

Congelação de Ovócitos Desnudos ou Não, Maduros e Imaturos de Bovinos, Utilizando o Etileno Glicol pelo Método Convencional¹

Leticia Martins Fagundes², Eduardo Paulino da Costa³, Ciro Alexandre Alves Torres⁴, Wald'ma Sobrinho Amaral Filha², José Domingos Guimarães⁵

RESUMO - Objetivou-se avaliar os efeitos da criopreservação pelo método convencional em ovócitos imaturos e maturados *in vitro*. Utilizou-se ovócitos provenientes de ovários de vacas abatidas em matadouro, distribuídos em seis tratamentos: ovócitos não-congelados originados de células do *cumulus oophorus* (T₁) e desnudos (T₂) submetidos à MIV, FIV e CIV; ovócitos imaturos, originados de células do *cumulus oophorus* (T₃) e desnudos (T₄), congelados, reidratados, e ovócitos considerados normais, submetidos à MIV, FIV e CIV; ovócitos MIV, providos de células do *cumulus oophorus* (T₅) e desnudos (T₆), congelados, reidratados e submetidos à FIV e CIV. A congelação dos ovócitos foi realizada em soluções contendo 0,6; 1,2 e 1,8 mol L⁻¹ de Etileno Glicol (EG) durante cinco minutos cada etapa. A descongelação foi realizada em banho-maria a 30°C por 20 segundos e, posteriormente, foram reidratados em três etapas (0,9 mol L⁻¹ de EG + 0,3 mol L⁻¹ de sacarose; 0,3 mol L⁻¹ de sacarose, e sem EG e sem sacarose) de seis minutos. A principal alteração ultra-estrutural verificada nos ovócitos maturados *in vitro* e congelados foi a liberação prematura dos grânulos corticais e, tanto nos maturados quanto nos imaturos congelados, verificou-se vacuolização e redução das cristas mitocondriais. A taxa de maturação foi de 82,5; 75,4; 9,2 e 5,8%, para ovócitos do T₁, T₂, T₃ e T₄, respectivamente. As taxas de fecundação foram de 56,2; 0,0; 38,7; 8,6; 63,6 e 16,7% e de clivagem de 36,3; 7,9; 0,4; 0,0; 0,0 e 0,0%, para ovócitos do T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ e T₆, respectivamente. Somente os ovócitos do T₁ apresentaram desenvolvimento para mórulas e blastocistos (34,5%). Estes resultados indicam que as técnicas de congelação adotadas comprometeram a viabilidade do ovócito.

Palavras-chave: bovinos, criopreservação, ovócitos

Freezing of Either Naked or No-Naked, Matured and Immature Oocytes from Cows, Using the Ethylene Glycol by the Conventional Method

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the cryopreservation of *in vitro* mature or immature oocytes by conventional method. The experiment was conducted using oocytes of cows' ovaries from slaughterhouse, distributed into six treatments: unfrozen oocytes with the *cumulus oophorus* cells (T₁) and naked (T₂) which were submitted to the process of MIV, FIV and CIV; immature oocytes, with the *cumulus oophorus* cells (T₃) and naked (T₄), which were submitted to the cryopreservation, unfrozen and the MIV, FIV and CIV; oocytes with the *cumulus oophorus* cells (T₅) and naked (T₆), which were submitted to *in vitro* maturation, cryopreservation, and FIV and CIV. The oocytes were frozen by the conventional methods, dehydrated by the immersion in three solutions with 0.6; 1.2 and 1.8 mol L⁻¹ of Ethylene Glycol (EG) during 5 minutes each phase. The thawing phase was done by the immersion in water-bath at 30°C during 20 seconds, and so, the oocytes were re-hydrated in three phases (0.9 mol L⁻¹ EG + 0.3 mol L⁻¹ of sacarose; 0.3 L⁻¹ of sacarose without EG and sacarose) for six minutes each one. The mainly ultrastructural changes in cryopreserved matured oocytes were prematurely released of cortical granules. However, the frozen immature and mature oocytes showed vacuolization and disappearance of cristae mitochondrial. The frozen immature oocytes showed the maturation rate of 82.5, 75.4, 9.2 and 5.8% for T₁, T₂, T₃ and T₄, respectively. The fecundation rate were 56.2, 0.0, 38.7, 8.6, 63.6 and 16.7% and from the cleavage were 36.3, 7.9, 0.4, 0.0, 0.0 and 0.0% for T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ and T₆, respectively. Morula and blastocyst were observed only for unfrozen and naked oocytes (T₁) (34.5%). These results showed that the frozen protocols affect the viability of the oocytes.

Key Words: bovines, oocytes, cryopreservation

Introdução

A necessidade de animais geneticamente superiores, mais produtivos e de melhor eficiência

reprodutiva faz com que sejam desenvolvidas pesquisas que complementem o emprego de outras biotecnologias reprodutivas. Quanto aos gametas, a congelação de sêmen viabilizou a inseminação artifi-

¹ Apoio financeiro da FAPEMIG.

² Mestre em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. E. mail: leticiamfagundes@ufv.br

³ Professor Adjunto – Universidade Federal de Viçosa. Produtividade de Pesquisa - CNPq. E. mail: epcosta@ufv.br

⁴ Professor Titular – Universidade Federal de Viçosa. E. mail: ctorres@ufv.br

⁵ Professor Adjunto – Universidade Federal de Viçosa. E. mail: jdguima@ufv.br

cial e proporcionou rápido melhoramento genético das espécies domésticas destinadas à produção, especialmente em rebanhos bovinos. Entretanto, a fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embrião têm impacto limitado em razão, principalmente, da dificuldade para se obter número adequado de ovócitos fertilizáveis.

Estudos têm sido realizados visando facilitar o uso do gameta feminino (Arav et al., 1996) e, atualmente, a técnica mais promissora é a criopreservação de ovócitos, desejável por razões biológicas e comerciais (Shaw et al., 2000), considerando-se que o princípio do resfriamento consiste em reduzir a taxa metabólica e permitir a estocagem e transporte do ovócito (Zeron et al., 1999). A disponibilidade de ovócitos viáveis após a criopreservação permitiria maior flexibilidade em experimentos que exigem o uso simultâneo de grande número de gametas (Songsasen et al., 2002), aumentando a viabilidade de materiais para pesquisa básica (Otoi et al., 1997) e para os procedimentos da FIV (Saunders & Parks, 1999), além de permitir o estabelecimento de um banco de ovócitos destinado a preservar os recursos genéticos de espécies em risco de extinção (Lim et al., 1999; Ledda et al. 2001). Entretanto, os resultados obtidos a partir da criopreservação de ovócitos são, geralmente, insatisfatórios quanto à capacidade de maturação *in vitro* (MIV) e FIV (Im et al., 1997) e de clivagem e desenvolvimento embrionário, decorrente das alterações impostas pelo resfriamento (Saunders & Parks, 1999), associadas à falta de repetibilidade de resultados promissores.

