



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA
MEIOSE PELO MÉTODO DE *CRYOTOP*: AVALIAÇÃO DE DANOS
MORFOLÓGICOS, FUNCIONAIS E MOLECULARES**

JOSÉ FELIPE WARMLING SPRÍCIGO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2011



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA
MEIOSE PELO MÉTODO DE *CRYOTOP*: AVALIAÇÃO DE DANOS
MORFOLÓGICOS, FUNCIONAIS E MOLECULARES**

José Felipe Warmling Sprícigo

Orientadora: Margot Alves Nunes Dode

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

PUBLICAÇÃO 53/2011

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2011

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SPRÍCIGO J. F. W. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo método de *cryotop*: avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 70p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SPRÍCIGO, José Felipe Warmling. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo método de *cryotop*: avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 70p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1. vitrificação. 2. *cryotop*. 3. ovócitos. 4. bovino.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA
MEIOSE PELO MÉTODO DE *CRYOTOP*: AVALIAÇÃO DE DANOS
MORFOLÓGICOS, FUNCIONAIS E MOLECULARES**

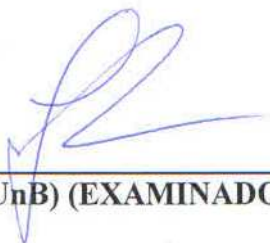
JOSÉ FELIPE WARMLING SPRÍCIGO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

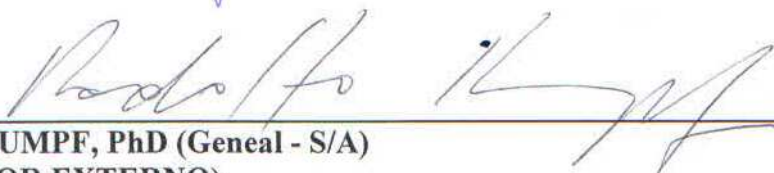
APROVADA POR:



**MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA)
(ORIENTADOR)**



IVO PIVATO, Doutorado (UnB) (EXAMINADOR INTERNO)



**RODOLFO RUMPF, PhD (Gençal - S/A)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 16 de Dezembro de 2011.

Aos meus pais, Duílio e Sílvia, ao meu melhor irmão Olímpio e a toda minha família. Dedico a vocês esse trabalho, pois, apesar da distância física entre nós, vocês são meus maiores mestres, e eu os amo muito. A minha felicidade é um reflexo da vossa.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Sílvia, meu pai Duílio, meu irmão Olímpio e a toda minha família, pelo carinho, amor, apoio e por sempre me orientarem a fazer boas escolhas.

À Dra. Margot, por ter sido uma ótima orientadora, pela paciência, dedicação e preocupação empregada para a realização do projeto e pelos bons conselhos em momentos de dúvidas profissionais.

Ao Dr. Rodolfo Rumpf, por ter me acolhido como aluno, pelas sugestões e possibilidades para a realização do projeto, pelo incentivo profissional e por ter aceitado participar da banca.

Ao Dr. Ivo Pivato, por todo o seu conhecimento, transmitido de forma ímpar, também por ter aceitado participar da banca e por ser um grande amigo.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco, pelo incentivo à pesquisa e pelas oportunidades de aprendizado.

Ao Dr. Ricardo Alamino Figueiredo, Dr. Eduardo de Oliveira Melo, Dra. Bianca Damiani Marques Silva e Dra. Carolina Madeira Lucci, excelentes pesquisadores e professores, com os quais tive o privilégio de conviver.

Aos técnicos José Urias Câmara e Regivaldo Vieira de Souza, pela paciência e por sempre estarem disponíveis para ensinar.

À Eleonora, Oscar, Heitor, Andrei, Ângelo, Rafael K., Tiago D., Emivaldo, Luís Fernando e a todos os alunos graduandos, mestrandos e doutorandos que convivi, agradeço pela amizade, companheirismo, comemorações e por todo o aprendizado durante esse tempo.

À Alice, Grazielle e Karollyne, pela amizade e pela grandiosa ajuda para a realização de meus experimentos.

Aos amigos de laboratório, Ana Luíza, José Carvalho, Isabela, Juliana, Pablo, Sidney, Anelise, Rosana, Thiago, Washington, pelo convívio e por terem sido de uma maneira ou de outra, fundamentais para a realização do projeto.

