidade na vitrificação de ovócitos imaturos ou maturados, demonstrando que é viável se criopreservar ovócitos imaturos e que a técnica poderá ser largamente empregada num futuro próximo, flexibilizando os trabalhos de punção folicular, que poderão ser realizados em locais distantes de laboratórios, com a criopreservação dos ovócitos logo após a coleta. Neste experimento utilizou-se a associação dos crioprotetores etileno glicol e DMSO, bem como o contato direto da solução contendo os ovócitos e o nitrogênio líquido. Em experimentos anteriores, esta tecnologia proporcionou resultados significativos tanto com ovócitos maturados (Mezzalira et al., 2002;) como imaturos (Vieira et al., 2002).

O aumento na velocidade de resfriamento/reaquecimento tem sido apontado como uma forma de melhorar a eficiência do processo. Resultados expressivos foram obtidos por Martino et al. (1996a) e Arav (1997) através da vitrificação de ovócitos bovinos em grades metálicas de microscopia, submergidas diretamente em nitrogênio líquido, o que possibilitou taxas de resfriamento de 14.000 a 24.000°C/minuto. Velocidades semelhantes também podem ser obtidas com outras metodologias como as micropipetas de vidro (Mezzalira et al, 1999), o método cryoloop (Lane et al., 1999), o método SSV (Dinnyés et al., 1999) e o nylon mesh (Matsumoto et al., 2001). Entretanto, a metodologia OPS (Vajta et al., 1997), utilizada neste experimento, proporciona taxa de resfriamento de aproximadamente 20.000°C/minuto, é de fácil execução, sendo atualmente uma das metodologias mais utilizadas na vitrificação de ovócitos.

Os índices de clivagem obtidos com ovócitos imaturos (41,2% e 33,9%) neste estudo demonstraram que houve um avanço na criopreservação dessas estruturas, ficando próximos aos 50% obtidos por Vajta et al. (1998a) e dos 49,10% de Mezzalira et al. (2002) com a vitrificação de ovócitos maturados. Também com ovócitos maturados, os índices de clivagem obtidos neste estudo (53,6% e 43,5%) foram semelhantes aos obtidos por estes autores. Entretanto, observou-se uma significativa redução nas taxas de blastocistos, obtendo-se 10,6%, 6,7%, 8,8% e 4,2% para os grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Estes resultados confirmam as observações de Fuku et al. (1995) e Vieira et al. (2002), de que a clivagem não é um parâmetro satisfatório para a avaliação da viabilidade embrionária após a vitrificação. É possível que danos imperceptíveis, que não impedem as primeiras clivagens, sejam determinantes na posterior redução da viabilidade dos embriões.

Também na vitrificação de ovócitos maturados, a utilização do nitrogênio líquido super-resfriado proporcionou maiores taxas de blastocistos (10,6%) em relação ao grupo com nitrogênio líquido em atmosfera normal (6,7%). Efeito significativo do super-resfriamento do nitrogênio líquido também foi observado na vitrificação de ovócitos imaturos, obtendo-se 8,8% de blastocistos no grupo com vácuo e 4,2% no grupo sem vácuo. Estes dados confirmam as observações de Arav (2000), de que o super-resfriamento do nitrogênio líquido proporciona taxas de resfriamento extremamente altas, com redução dos danos da criopreservação e melhoria da viabilidade dos ovócitos criopreservados.

Contrário aos dados observados neste estudo, Nowshari; Brem (2001) trabalhando com embriões de camundongo no estágio de pro-núcleo, não observaram efeito significativo do nitrogênio líquido super-resfriado. Entretanto, os autores trabalharam com diferente estágio (embrião) e diferentes espécies (camundongos), que apresentam características distintas dos ovócitos bovinos, o que pode explicar as diferenças observadas.

Neste estudo, quando se desconsiderou o tipo de nitrogênio utilizado (resfriado ou não), obteve-se taxas de blastocistos de 6,8% e 8,9% com ovócitos imaturos e maturados, respectivamente, não sendo observado efeito significativo do estágio de maturação. Já quando se avaliou o efeito do super-resfriamento do nitrogênio líquido na vitrificação de ovócitos, desconsiderando-se o estágio de maturação, observou-se uma taxa de blastocistos de 9,7%, significativamente superior aos 5,4% obtidos com nitrogênio líquido em atmosfera normal.

Estes dados demonstram que o super-resfriamento do nitrogênio líquido, obtido pela submissão ao vácuo, proporciona maior viabilidade embrionária, possivelmente por aumentar a velocidade de resfriamento, reduzindo os danos da vitrificação tanto em ovócitos maturados como imaturos.