Vários esforços têm sido empregados na tentativa de se obter ovócitos de boa qualidade para atender à demanda e proporcionar a realização adequada dos procedimentos anteriormente citados. O primeiro método efetivo de criopreservação de células de mamíferos foi estabelecido há mais de 60 anos e, desde então, considerável progresso tem sido obtido (Shaw et al., 2000). A solução de congelamento é constituída de uma solução-base à qual são adicionados em única etapa ou em etapas sucessivas, 0,3 a 0,4% de suplemento protéico (geralmente a albumina soro bovina fração V -BSA V) e 1 a 4 mol L⁻¹ de agentes crioprotetores (Aller et al., 1996).

Na congelamento pelo método convencional (método lento), o resfriamento ocorre em três etapas de velocidades diferentes: resfriamento inicial, resfriamento lento e resfriamento rápido (Aller et al., 1996), usando-se baixa concentração de crioprotetor

e controlando a formação de cristais de gelo, com o intuito de manter o equilíbrio entre as várias causas de danos celulares (Vajta, 2000). O Etileno Glicol (EG) tem sido usado como crioprotetor preferido para a congelamento pelo método convencional e para a vitrificação, graças ao seu baixo peso molecular, que permite sua rápida penetração nas células, removendo grande parte da água intracelular antes da congelamento, evitando a formação de cristais de gelo e protegendo as organelas celulares dos efeitos deletérios da criopreservação (Miyake et al., 1993). A criopreservação de ovócito pelo método lento fornece bons resultados para espécies que os ovócitos são menos sensíveis à congelamento (camundonga, cadela, coelha e mulheres), mas os resultados ainda são ruins para outras espécies como a porca e a vaca (Ledda et al., 2001).

O estágio de desenvolvimento dos ovócitos no momento da criopreservação tem-se mostrado como fator crítico para a sua sobrevivência após a descongelamento (Park et al., 1997; Sommerfeld & Niemann, 1999; Le Gal & Massip, 1999; Ledda et al., 2001), uma vez que ovócitos imaturos e maturados apresentam, cada um, características que refletem sua organização nuclear e citoplasmática (Fabbri et al., 1998). Em geral, os ovócitos sofrem danos durante o processo de congelamento, em decorrência de seu grande diâmetro e da elevada relação volume/superfície (Asada & Fukui, 2000), características que, associadas à penetração desigual do crioprotetor, podem resultar em danos em parte do ovócito e crioproteção insuficiente em outra. Também os ovócitos não têm sido efetivamente criopreservados, em virtude da sensibilidade da membrana citoplasmática, dos microtúbulos, do citoesqueleto, da zona pelúcida, dos cromossomos, das mitocôndrias e dos grânulos corticais a baixas temperaturas (Park et al., 1997; Zeron et al., 1999; Ledda et al., 2001) sendo que esses efeitos prejudiciais verificados em ovócitos de suínos, de humanos e bovinos (Hyttel et al., 1999; Wu et al., 1999; Isachenko et al., 2001).

Segundo Park et al. (1997) e Ledda et al. (2001), espera-se que ovócitos congelados em estágio de vesícula germinal sejam mais estáveis que os congelados em Metáfase II (MII), visto que aqueles ainda não possuem microtúbulos formados, que evitam as injúrias durante a criopreservação. Entretanto, Arav et al. (1996) e Zeron et al. (1999) afirmam que a membrana celular é o principal local de danos durante a congelamento, de modo que a membrana dos ovócitos em estágio de vesícula germinal é mais sensível que

as dos em MII e, por isso, a criopreservação de ovócitos imaturos pode comprometer o desenvolvimento embrionário (Vajta, 2000).

Quanto aos ovócitos maduros, diversos fatores podem comprometer o desenvolvimento celular, principalmente os danos à zona pelúcida e aos microtúbulos e microfilamentos, a dispersão e o acúmulo dos cromossomos, além da descontinuidade dos filamentos de actina no citoesqueleto (Hyttel et al., 1999; Shaw et al., 2000). Adicionalmente, vários pesquisadores têm encontrado elevada incidência de arranjo cromossômico anormal (Saunders & Parks, 1999), maior frequência de diploidias ao final da maturação (Al Hasani et al., 1987) e exocitose precoce dos grânulos corticais que impede a fecundação ao enrijecer precocemente a zona pelúcida. (Fuku et al., 1995b). Outro fator importante é a duração do tempo de exposição dos ovócitos à solução de congelação e descongelação, que depende da permeabilidade deste crioprotetor sobre a membrana plasmática dos ovócitos (Dhali et al., 2000). Em bovinos, ovócitos MIV têm maior condutividade hidráulica que os imaturos, maturados *in vivo* (Ruffing et al., 1993). Adicionalmente, a presença ou não das células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito resulta, respectivamente, em maior ou menor proteção à zona pelúcida (Camargo, 1995). Entretanto, estas células também podem ser danificadas durante a criopreservação, verificando-se, após a descongelação, desconexão das células do *cumulus oophorus*, ou até mesmo o completo desnudamento dos ovócitos (Cooper et al., 1998).

A MIV de ovócitos frescos de bovinos têm apresentado bons resultados, obtendo-se taxas de 78,0% para desnudados e de 86,0% (Fujimoto et al., 1994), 88,0% (Im et al., 1997), 81,3% (Park et al., 1997) e 76,5% (Saunders & Parks, 1999) para os não desnudados. Contudo, ovócitos submetidos à MIV após congelação e descongelação apresentam taxas de MII bastante inferiores às de ovócitos a fresco. Assim, Fujimoto et al. (1994) observaram que apenas 4,0% dos ovócitos congelados maturaram *in vitro* após descongelação e, segundo Saunders e Parks (1999), poucos ovócitos submetidos à congelação apresentam arranjo cromossômico normal em relação aos não-congelados.