Aos funcionários da EMBRAPA, “Rambinho”, “Zequinha”, “Arlindo”, “Teco”, “Zefa”, “Lia”, “Mara” e todos os outros que foram muito importantes para mim, não só pelo auxílio para a realização do projeto, mas pela amizade.

À empresa Geneal e a todos seus funcionários, pelas oportunidades e aprendizado.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, CNPq e CAPES pelo suporte e pela bolsa concedida.

Ao programa de Pós Graduação em Ciências Animais (UnB).

À Universidade de Brasília pelo curso oferecido.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xvi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Objetivo Geral	04
1.2 Objetivos Específicos	04
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Maturação Ovocitária	05
2.2 Criopreservação Ovocitária	08
2.2.1 Crioprotetores	11
2.2.2 Métodos de vitrificação	13
2.3 Metodologias para Avaliação de Ovócitos Vitrificados	16
2.3.1 Análise da expressão gênica	18
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	22
CAPÍTULO 2	33
1 RESUMO	34
2 ABSTRACT	36
3 INTRODUÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Delineamento Experimental	40
4.1.1 Experimento 1: Avaliação da maturação nuclear em ovócitos submetidos à vitrificação em diferentes estágios da meiose	40
4.1.2 Experimento 2: Avaliação da fecundação e desenvolvimento embrionário em ovócitos submetidos à vitrificação, em diferentes estágios da meiose	41

4.1.3 Experimento 3. Efeito da vitrificação em diferentes momentos da maturação sobre o padrão de expressão gênica em ovócitos bovinos.	42
4.2 Obtenção dos Ovócitos	43
4.3 Vitrificação e Desvitrificação	43
4.4 Maturação In Vitro	45
4.5 Avaliação da Maturação Nuclear	46
4.6 Seleção Espermática e Fecundação In Vitro	47
4.7 Cultivo In Vitro	47
4.8 Avaliação das Taxas de Fecundação	48
4.9 Armazenamento dos Ovócitos para Análise de Expressão Gênica	49
4.10 Extração de RNA e Transcrição Reversa	49
4.11 Quantificação da expressão de genes por PCR em Tempo Real (qPCR)	50
4.12 Análise Estatística	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Resultados	53
5.1.1 Experimento 1 – Avaliação das taxas de maturação nuclear, em ovócitos submetidos à vitrificação em diferentes estágios da meiose	53
5.1.2 Experimento 2 - Avaliação da taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário, em ovócitos submetidos à vitrificação, em momentos distintos durante a MIV.	54
5.1.3 Experimento 3 - Efeito da vitrificação sobre o padrão de expressão gênica, em ovócitos bovinos	56
5.2 Discussão	59
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA MEIOSE PELO MÉTODO DE *CRYOTOP*: AVALIAÇÃO DE DANOS MORFOLÓGICOS, FUNCIONAIS E MOLECULARES

José Felipe Warmling Sprícigo¹, Margot Alves Nunes Dode^{1,2}.

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A vitrificação com *cryotop* surgiu como uma opção promissora para a criopreservação de ovócitos, por minimizar efeitos negativos e melhorar as taxas de sobrevivência. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitrificação em diferentes momentos da maturação in vitro (MIV), quanto às características morfológicas, funcionais e moleculares, em ovócitos bovinos. Foram utilizados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) obtidos de ovários de abatedouro. Para os experimentos 1 e 2, os ovócitos foram distribuídos em 4 grupos: controle (GC), não vitrificado; 0 hora vitrificado (V0); 8 horas vitrificado (V8) e 22 horas vitrificado (V22). Todos os grupos vitrificados foram desvitrificados e retornaram para a MIV até completar 24 horas. Para a avaliação da cromatina, CCOs foram desnudados, fixados e corados com lacmóide. Para a taxa de fecundação, ovócitos foram submetidos à fecundação in vitro (FIV), e após 18 horas de co-cultivo com os espermatozóides foram fixados e corados com lacmóide. O desenvolvimento embrionário foi avaliado, pelas taxas de clivagem e blastocistos em D2, D7 e D8, após a inseminação (pi). Para análise estatística foi empregado o

teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). Quanto ao experimento 3, primeiramente foi quantificada a expressão de genes ligados à apoptose (Caspase-3 e P-53) e ao controle epigenético (HDAC 2, Dnmt-1 e SUV39H1) em ovócitos maturados *in vitro* por : 0 (GC0), 8 (GC 8), 22 (GC22) e 24 horas (GC24). Posteriormente, foi avaliado o efeito da vitrificação em diferentes momentos da MIV (0, 8 e 22 horas) na expressão desses mesmos genes. Para isso ovócitos de todos os grupos vitrificados e do controle foram coletados às 24 horas de MIV. A avaliação da expressão gênica, foi realizada por qPCR e os dados analisados por ANOVA one-way, ($P < 0,05$). A capacidade do ovócito de atingir MII, após a maturação, clivar e se desenvolver até blastocisto foi superior no grupo controle ($P < 0,05$) comparado aos grupos vitrificados, não havendo diferenças significativas entre estes ($P > 0,05$). Já a taxa de fecundação, apesar de ser superior no grupo controle ($P < 0,05$) o grupo V0 apresentou a menor porcentagem de ovócitos fecundados e maior de ovócitos degenerados ($P < 0,05$), comparado aos demais grupos. Quanto ao perfil de expressão gênica em ovócitos durante a MIV, foi observado que os níveis de transcritos do gene Caspase-3 estavam aumentados ($P < 0,05$), nos grupos GC22 e GC24, comparados à GC0 e GC8, também foi observado um aumento ($P < 0,05$) da expressão do gene Dnmt-1, nos grupos GC8, GC22 e GC24 comparados ao GC0. Entretanto, não foi observada alteração na abundância dos transcritos em nenhum dos grupos submetidos à vitrificação ($P > 0,05$), comparados ao CG24. Conclui-se que, apesar dos baixos resultados, a vitrificação pode ser empregada para a conservação de ovócitos bovinos, independente do momento da MIV. Os níveis de transcritos avaliados não foram alterados em resposta à vitrificação. Entretanto, foi constatado um aumento na expressão da Caspase-3 e Dnmt-1, durante a MIV.

Palavras chaves: Vitrificação, *cryotop*, ovócitos, bovino.

ABSTRACT**VITRIFICATION OF BOVINE OOCYTES AT DIFFERENT MEIOTIC STAGES
USING *CRYOTOP* METHOD: ASSESSMENT OF MORPHOLOGICAL,
MOLECULAR AND FUNCTIONAL DAMAGES**

José Felipe Warmling Sprícigo¹, Margot Alves Nunes Dode^{1,2}.

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and
Biotechnology

Vitrification by cryotop method has emerged as a promising option for oocytes cryopreservation, by minimizing negative effects and improving survival rates. The aim of this research was to evaluate the effect of vitrification at different times point during in vitro maturation (IVM) on functional, morphological and molecular characteristics of bovine oocytes. For all the experiments cumulus-oocytes-complexes (COCs) were obtained from slaughterhouse ovaries. In first and second experiments, oocytes were distributed into 4 groups: control non-vitrified(CG); 0 hour vitrified (V0); 8 hours vitrified (V8) and 22 hours vitrified (V22). In all groups oocytes were vitrified and warmed, and then returned to incubator until 24 hours of IVM. For chromatin evaluation, COCs were denuded, fixed and stained with lacmoid. To evaluate fertilization rates, oocytes, were fixed and stained with lacmoid 18 hours after in vitro insemination (pi). Embryonic development was accessed by cleavage and blastocyst rates at D2, D7 and D8 (pi.). Data were analyzed by Chi-square test ($P < 0.05$). A third experiment was designed to evaluated mRNA expression of apoptosis

(Caspase-3 and P-53) and epigenetic control related genes (HDAC 2, SUV39H1 and Dnmt-1). First gene expression was quantified at different time points during oocyte IVM: 0 (CG0), 8 (CG 8), 22 (CG22) and 24 hours (CG24). Then, the effect of vitrification at different moments of IVM (0, 8 and 22 hours) on genes expression was studied. Gene expression was performed by qPCR and data were analyzed by one-way ANOVA ($P < 0.05$). The ability of the oocyte to reach MII after maturation, to cleave and to develop to blastocyst was higher in CG ($P < 0.05$), compared to vitrified groups, which did not differ among them ($P > 0.05$). For fertilization rates, CG also presented superior results compared to all vitrified groups ($P < 0.05$). However, when vitrified groups were compared, V0 had the lowest rate of fertilized oocytes and higher rate degenerated oocytes than the other groups ($P < 0.05$). Gene expression profile in oocytes during IVM, showed that mRNA levels of Caspase-3 were increased ($P < 0.05$) in both CG22 and CG24 compared to CG0 and CG8. An increase in Dnmt-1 gene expression was also observed ($P < 0.05$) in CG8, CG22 and CG24 compared to CG0. No difference in mRNA relative abundance was observed in any of the vitrified group ($P > 0.05$), compared to CG24. In conclusion, despite the poor results, vitrification can be used to preserve bovine oocytes, regardless to IVM time. Transcript levels of the studied genes were not affected by vitrification procedure. However, an increase in mRNA levels of Caspase-3 and Dnmt-1 genes was observed during IVM, suggesting transcription processes during this period.