6 – CONCLUSÕES:

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O emprego de vácuo para resfriar o nitrogênio líquido proporciona maior viabilidade na vitrificação de ovócitos bovinos.
- A utilização da vitrificação com nitrogênio líquido super-resfriado possibilita a obtenção de idêntica viabilidade com ovócitos bovinos imaturos ou maturados.
- O equipamento utilizado para a produção de vácuo com 300 mmHg de pressão negativa tem baixo custo, é eficiente e proporciona um decréscimo na temperatura do nitrogênio de 4°C, reduzindo as características de ebulição do mesmo.
- A metodologia de vitrificação empregada neste estudo é de fácil aplicação, proporcionando resultados satisfatórios na criopreservação de ovócitos bovinos, imaturos e maturados.
- Novos estudos devem ser conduzidos com objetivo de melhorar as taxas de desenvolvimento embrionário, viabilizando economicamente o processo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGCA, Y., et al. Cryoprotectant and water permeability of immature and in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, V.47, n.l., p.340, 1997.

ARAV, A.; ZERON, Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drope size technique (MSD) is effected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**, V.47, p.341, 1997.

ARAV, A.; ZERON, Y., OCHERETNY, A. A new device method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, V.53, p.248, 2000 (abstract).

BEEBE, L. F. S., et al. Piglets born from centrifuged and vitrified early and perihatching blastocysts. **Theriogenology**, V.57, p. 2155-2165, 2002.

BOOTH, P. J., et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of both cytoplasts and day 3 embryos donors in bovine nuclear transfer. **Theriogenology**, V.49, p.384, 1998.

CHEN, S. U., et al. Open pulled Straw for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. **Hum. Reprod.**, V.15, p.2598-2603, 2000.

CHEN, S. U. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocytes freezing. **Molecular and Cellular Endocrinology**, V.202, p.101-107, 2003.

DINNYÉS, A., et al. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following partheogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod**, V.63, p.513-518, 1999.

DOBRINSKY, K. Y. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, V.45, p.17-26, 1996.

EROGLU, A.; TOTH, T. L.; TONER, M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. **Fertil. and Steril.**, V.69, p.944-957, 1998.

FABBRI, R., et al. Technical aspects of oocytes cryopreservation. **Mol. Cell. Endocrinol**, V.169, p.39-42, 2000.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, V.21, p.407-426, 1984.

FOUNTAIN, D. M., et al. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. **Transfusion.**, V.37, p.585-591, 1997.

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

GOOK, D. A.; OSBORN, S. M.; JOHNSTON, W. I. H. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. **Hum. Reprod.** V.8, p. 1101-1109, 1993.

HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, V.51, p.165, 1999.

HOCHI, S., et al. Effect of nuclear stages during in-vitro maturation on the survival of bovine oocytes following vitrification. **Theriogenology**, V.47, n. 1., p.345, 1997. Abstract.

ISACHENKO, V., et al. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid-droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**, V.36, p. 250-253, 1998.

KASAI, M., et al. A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **J. Reprod. Fertil**, V.89, p. 90-97, 1990.

KASAI, M. Cryopreservation of mammalian embryos. **Mol. Biotechnol**, V.7, p. 17-26, 1997.

KUBOTA, C. In vitro survival frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer and parthenogenetic activation. **Mol. Reprod. Dev.**, V.51, p.271-286, 1998.

KULESHOVA, L. L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, V.78, p. 449-452, 2002.

KUWAYAMA, M.; KATO, O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J. Assist. Reprod. Genet**, V.17, p. 477, 2000. Abstract.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol. (Praha)**, V.36, p. 153-158, 1990.

LANE, M., et al. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. **Theriogenology**, V.51, p. 167, 1999.

LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, Cycloheximide treatment and vitrification procedure. **Cryobiology**, V.38, p.290-300, 1999.

LEHMKUHL, R.C. Desenvolvimento de óocitos bovinos mantidos em fluido folicular. In: **Dissertação de Mestrado do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Santa Maria**. Santa Maria- RS, p.16, 2001.

LUYET, B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. **Biodynamica**, V.1, p. 1-14, 1937.

MARO, B. Mechanism of polar body formation in the mouse oocytes: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and plasma membrane. **J. Embryol. Exp. Morph.**, V.92, p. 11-32, 1986.

MARTINO, A.; POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, V.45, p.503-512, 1996a.