Por estas razões, a fecundação e o desenvolvimento de ovócitos bovinos previamente criopreservados pode ser comprometida pela destruição do sistema de microtúbulos no fuso meiótico

durante resfriamento, uma vez que eles são responsáveis pela migração do pronúcleo de uma região cortical para o centro do ovócito (Saunders & Parks, 1999). Apesar disso, alguns pesquisadores têm obtido resultados satisfatórios com ovócitos criopreservados. Otoi et al. (1995) obtiveram 27,8, 63,4 e 86,6% de fecundação para COC imaturos, COC maduros congelados sem sacarose e ovócitos não-congelados, respectivamente, enquanto Suzuki et al. (1996) obtiveram 33,3% de fecundação para COC congelados imaturos, em 1,8 mol L⁻¹ de EG.

A taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário de ovócitos criopreservados ainda são baixos, mas algumas pesquisas têm apresentado resultados promissores, apesar da baixa repetibilidade. Segundo Saunders & Parks (1999), a liberação de enzimas dos grânulos corticais e o endurecimento prematuro de zona pelúcida podem comprometer a fecundação e reduzir a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário. Lim et al. (1991), utilizando COC maturados e criopreservados pelo método convencional com 1,0 e 1,5 mol L⁻¹ de glicerol, obtiveram taxa de clivagem de 31,1 e 17,8%, respectivamente, resultados bastante inferiores aos obtidos com a fecundação de COC frescos (83,3%). Lim et al. (1999) congelaram COC maduros utilizando 1,0 mol L⁻¹ de glicerol, 1,0 mol L⁻¹ de DMSO e em 1,0 mol L⁻¹ Propilenoglicole obtiveram taxa de clivagem de 51,0; 54,0 e 33,0%, respectivamente.

Estes dados demonstram que a criopreservação de ovócitos bovinos causam alterações irreversíveis em múltiplos componentes citológicos, dificultando a fertilização e clivagem, e, por isso, há necessidade de melhoria nas estratégias para prevenir os danos celulares durante processo de criopreservação. Portanto, uma combinação de fatores – métodos de congelação e descongelação, tipo e concentração do crioprotetor, estágio do ciclo celular e a presença ou não de células do *cumulus oophorus* aderidas ao ovócito – determinam o sucesso da criopreservação do gameta feminino. Desse modo, noções básicas sobre cada um destes fatores contribuem para a obtenção de resultados satisfatórios.

Objetivou-se verificar, por meio da avaliação dos efeitos da criopreservação com o Etileno Glicol (EG) pelo método convencional, se o estágio do ciclo celular (imaturo ou maturado) de ovócitos bovinos e a presença ou não de células do *cumulus oophorus* aderidas aos ovócitos interferem na congelabilidade e subsequente MIV e FIV de ovócitos e na clivagem e desenvolvimento embrionário.

Material e Métodos

Os ovários foram coletados de fêmeas bovinas imediatamente após abate e evisceração, imersos em solução fisiológica (35-38°C) acrescida de 0,05 g/mL de sulfato de estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990), acondicionados em garrafa térmica com esta solução e transportados para o laboratório, onde foram submetidos à aspiração folicular. Foram selecionados os ovócitos que apresentavam células do *cumulus oophorus* compactas (COC), segundo Costa et al. (1997a). O meio base utilizado para manipulação, congelação e descongelação foi o Talp-Hepes acrescido de 0,4% de BSA-V.

Obteve-se 2746 COC imaturos, dos quais foram usados 33 para testar a citotoxicidade do crioprotetor e 42 para avaliar o estágio de ciclo celular imediatamente após a seleção, enquanto os 2671 ovócitos restantes foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: ovócitos com *cumulus oophorus* (COC) e ovócitos dos quais as células do *cumulus oophorus* foram totalmente retiradas (desnudados) segundo Costa et al. (1997b). Posteriormente, foram distribuídos entre os tratamentos: tratamento 1 (COC.F.): 692 COC frescos e tratamento 2 (D.F.): 190 ovócitos desnudados frescos, submetidos aos processos de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), conforme descrito posteriormente; tratamento 3 (COC.C.I.): 582 COC imaturos; e tratamento 4 (D.C.I.): 532 ovócitos desnudados imaturos, criopreservados imediatamente após selecionados e posteriormente descongelados (aqueles considerados normais foram submetidos à MIV, FIV e CIV); tratamento 5 (COC.C.M.): 381 COC; e tratamento 6 (D.C.M.): 294 ovócitos submetidos à MIV por 22 horas, criopreservados e descongelados (aqueles considerados normais foram submetidos ao recultivo em meio de MIV por duas horas seguido de FIV e CIV).

A congelação foi realizada em solução contendo 1,8 mol L⁻¹ de Etileno Glicol (EG) em Talp-Hepes acrescida de 0,4% de BSA-V, pelo método convencional (Otoi et al., 1995) modificado. Os ovócitos foram desidratados por imersão em três soluções (0,6; 1,2 e 1,8 mol L⁻¹ de EG em meio Talp – Hepes) com tempo máximo de permanência de cinco minutos

em cada etapa, à temperatura ambiente. Durante a terceira etapa, os ovócitos foram envasados em palhetas de 0,25 mL, que, após vedadas, foram transferidas ao congelador de células (Biocool™)¹ previamente equilibrado a 0°C. O resfriamento foi iniciado de 0°C até -6°C, com queda programada de temperatura de 1°C/minuto. Ao alcançar -6°C, aguardou-se cinco minutos em equilíbrio, para a indução de cristalização (“seeding”), seguidos de 10 minutos de estabilização a -6°C. Após este período, a temperatura foi reduzida para -32°C a 0,3°C/minuto, sendo as palhetas retiradas do congelador de células e expostas horizontalmente durante cinco segundos ao vapor de nitrogênio, a cerca de dois centímetros do nitrogênio líquido e, posteriormente, imersas e armazenadas a -196°C. A citotoxicidade do EG foi testada por exposição de 33 COC imaturos à solução de desidratação e de reidratação, sem serem submetidos à criopreservação e MIV e posterior avaliação.