Keywords: Vitrification, Cryotop, Bovine, Oocyte

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
 Capítulo 2	
Figura 2.1.	41
<p>Esquema representativo dos grupos de ovócitos utilizados nos experimentos 1, 2 e 3: Vit 0 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após seleção); Vit 8 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após 8 horas de MIV); Vit 22 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após 22 horas de MIV) e GC 24 (grupo controle, ovócitos não vitrificados). Ovócitos de todos os grupos completaram 24 horas de MIV.</p>	
Figura 2.2.	42
<p>Esquema representativo dos grupos de ovócitos para avaliação do perfil de expressão gênica durante a maturação no experimento 3: GC 0 (grupo de ovócitos após seleção); GC 8 (grupo de ovócitos após 8 horas de MIV); GC 22 (grupo de ovócitos após 22 horas de MIV) e GC 24 (grupo de ovócitos após 24 horas de MIV). Ovócitos de cada grupo foram avaliados em diferentes momentos da MIV.</p>	
Figura 2.3.	45
<p>Hastes de polipropileno (A), equipamento com compartimentos contendo nitrogênio (B e C) (Ingá-med[®]), utilizados para a vitrificação de ovócitos, pelo método de <i>cryotop</i>.</p>	
Figura 2.4.	46
<p>Ovócito em VG (A); Ovócito MII (B); Ovócitos com cromatina anormal (C); Ovócitos com cromatina degenerada (D). As setas indicam a cromatina em cada imagem.</p>	
Figura 2.5.	48
<p>Ovócitos fecundados: fecundação normal, presença de dois pró-núcleos (A); fecundação polispérmica, presença de três pró-núcleos e de uma cabeça de espermatozoide solta (B). Setas e asterisco indicam os pró-núcleos e a cabeça do espermatozoide, respectivamente.</p>	

- Figura 2.6. Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E alvo é a eficiência do gene alvo; E ref é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; ΔCP alvo é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo; ΔCP ref é desvio de CP do controle – amostra do gene referência. 51
- Figura 2.7. Nível de transcritos dos genes DNMT1, HDAC 2, SUV39H1, Caspase-3 e P-53, analisados por PCR em Tempo Real, em ovócitos obtidos em diferentes momentos durante a maturação *in vitro* (0 hora, 8 horas, 22 horas e 24 horas). Os dados (média \pm EP) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. ^{a,b}Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$). 57
- Figura 2.8. Nível de transcritos dos genes DNMT1, HDAC 2, SUV39H1, Caspase-3 e P-53, analisados por PCR em Tempo Real, em ovócitos obtidos em diferentes momentos durante a maturação *in vitro* (0 hora, 8 horas, 22 horas e 24 horas). Os dados (média \pm EP) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 2.1.	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (PB), SYBER, temperatura de anelamento (TA) e concentração de primer (nM)	51
Tabela 2.2.	Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro	54
Tabela 2.3.	Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro	55
Tabela 2.4.	Taxa de fecundação de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- µm** – Micrômetro
- µg**– Micrograma
- CCO**- Complexo cumulus ovócito
- Caspase 3** – Cysteine Aspartic Specific Acid Protease
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- DNMT1** – DNA metiltransferase 1
- DNMT3A** – DNA metiltransferase 3A
- DMSO**- Dimetil sulfóxido
- DV1**- Solução de desvitrificação 1
- DV2**- Solução de desvitrificação 2
- EG**- Etileno Glicol
- FIV**- Fecundação in vitro
- FSH** – Hormônio folículo estimulante
- GC**- Grupo controle
- GVBD**- Rompimento da vesícula germinativa
- GLY**- Glicerol
- HAT1** – Histona acetiltransferase 1
- HDAC2** – Histona deacetilase 2
- K9** – Lisina 9
- LH** – Hormônio luteinizante
- M**- Molar
- MI** – Metáfase I
- MII** – Metáfase II
- MIV**- Maturação in vitro
- mm**- milímetro
- ml**- mililitro
- RNA_m** – RNA mensageiro
- N₂L** – Nitrogênio líquido
- PBS** – Solução salina em tampão fosfato
- PIV** – Produção in vitro
- P-53**- Gene supressor tumoral *p53*