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

MASSIP, A., et al. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. **Anim. Reprod. Sci.**, V.19, p.117-129, 1989.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYÉS, A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Hum. Reprod.**, V.10, p.3004-3011, 1995.

MATSUMOTO, H., et al. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, V.42, p.139-144, 2001.

MAZUR, P., et al. Cryobiological preservation of Drosophila embryos. **Science**, V.258, p.1932-1935, 1992.

MEN, H., et al. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, V.47, p.73-81, 2003.

MEZZALIRA, A., et al. Vitriificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, V.27, n.1, p.262, 1999.

MEZZALIRA, A., et al. Vitriificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos a citocalasina B. **Brasilian Veter. Journal**, V.39 n. 1/6, p.260-265, 2002.

NOWSHRI, M. A.; BREM, G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. **Hum. Reprod.**, V.16, p. 2368-2373, 2001.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, V.32, p.455-460, 1995.

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnol. Adv.**, V.14, p.127-149, 1996.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, V.51, p. 173, 1999.

PARKS J. E.; RUFFING, N. A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, V.37, p.353-358, 1992.

PEURA, T. T., et al. Comparison of fresh and vitrified in vitro produced bovine embryos as donors for nuclear transfer. **J. Reprod. Fertil.**, V.116, p.95-101, 1999.

RALL, W. F.; REID, D. S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, V.21, p.106-121, 1984.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, V.312, p.573-575, 1985.

RALL, W. F.; MEYER, T. K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, V.31, p.683-692, 1989.

RIHA, J., et al. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after nonsurgical transfer. **Zivoc. Vir.**, V.36, p.113-120, 1991.

SAHA, S., et al. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step dehydration. **Theriogenology**, V.46, p. 331-343, 1996.

SMORANG, Z.; GAJDA, B. Cryopreservation of mammalian ova and embryos by vitrification. **Biotechnol. Adv.**, V.12, p.449-465, 1994.

STEPONKUS, P. L., et al. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**, V.345, p.170-172, 1990.

TEDDER, R. S. et al. Hepatitis-b transmission from contaminated cryopreservation tank. **Lancet**, V.346, p.137-140, 1995.

TOMINAG, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. **J. Reprod. Dev.**, V.47, p.267-273, 2001.

VAJTA, G., et al. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. **Cryo letters**, V.18, p.191-195, 1997.

VAJTA, G., et al. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. **Mol. Reprod. Dev.**, V.51, p.53-58, 1998a.

VAJTA, G., et al. Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. **Cryo letters**, V.19, p.389-392, 1998b.

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

VIEIRA, A. D., et al. Cryopreservation of immature oocytes treated with cytochalasin D and vitrified in ops. **Theriogenology**, V.57, p.488, 2002.

WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, V.68, p.251-306, 1980.

WYLLIE, A.H. Apoptosis: an overview, **Brit. Med. Bull.** V.53, p.451-465, 1997.

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

YANG, B. S.; LEIBO, S. P. Viability of in vitro-derived bovine zygotes cryopreserved in microdrops. **Theriogenology**, V.51, p.178, 1999.

ZHOU , J.; SHU, H. B.; JOSHI, H. C. Regulation of tubulin synthesis and cell cycle progression in mammalian cells gamma-tubulin-mediated microtubule nucleation. **J. Cell. Biochem**, V.84, p.472-483, 2002.

ZERON, Y., et al. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, V.38, p.35-42, 1999.

ANEXOS –

RESUMOS APRESENTADOS NA XVIII REUNIÃO ANUAL DA SBTE 2004 – Barra Bonita – SP Acta Scientiae Veterinariae 32(Suplemento) s/p (errata)

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO COM ATMOSFERA NORMAL OU VÁCUO.

(Dados parciais)

Santos, R.M¹.; Barreta, M¹.; Mezzalira, J.C¹.; Paulini, F¹.; Cruz, F.B¹.; Vieira, A.D².; Mezzalira, A¹.