Os ovócitos criopreservados foram descongelados em banho-maria a 30°C por 20 segundos e reidratados por meio de imersão em três soluções (0,9 mol L⁻¹ de EG + 0,3 mol L⁻¹ de sacarose; 0,3 mol L⁻¹ de sacarose e meio Talp - Hepes sem EG e sem sacarose), com tempo máximo de permanência de seis minutos em cada etapa, à temperatura ambiente. Após a reidratação, os ovócitos foram lavados duas vezes em meio Talp-Hepes acrescido de 0,4% de BSA-V e, com auxílio de um microscópio estereoscópio, foi obtida a taxa de recuperação e realizada a avaliação morfológica do ovócito, sendo considerados normais aqueles que, após descongelação e reidratação, apresentaram zona pelúcida e membrana plasmática intactas, sem evidência de perda de conteúdo celular e de retração do citoplasma (Park et al., 1997). Os ovócitos considerados morfológicamente normais foram submetidos à MIV, FIV e CIV, de acordo com o tratamento estabelecido previamente.

O meio de maturação foi constituído por TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 10mg/ml de FSH, e os ovócitos foram incubados em estufa² a 38,5°C, com atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade, segundo Costa et al. (1997a). A maturação *in vitro* dos ovócitos foi realizada por 24 horas, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, e por 22 horas, para os tratamentos 5 e 6, em placas de

¹ FTS Systemms Inc., modelo BC-70-4 A.

² Jouan, modelo IG 150.

poliestireno de 35 x 10 mm, contendo 3 mL do meio de maturação. Os ovócitos dos tratamentos T₂ (D.F.), T₃ (COC.C.I.), T₄ (D.C.I.) e T₆ (D.C.M.) foram maturados na presença de células da granulosa em suspensão recém-preparadas, no intuito de suprir a ausência das células do *cumulus oophorus* provenientes do desnudamento (T₂, T₄ e T₆) ou do processo de criopreservação (T₃). Após serem descongelados, os COC.C.M (T₅) e D.C.M. (T₆) foram submetidos ao recultivo por duas horas em meio de maturação para promover aos ovócitos reorganização de organelas antes de serem submetidos ao processo FIV.

Para avaliação da maturação nuclear, os ovócitos foram desnudados, hipotonizados, fixados em lâminas e corados comorceína a 2% (Costa et al., 1997c). Foram classificados de acordo com a configuração dos cromossomos, em estágio de prófase I (PI), metáfase I (MI), anáfase I (AI) ou metáfase II (MII), sendo considerados maturados, em nível nuclear, aqueles que apresentavam configuração cromossômica em MII e o grupo cromossômico pertencente ao primeiro corpúsculo polar. Os ovócitos que não apresentavam configuração característica de algum estágio do ciclo celular foram classificados segundo a presença de resquícios de condensação de cromatina (CC) ou a ausência de configuração cromossômica (SCC).

A fecundação *in vitro* foi realizada utilizando-se sêmen bovino congelado na concentração de 2 x 10⁷ espermatozoides/dose. O meio de manipulação e incubação do sêmen e o de fecundação foram o Sp-T1 e o Fert-Talp, respectivamente, de Parrish et al. (1988), modificados por Costa et al. (1997d). A fecundação foi realizada em placas de poliestireno de 35 x 10 mm, contendo gotas de 100 µL de Fert-Talp, acrescido de 10 mg/mL de heparina, cobertas com óleo mineral. Em cada gota de fecundação, foram colocados, no máximo, 30 ovócitos e 2 x 10⁶ espermatozoides/mL. Doze horas após a inseminação, os ovócitos foram retirados do meio de fecundação e transferidos para a placa escavada contendo o meio de cultivo. As células do *cumulus oophorus* e os espermatozoides residuais foram removidos por meio de repetidas pipetagens. Os ovócitos foram lavados três vezes e, imediatamente submetidos ao CIV.

A taxa de fecundação foi avaliada em pelo menos 30 ovócitos de cada tratamento. Os ovócitos foram desnudados e preparados segundo Costa et al. (1997d).

O co-cultivo dos zigotos foi realizado em placa de poliestireno contendo monocamada de células da

granulosa, durante sete dias, em 3 mL de TCM (Costa, 1994), sendo o meio de cultivo substituído em intervalos de 48 horas após inseminação utilizando-se 1,5 mL de TCM fresco. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a inseminação e taxa de mórulas e de blastocistos foi verificada no sétimo dia de cultivo.

Os dados obtidos para todas as variáveis foram agrupados em tabelas de contingência e analisados pelo teste do qui-quadrado.

A confirmação da maturação citoplasmática, após a MIV, e da fecundação após congelação e reidratação foi realizada em nível ultra-estrutural, segundo Costa et al. (1997a), em 30 ovócitos de cada tratamento. A contrastação foi feita com citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e acetato de uranila (Watson, 1958).

Resultados e Discussão

Os números e percentagens de ovócitos recuperados após descongelação e reidratação são apresentados na Tabela 1. Houve diferença entre ovócitos congelados imaturos, ovócitos congelados envoltos pelas células do *cumulus oophorus* e entre os ovócitos congelados desnudados e congelados maturados (P<0,05).

A taxa de recuperação dos COC congelados maturados (T₅) foi maior que a dos COC congelados imaturos (T₃). Os COC congelados maturados formaram aglomerados, provavelmente como consequência da produção de mucina. Entretanto, os COC congelados imaturos dispersaram e ocuparam toda a área da escavação da placa, ocorrendo maior probabilidade de perdas destes ovócitos devido à manipulação realizada durante a reidratação. Neste experimento, foram recuperados 92,6% dos COC congelados imaturos, resultado superior aos 83% obtidos por Cooper et al. (1998) e semelhantes aos 94,0% e 92,2% encontrados por Schroeder et al. (1990) e Souza et al. (2003), respectivamente. Quanto aos COC congelados maturados, foram recuperados 96,6%, valor semelhante aos 96,0% encontrados por Schroeder et al. (1990). A taxa de recuperação dos ovócitos desnudados foi de 97,5% para os imaturos (T₄) e 93,2% para os maturados *in vitro* (T₆). Considerando os desnudados imaturos, a taxa de recuperação obtida neste estudo foi semelhante à obtida por Bem et al. (1993), que encontraram 94,1% usando o método convencional, e superior à encontrada por Souza et al. (2003), que recuperou 79,0%

Tabela 1 - Número e porcentagem de ovócitos recuperados após descongelamento e reidratação
 Table 1 - Number and percentage of oocytes recovered after frozen-thawed

Tratamento <i>Treatments</i>	Total congelado	Ovócitos recuperados (%)
T ₃ COC.C.I.	582	539 (92,6) ^a
T ₄ D.C.I.	532	519 (97,5) ^b
T ₅ COC.C.M.	381	368 (96,6) ^b
T ₆ D.C.M.	294	274 (93,2) ^a
Total	1.789	1.700 (95,0)

T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudado congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudado congelado maturado.
 T₃: immature cryopreserved COC; T₄: immature cryopreserved desnudes; T₅: cryopreserved in vitro matured COC; T₆: cryopreserved in vitro matured desnudes.