RNA- Ácido ribonucleico

SFB – Soro fetal bovino

SM- Solução de manutenção

SUV39H1 – Histona metiltransferase *supressor of variegation 3-9 homologue1*

SV1- Solução de vitrificação 1

SV2- Solução de vitrificação 2

TCM – *Tissue culture medium*

TE- Transferência de Embriões

VG – Vesícula Germinativa

VGBD – Quebra da vesícula germinativa

ZP – Zona Pelúcida

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O uso das técnicas de reprodução assistida se tornou uma prática comum em programas de melhoramento genético para disseminar, de uma maneira rápida e eficiente animais geneticamente superiores que expressam características econômicas importantes. Entre essas técnicas a produção *in vitro* de embriões (PIVE), surgiu como uma opção interessante para a multiplicação animal, não só pelo seu potencial de aumentar consideravelmente o número de produtos/vaca/ano, mas também por abrir a possibilidade de utilizar várias categorias animais, como bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis.

No Brasil a utilização comercial da PIVE aumentou consideravelmente na última década devido principalmente às características do rebanho constituído predominantemente por animais *Bos taurus indicus*, da raça Nelore. Tanto que o país hoje se tornou o maior produtor de embriões *in vitro* sendo responsável por 86% da produção mundial (Viana et al., 2009).

Um dos grandes entraves na utilização da PIVE é a necessidade de manter um grande número de receptoras o que eleva muito os custos da tecnologia. Essa limitação advém, principalmente, da inexistência de um método eficiente para a criopreservação de ovócitos a serem utilizados.

Após coletado o ovócito conserva sua eficiência por um período limitado se não for exposto a um ambiente controlado. A possibilidade de criopreservação do ovócito tornaria o processo mais flexível e acessível, podendo preservar o gameta feminino para ser utilizado em momento e condições mais oportunos.

Além do impacto no setor produtivo, a possibilidade de criopreservação de ovócitos é fundamental para a formação de bancos de material genético e

comercialização de material biológico. Essa tecnologia é indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção. Para que essas possam ser trabalhadas e regeneradas, é fundamental que sejam recuperáveis não somente os espermatozoides, mas também os ovócitos. A diversidade genética e as características que compõem uma espécie, só seriam plenamente reconstituídas com a contribuição tanto da fêmea quanto do macho.

Pesquisas com a criopreservação de ovócitos são importantes também para a saúde humana, principalmente para meninas e mulheres com perda prematura da função ovariana, como por exemplo, devido a processos malignos e/ou tratamentos de quimioterapia ou radioterapia (Boiso et al., 2002; Kim et al., 2007).

No patamar em que se encontra hoje o uso das biotecnologias de reprodução, o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de ovócitos seria talvez a mais importante conquista para otimizar a utilização de técnicas de reprodução assistida em animais domésticos e humanos.

Apesar de inúmeros estudos nesta área, a taxa de sobrevivência de ovócitos criopreservados ainda é extremamente baixa, indicando a necessidade de otimização dos protocolos (Brandão, 2002; Vieira et al., 2002; Men et al., 2005; Horvath & Seidel, 2006; Morato et al., 2008a; Morato et al., 2008b; Anchamparuthy et al., 2009; Yang et al., 2010).

Dentre os procedimentos de criopreservação, a vitrificação tem se mostrado como a opção mais viável para a conservação de ovócitos de mamíferos (Smith et al., 2010). Esse método baseia-se no processo pelo qual uma solução viscosa se solidifica durante o resfriamento, sem a formação de cristais de gelo (Vajta & Kuwayama, 2006). A vitrificação apesar de já ter sido utilizada em embriologia nos mamíferos desde 1985 (Rall & Fahy, 1985), obteve um avanço significativo quando se aumentou consideravelmente a taxa de resfriamento e aquecimento pela redução no volume da solução de vitrificação. Apesar desses avanços, a viabilidade de ovócitos após a vitrificação ainda continua insatisfatória.