¹Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem – CAV Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Lages SC Brasil E-mail mezzalira@cav.udesc.br

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS – Porto Alegre RS

Para avaliar o efeito do vácuo e da maturação, 203 ovócitos bovinos imaturos e 196 maturados foram vitrificados em nitrogênio líquido com atmosfera normal ou vácuo. Os ovócitos do grupo I (Imaturos/vácuo) e grupo II (Imaturos/atmosfera normal) foram vitrificados logo após a seleção. Já os ovócitos do grupo III (maturados/vácuo) e grupo IV (maturados/atmosfera normal) foram maturados por 22 horas em meio TCM 199 saís de Earle, com 10% de soro de égua em estro (SEE), à 39°C, com 5% de CO₂, quando foram parcialmente desnudados com Hialuronidase (0,5UI/μL de meio) por 2 minutos e vitrificados. Os grupos foram expostos por 30 segundos a uma solução de 400μL de TCM-Hepes com 10% de SEE, 50μL de EG e 50μL de DMSO, e a seguir transferidos para a solução de vitrificação, composta por 300μL de sacarose 0,8M em TCM-Hepes com 20% de SEE, acrescido de 100μL EG e 100μL de DMSO. Foram envasados grupos de 3-4 ovócitos em palhetas estiradas e abertas (OPS). O vácuo foi produzido por 1 minuto de acionamento de uma bomba acoplada a um recipiente de acrílico revestido com isopor, hermeticamente fechado, que continha o nitrogênio líquido. O reaquecimento foi realizado com exposições (5 minutos) à concentrações decrescentes de sacarose (0,30M e 0,15M). Após a maturação, todos os ovócitos foram fecundados com 2 x 10⁶ espermatozoides/mL, selecionados por migração ascendente (Swim-up) em meio Talp-Sperm, sendo incubados com os ovócitos por 18-22 horas, em 400μL de meio Talp-Fert, adicionado de 30μg/mL de heparina. O cultivo foi realizado em meio SOFaaci. A taxa de clivagem (D2) e blastocistos (D8) observada foi 48,0 e 11,1% para o Grupo imaturos/vácuo, 40,0% e 4,8% para o Grupo imaturos/atmosfera normal, 53,0 e 13,2% para o Grupo maturados/vácuo e 39,0 e 8,0% para o Grupo maturados/atmosfera normal. Observou-se taxas mais elevadas de embriões nos grupos que utilizaram a vitrificação em nitrogênio submetido ao vácuo.

Apoio Financeiro: CNPq

VITRIFICATION OF BOVINE OOCYTES IN LIQUID NITROGEN WITH VACUUM OR NORMAL ATMOSPHERE. (Partial results)

Santos, R.M¹.; Barreta, M¹.; Mezzalira, J.C¹.; Paulini, F¹.; Cruz, F.B¹.; Vieira, A.D².; Mezzalira, A¹.

¹Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem – CAV Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC Lages SC Brazil E-mail mezzalira@cav.udesc.br

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS – Porto Alegre RS

To evaluate the effect of the vacuum and maturation status, immature and matured oocytes were randomly allocated to four groups and vitrified in liquid nitrogen with normal or vacuum atmosphere. The immature oocytes of Group I (immature/vacuum) and Group II (immature/normal atmosphere) were vitrified just after selection. The oocytes from Group III (matured/vacuum) and Group IV (matured/normal atmosphere) were submitted to 22 hours maturation in TCM 199 Earle salts medium, with 10% mare estrous serum (SEE), at 39°C, with 5% CO₂ and 95% humidity. Then, they were partially denuded, with use of Hyaluronidase (0,5UI/μL of medium) for 2 minutes and vitrified. All oocytes were exposed for 30 seconds to a solution containing 400μL of TCM-Hepes with 10% SEE, 50μL EG and 50μL DMSO. Just after, they were transferred to a vitrification solution composed by 300μL of sucrose 0,5M in TCM-Hepes with 20% of SEE, added of 100μL EG and 100μL DMSO. Groups of 3-4 oocytes were loaded in open pulled straws (OPS) and vitrified. The vacuum was produced by 1-minute suction of a bomb coupled to an acrylic recipient, covered with Styrofoam, that contained the liquid nitrogen. Rewarming was performed by exposure (5 minutes) to decreasing sucrose concentrations (0.30M and 0.15M). After the maturation, all oocytes were submitted to fertilization with semen selected by swim-up procedure, in TALP-Sperm medium, with 2 x 10⁶ spermatozoa/mL, and the incubation time with oocytes was 18-22 hours, in 400μL of Talp-Fert medium, with 30μg/mL of heparin. The culture was performed in SOFaaci medium, and cleavage and blastocyst rates evaluated. Cleavage and blastocyst rates were 48.0 and 11.1% for immature/vacuum Group, 40.0% and 4.8% for immature/normal atmosphere Group, 53.0 and 13.2% for mature/vacuum Group and 39.0 and 8.0% for mature/normal atmosphere Group. The results demonstrate high rates in groups vitrified in nitrogen submitted to vacuum.

Financial support: CNPq