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste do qui-quadrado.

Numbers within column, followed by different letters, are different (P<.05) by chi square.

dos ovócitos usando a vitrificação, o que pode ter provocado danos mais acentuados, impedindo a visualização dos ovócitos. A perda de ovócitos desnudados durante a reidratação é decorrente da lise celular, ocorrendo total perda de citoplasma e permanecendo apenas o resquício da membrana plasmática e da zona pelúcida, o que dificulta sua identificação. Quando ocorre lise dos COC, mesmo que o citoplasma saia do ovócito, as células do *cumulus oophorus* servem como referência para sua identificação. Outra razão é o fato de alguns ovócitos desnudados ficarem fora de foco, boiando na solução de reidratação, sendo identificados somente quando as escavações foram vistórias com a intenção de identificar o número de ovócitos perdidos durante a reidratação.

Os efeitos da congelamento e descongelamento sobre a morfologia dos ovócitos estão na Tabela 2. Os COC congelados maturados apresentaram a maior porcentagem de ovócitos normais após descongelamento e reidratação, resultado similar (P>0,05) ao obtido com os COC congelados imaturos. Houve diferença (P<0,05) na porcentagem de ovócitos morfológicamente normais entre T₃ e T₄ e entre T₃ e T₆. A menor porcentagem de morfologia normal ocorreu nos ovócitos desnudados congelados maturados, seguido pelos desnudados congelados imaturos, sendo encontrada diferença (P<0,05) entre eles.

O percentual de COC congelados imaturos (T₃) com morfologia normal (94,2% - Tabela 2) foi superior aos 69,0; 47,0 e 81,0% encontrados por Schroeder

et al. (1990), Kubota et al. (1998) e Cooper et al. (1998), respectivamente.

A taxa de ovócitos morfológicamente normais (95,9%) obtida com COC congelados maturados foi superior à registrada por Schroeder et al. (1990), Otoi et al. (1997), Fabbri et al. (1998) e Kubota et al. (1998), que encontraram 81,0; 67,4; 54,0 e 72,0%, respectivamente. Segundo Fabbri et al. (1998), a maior taxa de sobrevivência dos COC se deve à maior proteção destes ovócitos contra à toxicidade do crioprotetor.

O método de congelamento e descongelamento, o tipo e concentração do crioprotetor utilizado e as características intrínsecas ao ovócito podem alterar a morfologia normal da célula, o que explica a diferença nas taxas de ovócitos morfológicamente normais, encontradas pelos autores supracitados, uma vez que o método de vitrificação de ovócito bovino utilizado por Souza et al. (2003), tende a causar mais danos estruturais que a congelamento pelo método convencional. Considerando o método convencional, Schroeder et al. (1990) e Cooper et al. (1998), utilizando DMSO para congelar ovócito de camundonga, obtiveram percentuais de ovócitos morfológicamente normais inferiores aos encontrados no presente trabalho, ao passo que Kubota et al. (1998) associaram EG e propanodiol, que pode ter falhado em proteger a célula durante a congelamento de COC de bovinos.

Com relação aos ovócitos congelados imaturos, 3,3% dos COC e 0,8% dos desnudados apresentaram citoplasma retraído ao final da reidratação. A presença das células do *cumulus oophorus* em COC congelados imaturos prejudicou a taxa de desidratação/reidratação em relação aos ovócitos desnudados congelados imaturos. Comparando COC congelados imaturos e COC congelados maturados, o fator diferencial foi o estágio do ciclo celular. Segundo Agca et al. (1997), a permeabilidade dos ovócitos bovinos é maior após a maturação *in vitro*. Com base nesta informação e de acordo com o método utilizado neste experimento, é provável que haja tempo diferencial nas etapas de desidratação e reidratação, considerando-se que a presença ou não das células do *cumulus oophorus* aderidas funcionam como barreira atrasando entrada e a saída de crioprotetores, e o estágio do ciclo celular, que refletirá na permeabilidade da membrana plasmática do ovócito.

Quanto ao total de ovócitos recuperados, foram constatadas fraturas da zona pelúcida apenas em ovócitos do T₃ e T₄ (0,2% e 1,5%, respectivamente) e a perda de conteúdo celular ocorreu em 2,2% dos

Tabela 2 - Viabilidade morfológica dos ovócitos após a descongelação e reidratação
 Table 2 - Morphologic viability of oocytes after frozen-thawed

T	N	Normais		Anormais					
		N	%	Citoplasmaretraído		Fratura de zona pelúcida		Perda de conteúdo celular	
				N	%	N	%	N	%
T ₃	539	508	94,2 ^a	18	3,3	1	0,2	12	2,2
T ₄	519	439	84,6 ^b	04	0,8	8	1,5	68	13,1
T ₅	368	353	95,9 ^a	01	0,3	0	0	14	3,8
T ₆	274	213	77,7 ^c	17	6,2	0	0	44	16,1

T: tratamento; T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado maturado.

T: treatment; T₃: immature cryopreserved COC; T₄: immature cryopreserved desnudes; T₅: cryopreserved in vitro matured COC; T₆: cryopreserved in vitro matured desnudes.

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P<0,05) pelo teste do Qui Quadrado.

Numbers within column, followed by different letters, are different (p<.05) for the Schi Squares.

COC congelados imaturos e 3,8% dos COC congelados maturados, resultados inferiores aos 13,1 e 16,1% obtidos para os desnudados T₄ e T₆, respectivamente, o que confirma os resultados de Camargo (1995), que alega que a presença das células do *cumulus oophorus* seja um fator de proteção à zona pelúcida durante a congelação e descongelação.

Entretanto, apesar da aparência normal observada à microscopia ótica convencional, a análise ultra-estrutural evidenciou alterações em todos os ovócitos avaliados após a descongelação. A principal alteração encontrada nos ovócitos maturados e congelados foi a liberação prematura dos grânulos corticais, afetando a integridade da zona pelúcida, interferindo na fecundação e no desenvolvimento embrionário (Fuku et al., 1995a; Fuku et al., 1995b). Também foram verificadas a vacuolização e a perda de cristas mitocondriais nos ovócitos criopreservados, como verificado por Fuku et al. (1995a), em ovócitos vitrificados imaturos. Ao contrário, os ovócitos não-criopreservados (testemunha) apresentaram os grânulos corticais distribuídos equitativamente nas proximidades da membrana plasmática, conforme reportado por Costa et al. (1997a).