A diminuição da viabilidade ovocitária originada pela criopreservação é observada principalmente na redução do desenvolvimento embrionário. As taxas de produção de blastocistos giram em torno dos 5% (Vieira et al., 2002; Men et al., 2005; Kim et al., 2007; Morato et al., 2008a; Morato et al., 2008b; Anchamparuthy et al., 2009; Sripunya et al., 2010) a partir de ovócitos vitrificados, submetidos à fecundação e cultivo *in vitro*. Estes resultados apesar de parecerem irrisórios apontam o potencial

desse método, para a criopreservação de ovócitos bovinos. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar quais as estruturas mais afetadas e qual o melhor estágio durante a maturação ovocitária para a utilização dessa técnica. Com base nessas informações, será possível propor alterações nos protocolos já existentes e com isso melhorar a resposta dos ovócitos viabilizando a sua utilização nas técnicas de reprodução assistida.

1.1 Objetivo Geral

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da vitrificação por *cryotop* em diferentes estágios da meiose na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos bovinos.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a taxa de maturação nuclear de ovócitos vitrificados nos estágios de vesícula germinativa (VG), na fase de rompimento da vesícula germinativa (GVBD) e em metáfase II (MII).
- b) Determinar a taxa de fecundação em ovócitos submetidos à FIV após a vitrificação nos estágios de VG, GVBD e MII.
- c) Avaliar o desenvolvimento embrionário in vitro de ovócitos vitrificados em VG, GVBD, MII.
- d) Avaliar a expressão de genes relacionados a apoptose (CASPASE-3 e P-53), e ao controle epigenético (DNMT1, HDAC e SUV) em ovócitos vitrificados nos estágios de VG, GVBD e MII.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Maturação Ovocitária

A ovogênese é o processo de desenvolvimento do gameta feminino e é iniciado ainda durante a vida fetal. As células germinativas primordiais são originadas do endoderma e, migram para as cristas genitais para colonizar as futuras gônadas. Durante esta fase de migração e colonização ocorrem intensas divisões mitóticas, necessárias para a formação dos “estoques” de ovócitos. Após a chegada às gônadas em formação essas células param de se dividir mitoticamente e iniciam a divisão meiótica (Van Den Hurk & Zhao, 2005).

Em bovinos o processo de divisão meiótica começa aos 75-80 dias de vida fetal, porém, o ciclo celular é interrompido na fase de prófase I (VG), no estágio de diplóteno. Os ovócitos ficam quiescentes até a fase púbere, quando um pouco antes da ovulação sob o estímulo do hormônio luteinizante (LH), retomam a meiose e o ciclo celular progride de prófase I para metáfase II. In vitro essa retomada da meiose é estimulada pela simples remoção do ovócito do ambiente folicular (Sirard et al., 2006).

O processo de retomada da meiose, in vivo é acompanhado por alterações nucleares e citoplasmáticas chamadas de maturação ovocitária, que compreende os eventos necessários para que o ovócito seja capaz de ser fecundado e de suportar a formação de um novo indivíduo. (Sirard et al., 2006; Farin et al., 2007).

A maturação nuclear dura aproximadamente 24 horas na vaca e envolve o rompimento do envoltório nuclear e progressão da meiose (Luciano et al., 2009) para

metáfase I, anáfase I e telófase I com expulsão do primeiro corpúsculo polar, e finalmente atingindo metáfase II (Cha & Chian, 1998).

Já a maturação citoplasmática envolve uma série de eventos bioquímicos que permitem ao ovócito expressar seu potencial de desenvolvimento. Durante este período são observadas alterações como a reorganização de organelas, migração de mitocôndrias para uma região mais central, modificações nos complexos de golgi e migração de grânulos corticais para região mais periférica (Humblot et al., 2005; Sirard et al., 2006). Durante a maturação citoplasmática ocorre também uma série de mudanças e reestruturações de proteínas responsáveis pelo trânsito de organelas e cromossomos. Essas proteínas são a base do citoesqueleto celular, constituído por microtúbulos e micro filamentos, originados a partir de tubulina e actina, respectivamente (Boiso et al., 2002; Luciano et al., 2009). Falhas nos mecanismos responsáveis pela organização destas proteínas podem induzir a má formação da placa metafásica ou mesmo levar a polispermia (Asgari et al., 2011). Ainda com relação à maturação citoplasmática, durante a fase de crescimento ovocitário é de extrema importância que ocorra a transcrição, armazenamento e até a tradução de vários grupos de mRNAs e proteínas. Esses estoques servirão de suporte durante a maturação e primeiras divisões mitóticas do embrião até a ativação de genoma embrionário (Chohan & Hunter, 2003; Racedo et al., 2008), que no bovino ocorre por volta de oito a dezesseis células.