O procedimento de congelação alterou a estrutura das células do *cumulus oophorus*, deixando-as mais frágeis e, por isso, soltaram-se facilmente, visto que o tempo necessário para realizar o desnudamento de ovócitos recém descongelados foi menor se comparado ao de ovócitos frescos, como também foi constatado por Saunders & Parks (1999).

As taxas de ovócitos que alcançaram o estágio de MII nos tratamentos T₁, T₂, T₃ e T₄ estão apresenta-

das na Tabela 3. O índice de ovócitos em MII foi semelhante (P>0,05) entre os COC e os desnudados frescos e entre COC e desnudados congelados imaturos. Os ovócitos congelados imaturos apresentaram menor porcentagem de MII (P<0,05) que os ovócitos frescos. Portanto, a congelação pelo método convencional provocou efeitos deletérios sobre os ovócitos, reduzindo o percentual daqueles que alcançaram a MII, quando comparados com os ovócitos frescos.

Considerando os COC frescos submetidos à MIV, 82,5% culminaram em MII. Esta taxa foi similar àquelas encontradas por Im et al. (1997), Saunders & Parks (1999), que obtiveram 88,0% e 76,0%, respectivamente. A expansão das células do *cumulus oophorus* tem sido usada como critério para classificar um ovócito como maduro (MII). Entretanto, não houve esta correlação neste experimento, onde verificou-se que 82,3% dos ovócitos frescos que não apresentaram expansão das células do *cumulus oophorus* após a MIV estavam em MII. Quanto aos ovócitos desnudados frescos, 75,4% alcançaram o estágio de MII, valor semelhante aos 78,0% obtidos por Im et al. (1997). A escassez de dados na literatura, referentes à MIV de ovócitos frescos previamente desnudados dificulta a melhor comparação de resultados neste tratamento.

Quando os ovócitos foram congelados imaturos, a taxa de MII obtida após o descongelamento e MIV caiu para 9,2% nos COC congelados imaturos e 5,8% nos ovócitos desnudados congelados imaturos. Estes resultados são inferiores aos de Im et al. (1997), que obtiveram 44,0% dos COC e 30,0% dos desnudados

e aos de Kubota et al. (1998), que obtiveram 54,0% de MII para COC de bovinos congelados imaturos. Embora tenha-se obtido baixa taxa de ovócitos anormais à microscopia ótica, após a descongelação/reidratação dos COC e desnudados imaturos (Tabela 2), poucos ovócitos considerados morfológicamente normais alcançaram o estágio de MII (Tabela 3). Este fato evidencia que fatores bioquímicos foram afetados e que os critérios morfológicos podem ser utilizados para pré-seleção, mas não devem ser empregados para determinar a viabilidade dos ovócitos após a criopreservação. Segundo Pickering et al. (1990), a exposição a crioprotetores e a baixa temperatura podem causar despolimerização de microtúbulos, acompanhada por dispersão dos cromossomos da placa metafásica, com risco de aneuploidias para o zigoto. Adicionalmente, Kim et al. (1996) preconizam que tanto a extrusão do corpúsculo polar quanto a organização da cromatina em MII necessitam que a estrutura de microtúbulos e microfilamentos esteja normal e funcional. De fato, neste estudo, poucos ovócitos submetidos à congelamento apresentaram arranjo cromossômico normal em relação aos não-congelados. Ao contrário, nos tratamentos onde os ovócitos não foram congelados, a maioria atingiu o estágio de MII (Tabela 3). Entretanto, poucos ovócitos congelados imaturos maturaram *in vitro*. Foi constatado também que 9,2% dos COC congelados imaturos e 23,1% dos desnudados congelados imaturos apresentaram configuração cromossômica em prófase meiótica (PI). Considerando que a confecção da lâmina foi realizada ao final do período de 24 horas de maturação *in vitro*, pode-se considerar que estes ovócitos ficaram estacionários.

Foi observada incidência de 60,9% de condensação da cromatina (CC) em ovócitos congelados imaturos após 24 horas de MIV, característica geralmente associada a um citoplasma de aspecto vacuolizado. A característica sem configuração cromossômica (SCC) foi atribuída a ovócitos considerados como em estado de degeneração. Também, a ausência de células do *cumulus oophorus* pode ter comprometido eventos celulares normais, o que teria causado a elevada porcentagem de SCC em desnudados frescos, comparados aos COC frescos. Contudo, considerando ovócitos criopreservados, a ausência de cromossomos pode estar diretamente relacionada às alterações morfológicas decorrentes do processo de criopreservação.

A porcentagem de ovócitos fecundados diferiu ($P < 0,05$) entre os ovócitos de T_1 e T_2 , T_1 e T_4 , e T_1 e T_6 (Tabela 4). Os ovócitos desnudados de todos os tratamentos apresentaram as menores porcentagens de fecundação quando comparados aos COC. A taxa de fecundação dos COC frescos foi de 56,2%, resultado inferior aos 73,8 e 70,0% encontrados por Otoi et al. (1997) e Souza et al. (2003), respectivamente. No tratamento 2 (D.F.), não foi identificado nenhum ovócito com indicação de penetração espermática, apesar de ter ocorrido clivagem. Provavelmente, a ausência de células do *cumulus oophorus* pode ter favorecido a penetração espermática mais precoce e, diante disto, no momento da confecção das preparações, já poderia ter ocorrido a singamia.

Segundo Wood et al. (1992), a inibição da fertilização induzida pela congelamento ocorre primariamente na zona pelúcida e a presença de células do *cumulus*

Tabela 3 - Efeito da congelamento pelo método convencional sobre a maturação *in vitro* de ovócitos
Table 3 - Effect of conventional cryopreservation on *in vitro* maturation oocytes

Tratamento Treatment	N	Porcentagem Percentage					
		MI	PI	CC	SCC	AI	MI
T_1 COC.F.	200	82,5 ^a	1,0	14,0	0,0	0,5	2,0
T_2 D.F.	69	75,4 ^a	4,3	4,3	0,0	4,3	11,6
T_3 COC.C.I.	174	9,2 ^b	5,7	3,4	9,2	60,9	11,5
T_4 D.C.I.	156	5,8 ^b	1,3	3,2	23,1	29,5	37,2

T_1 : COC fresco; T_2 : desnudado fresco; T_3 : COC congelado imaturo; T_4 : desnudado congelado imaturo.

T_1 : fresh COC; T_2 : fresh denuded; T_3 : immature cryopreserved COC; T_4 : immature cryopreserved denuded.

MI: metáfase II; AI: anáfase I; MI: metáfase I; PI: prófase; CC: condensação de cromatina; SCC: sem configuração cromossômica.

MI: metaphase II; AI: anaphase I; MI: metaphase I; PI: profase; CC: chromatine cluster; SCC: without chromosome.

Valores com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($P < 0,05$) pelo teste do qui-quadrado.

Numbers within column, followed by different letters, are different ($P < 0,05$) by chi square.

oophorus reduz o grau de endurecimento da zona pelúcida observada em ovócitos maduros após incubação *in vitro*. Se o contrário for verdadeiro, esta pode ser a razão da baixa taxa de fecundação de ovócitos congelados desnudos. Neste estudo, ovócitos dos tratamentos 4 e 6 apresentaram as menores taxas de fecundação (8,6 e 16,7%, respectivamente) entre os congelados. Estes resultados são superiores aos descritos por Souza et al. (2003), que não registrou fecundação ao vitrificar ovócitos desnudos imaturos. Quanto aos COC congelados imaturos, foram obtidos 38,7% de fecundação, valor superior aos 27,8% registrados por Otoi et al. (1995). A taxa de fecundação dos ovócitos COC congelados maturados foi de 63,6%, superior a de 38,6%, relatada por Otoi et al. (1997), mas ligeiramente inferior à verificada por Lim et al (1999), que obtiveram 79,0; 76,0 e 59,0% de fecundação quando criopreservaram COC maduros congelados em 1,0 mol L⁻¹ de DMSO, PROH e Glicerol, respectivamente.

Foi constatado que todos os COC frescos (T₁) e desnudos congelados imaturos (T₄) foram penetrados por um único espermatozóide. Entretanto, os tratamentos T₃, T₅ e T₆ apresentaram poliespermia, cuja ocorrência foi de 25,0%, 23,8% e 100,0%, respectivamente. Considerando ovócitos criopreservados, Saunders & Parks (1999) declaram que o endurecimento prematuro da zona pelúcida pode bloquear parcialmente a fertilização, permitindo a entrada de mais de um espermatozóide.

A taxa de clivagem obtida neste estudo foi de 36,3% para os COC frescos, inferior às de 53,3% e 44,0% obtidas por Saunders & Parks (1999) e Souza et al.

(2003), respectivamente. Apenas 7,9% dos desnudos frescos (T₂) clivaram. Em relação aos clivados, 34,5% dos COC frescos alcançaram o estágio de mórula ou blastocisto, enquanto Souza (2001) obteve 21,4%. Considerando os ovócitos congelados, verificou-se clivagem de apenas 0,4% para COC congelado imaturo (Tabela 4). Valores similares foram registrados por Schellander et al. (1994), que obtiveram 5,5 e 18,0% de clivagem para COC de bovinos congelados imaturos e maturados, respectivamente. Saunders & Parks (1999) e Asada & Fukui (2000) também obtiveram, respectivamente, 7,8 e 16,3% de clivagem de COC de bovinos maturados e congelados pelo método convencional.

Além da falha de fecundação, a não-ocorrência de clivagem e desenvolvimento embrionário pode ser atribuída a outros fatores. Quanto aos ovócitos submetidos à criopreservação, além do comprometimento no citoesqueleto e nas organelas, Lane et al. (2000) alegam que a baixa taxa de clivagem de embriões após a criopreservação é consequência de alterações no metabolismo e de queda na produção de energia decorrentes da reduzida habilidade de regulação do pH intracelular. Além disso, alguns ovócitos não se desenvolvem, independentemente do protocolo, da técnica e das condições adversas (expressão gênica).

Conclusões

Não existe relação entre aparência morfológica do ovócito criopreservado e sua capacidade de maturar *in vitro*, indicando que a avaliação morfológica não pode ser utilizada como critério definitivo.

Tabela 4 - Efeito da congelação pelo método convencional sobre a fecundação *in vitro*, a clivagem e o desenvolvimento embrionário

Table 4 - Effects of cryopreservation on *in vitro* fecundation, cleavage and embryo development

Tratamento <i>Treatment</i>	Fecundados (%) <i>Fecundated (%)</i>	Clivados (%) <i>Cleavage (%)</i>	Mórula (%) <i>Morulae (%)</i>	Blastocistos (%) <i>Blastocysts (%)</i>
T ₁ COC.F.	41/73 (56,2) ^{a, b}	139/383 (36,3)	46/139 (33,1)	2/139 (1,4)
T ₂ D.F.	0/33 (0,0) ^d	5/63 (7,9)	0/5 (0,0)	0/5 (0,0)
T ₃ COC.C.I.	12/31 (38,7) ^b	1/226 (0,4)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)
T ₄ D.C.I.	3/35 (8,6) ^{c, d}	0/169 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)
T ₅ COC.C.M.	21/33 (63,6) ^a	0/188 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)
T ₆ D.C.M.	6/36 (16,7) ^c	0/137 (0,0)	0/0 (0,0)	0/0 (0,0)

T₁: COC fresco; T₂: desnudo fresco; T₃: COC congelado imaturo; T₄: desnudo congelado imaturo; T₅: COC congelado maturado; T₆: desnudo congelado imaturo.

T₁: fresh COC; T₂: fresh denuded; T₃: immature cryopreserved COC; T₄: immature cryopreserved denuded; T₅: matured cryopreserved COC; T₆: matured denuded cryopreserved.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças (P < 0,05) entre os valores, pelo teste do qui-quadrado.

Numbers within column, followed by different letters are different (P < .05) by chi square.

A classificação das anormalidades morfológicas, encontradas após a descongelação e reidratação, mostrou ser um importante subsídio para a correlação com prováveis causas de injúrias, facilitando, assim, o aperfeiçoamento da técnica.

Ovócitos congelados pelo método convencional exibem expansão das células do *cumulus oophorus* sem maturação nuclear dos mesmos, evidenciando que esta característica não é boa indicação morfológica da maturação *in vitro*, como ocorre com os ovócitos frescos.