Outro evento que ocorre durante o processo de maturação, é a produção de ácido hialurônico pelas células do cumulus, resultando na produção de uma matriz gelatinosa que se deposita entre as células causando a expansão destas células e o rompimento das junções *gap* (Tharasanit et al., 2006; Zhou et al., 2010). É importante ressaltar que os ovócitos imaturos são metabolicamente ligados às células do cumulus através dessas junções, formando os complexos-cumulus-ovócitos (Van Den Hurk & Zhao, 2005). A ligação entre as células somáticas e o ovócito, pelo menos nas primeiras 6-8 horas de maturação, é vital para que o ovócito expresse sua competência e que tenha desenvolvimento embrionário subsequente (Gilchrist et al., 2004; Sutton-Mcdowall et al., 2004; Atef et al., 2005). O rompimento destas junções significa o fim da comunicação bidirecional dos ovócitos com estas células, necessário para progressão do ovócito pela meiose.

O principal mecanismo molecular de controle do ciclo celular meiótico e mitótico baseia-se na regulação e ativação do fator promotor da maturação (MPF).

Além da correlação com outros fatores, como adenosina monofosfato cíclica (AMPC), íons cálcio produzidos por células foliculares, e das proteínas C-MOS (Proteínas Proto-Oncogênicas) e MAPK (mitogen-activated kinase protein) (Tripathi et al., 2010).

A retomada da meiose é iniciada por uma cascata de eventos de fosforilação e desfosforilações que estão envolvidos na ativação do MPF em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (in vivo) ou retirada do ovócito do ambiente folicular (in vitro). O MPF é o complexo responsável pelo início da maturação e sua ativação precede o rompimento da vesícula germinativa (GVBD) que ocorre por volta de 8 horas após o início da maturação (Hochi et al., 1998). O MPF é um complexo formado por duas subunidades, uma catalítica constituída por uma proteína de 34kD, a p34Cdc2 (controle de divisão celular), e uma reguladora, formada por uma proteína de 45kD, a ciclina B. Em sua forma inativa a p34Cdc2 é fosforilada na treonina 161, treonina 14 e tirosina 15. Para ser ativada a unidade catalítica deve ser desfosforilada na treonina 14 e tirosina 15 pela fosfatase cdc25 (Mapelli et al., 2005).

O MPF apresenta atividade acentuada em ovócitos nas fases de reinício das divisões meióticas, alcançando seu maior nível na meiose I. Já o decréscimo na concentração deste componente é observado durante a transição da anáfase para a telófase, antes da liberação do primeiro corpúsculo polar. Após a fecundação ou quando ativado partenogeneticamente, o MPF é degradado (Farin et al., 2007).

As MAPKs (mitogen-activated kinase protein) são outras proteínas envolvidas na maturação do ovócito. Acredita-se que a atividade da MAPK é requerida para manutenção da atividade do MPF, formação dos fusos e manutenção da parada na metáfase II, porém a fase do ciclo celular em que sua presença é encontrada varia entre as espécies (Van der Hurk & Zhao, 2005). A MAPK também interrompe a comunicação das células do cumulus com o ovócito, através da fosforilação da proteína conexina-43, resultando no fechamento das junções *gap*.

Para que ocorra ativação dessas vias e retomada da meiose, é necessário haver um decréscimo nos níveis de AMPC produzido nas células do cumulus, o qual é transportado para ovócito via junções *gap*. Uma cascata de reações é iniciada após o pico de LH in vivo, ou pela ação do FSH e/ou EGF in vitro, resultando na interrupção da comunicação via junções *gap*, na sequencia ocorre a inativação da proteína quinase A (PKA) no ovócito, em resposta a queda do AMPC (Van Den Hurk & Zhao, 2005). Logo, a queda do AMPC, seguido pela inativação da PKA, permite que as vias do MPF e MAPK sejam ativadas por desfosforilações de suas subunidades, pois, quando ativa, a

PKA mantém fosforilada a unidade cdc 25, esta proteína é uma fosfatase, quando esta encontra-se desfosforilada ativa o MPF (Farin et al., 2007; Gordo et al., 2001).