A presença de células do *cumulus oophorus* não influenciou na taxa de ovócitos que alcançaram o estágio de MII, mas influenciou o desenvolvimento embrionário.

A criopreservação de ovócitos imaturos e maturados de bovinos pelo método convencional, utilizando o Etileno Glicol como crioprotetor, não apresenta resultados satisfatórios.

Agradecimento

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a execução deste experimento.

Literatura Citada

- AGCA, Y.; LIU, J.; PETER, A.T. et al. Cryoprotectant and water permeability of immature and in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.40, p.340, 1997.
- AL HASANI, S.; ALBERIO, R.H.; IOVANNITTI, B. et al. Cryopreservation of human oocytes. **Human Reproduction**, v.2, p.696-700, 1987.
- ALLER, J.F.; ALBERIO, R.H.; LOVANNITTI, B. et al. Criopreservación de embriones mamíferos IIa. Parte. Métodos de congelación de embriones. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.77, n.3, p.228-232, 1996.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S.B. et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, p.589-599, 1996.
- ASADA, M.; FUKUI, Y. Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v.53, p.889-898, 2000.
- BEM, A.R.; FREITAS, V.C.; SOUZA, R.V. et al. Cryopreservation of immature of oocyte bovine using 1,2 propanediol and glycerol as cryoprotector. In: RÉUNION ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 9., 1993, Lyon. **Anais...** Lyon: 1993. p.184.
- CAMARGO, L.S.A. **Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos com 1,2 Propanodiol**. Itaguaí: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995. 62p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.
- COSTA, E.P.; NOGUEIRA, J.C.; CAMARGOS, E.R.S. et al. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. II. Aspectos ultra-estruturais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.561-574, 1997a.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. Técnica simplificada para o desnudamento rápido de ovócitos de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.4, p.425-432, 1997b.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. Técnica para a avaliação do estágio de maturação nuclear de ovócitos bovinos cultivados *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.4, p.433-440, 1997c.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C. et al. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. III. Efeito na capacidade de desenvolvimento após a fecundação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.575-586, 1997d.
- COOPER, A.; PAYNTER, S.J.; FULLER, B.J. et al. Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation *in vitro* in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.971-978, 1998.
- DHALI, A.; MANIK, R.S.; DAS, S.K.; SINGLA, S.K. et al. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.159-165, 2000.
- FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T. et al. Oocyte cryopreservation. **Human Reproduction**, v.13, p.98-108, 1998.
- FUJIMOTO, T.; CHOI, Y.H.; BRAUN, J. et al. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. **Theriogenology**, v.42, p.1085-1094, 1994.
- FUKU, E.; LIU, J.; DOWNEY, B.R. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Molecular Reproduction Development**, v.40, p.177-185, 1995a.
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995b.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; AVERY, B. et al. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. **Reproduction Domestic Animal**, v.34, p.247-254, 1999.
- ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; MICHELMANN, H.W. et al. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, v.30, p.333-338, 2001.
- IM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.881-891, 1997.
- KIM, N.H.; FUNAHASHI, H.; PRATHER, R.S. Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.248-255, 1996.
- KUBOTA, C.; YANG, X.; DINNYES, A. et al. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.281-286, 1998.
- LANE, M.; LYONS, E.A.; BAVISTER, H.D. Cryopreservation reduces the ability of hamster 2-cell embryos to regulate intracellular pH. **Human Reproduction**, v.15, n.2, p.389-394, 2000.
- 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.

- LEDDA, S.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v.55, p.1359-1371, 2001.
- 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, n.6, p.1225-1235, 1991.
- LIM, J.M.; KO, J.J.; HWANG, W.S. et al. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.51, p.1303-1310, 1999.
- MIYAKE, T.; KASAI, M.; ZHU, S. E. et al. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in a ethylene glycol based solution by a simple method. **Theriogenology**, v.40, p.121-134, 1993.
- OHGODA, O.; NIWA, K.; YUHARA, M. et al. Variations in penetration rates *in vitro* of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. **Theriogenology**, v.29, p.1375-1381, 1988.
- OTOI T.; YAMAMOTO K.; KOYAMA N. et al. In fertilization and development of immature bovine oocytes cryopreserved by Ethylene Glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N. et al. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. **Cryobiology**, v.34, p.36-41, 1997.
- PARK, S. E.; LEE, A.; SON, W. Y. et al. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. **Fertility and Sterility**, v.68, n.5, p.920-926, 1997.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH J.L.; WINER M. A. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1180, 1988.
- PICKERING, S.J.; CANT, A.; BRAUDE, P.R. et al. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption on the meiotic spindle in the human oocyte. **Fertility and Sterility**, v.54, n.1, p.102-108, 1990.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electronmicroscopy. **Journal Cell Biology**, v.17, p.208-213, 1963.
- RUFFING, R.A.; STEPONKUS, P.L.; PITT, R.E. et al. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology**, v.30, p.562-580, 1993.
- SAUNDERS, M.K. ; PARKS, J.E. Effects of Cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.61, p.178-187, 1999.
- SCHELLANDER, K.; PELI, J.; SCHMOLL, F. et al. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.909-918, 1994.
- SCHROEDER, A.C.; CHAMPLIN, A.K.; MOBRAATEN, L.E. et al. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. **Journal Reproduction and Fertility**, v.89, p.43-50, 1990
- SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.43, p.777-783, 1990.
- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene Glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.
- SONGSASEN, N.; YU, J.; RATTERREE, S.M. et al. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. **Fertility and Sterility**, v.77, n.4, p 818-825, 2002.
- SOUZA, M.R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos utilizando etilenoglicol associado à trehalose e polivinilpirrolidona. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p.580-587, 2003.
- SUZUKI, T.; BOEDIONO, A.; TAKAGI, M. et al. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. **Cryobiology**, v.33, p.515-524, 1996.
- VAJTA, G. Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v.28, n.1, p.85-94, 2000. (Supl.)
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical and Biochemical Cytology**, v.4, n.4, p.475-478, 1958.
- WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G.; LEE, S.H. fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due to premature cortical granule release. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1187-1195, 1992.
- WU, B.; IGNOTZ, G.; CURRIE, W.B. Effects of cooling germinal vesicle-stage bovine oocytes on meiotic spindle formation following *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.54, p.388-395, 1999.
- ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A. et al. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.35-42, 1999.

Recebido em: 03/10/02

Aceito em: 05/04/04