A ativação do ovócito e retomada da meiose também é influenciada pelo aumento intracelular de cálcio, induzido pela ativação do receptor inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R). A mobilização intracelular de cálcio é seguida pelo influxo de cálcio do ambiente extracelular, o qual parece ser regulado através da estimulação antagonista do LH ou da adenil ciclase. É importante ressaltar que a retomada da meiose está diretamente relacionada com a perda da membrana nuclear, desintegração da vesícula germinativa, condensação da cromatina em cromossomos bivalentes, separação dos cromossomos homólogos e extrusão do primeiro corpúsculo polar. A interrupção na metáfase II ocorrerá logo após a fecundação, devido ao aumento dos níveis de cálcio, o que irá induzir a degradação da ciclina e, conseqüentemente do MPF. Com o progresso da metáfase II ocorre uma nova divisão desigual do citoplasma resultando na liberação do segundo corpúsculo polar (Tripathi et al., 2010).

2.2. Criopreservação Ovocitária

A criopreservação é processo pelo qual células, gametas, embriões e tecidos são armazenados em baixas temperaturas em N₂L (Nitrogênio Líquido) por um período de tempo indeterminado. A criopreservação, porém, é dependente do uso de solutos orgânicos conhecidos como crioprotetores, que são compostos responsáveis por substituir a água intracelular, e estabilizar as membranas, promovendo proteção às células.

Junto à queda de temperatura, durante o processo de criopreservação, ocorre a organização das moléculas de água em cristais, este fenômeno é inicialmente observado no meio extracelular, devido a um maior volume de água. De acordo com Leibo (2008), a formação destes cristais concentra os solutos na água não congelada aumentando a osmolaridade do meio extracelular promovendo a desidratação celular. Porém, quanto maior a velocidade de resfriamento “menor” é o tempo que a água tem para migrar do meio intra para o meio extracelular fato que culmina em uma maior formação de cristais de gelo intracelular. Por outro lado, se a velocidade de

congelamento for demasiadamente lenta, a desidratação pode ser exacerbada levando ao “efeito solução”. Nessa situação os componentes celulares irão precipitar em resposta a uma desidratação muito acentuada, comprometendo funções biológicas através da inviabilização de enzimas e proteínas. O ideal para processos de congelamento seria um método capaz de evitar a formação de cristais de gelo sem causar o efeito solução (Mazur, 1984).

Essas injúrias decorrentes da criopreservação ocorrem em todos os tecidos e células, entretanto, tais lesões parecem estar potencializadas no gameta feminino. Isso porque o ovócito é uma célula muito grande e volumosa, possuindo grande quantidade de água o que facilita a formação de cristais de gelo. Além disso, o ovócito apresenta uma dinâmica de organelas e processos bioquímicos muito peculiares, estando sujeito a danos morfológicos e funcionais (Hyttel et al., 2000). O comprometimento dos ovócitos após a criopreservação pode também ser atribuído à lesões na maquinaria meiótica, como desorganização de fusos e perdas de microtúbulos, além de outras alterações ultraestruturais (Boiso et al., 2002; Morato et al., 2008b; Luciano et al., 2009).

Outro fator que afeta o resultado da criopreservação de ovócitos é o estágio da meiose em que esses se encontram (Hochi et al., 1998; Luna et al., 2001; Boiso et al., 2002; Men et al., 2005). A maioria dos estudos tem focado na criopreservação de ovócitos maturados em estágio de metáfase II (MII) (Dinnyes et al., 2000; Hyttel et al., 2000; Horvath & Seidel, 2006; Asgari et al., 2011) em que os cromossomos, estão ligados aos microtúbulos do fuso meiótico, na placa metafásica.

A criopreservação de ovócitos imaturos já foi utilizada para ovócitos de suínos (Liu et al., 2008), humanos (Kuwayama et al., 2005), bovinos (Zhou et al., 2010) e felinos (Luciano et al., 2009), inclusive já foram descritos nascimentos de bezerros a partir de ovócitos imaturos vitrificados (Vieira et al., 2002). A desorganização dos cromossomos na placa metafásica, menores níveis de lesões ao citoesqueleto, além de possibilitar o armazenamento imediato do gameta feminino, são vantagens atribuídas ao ovócito imaturo.

Durante a maturação *in vitro*, outro estágio interessante para a criopreservação, é a utilização do gameta logo após o rompimento da vesícula germinativa (GVBD), onde o ovócito ainda é considerado imaturo. Um dos pontos positivos para a realização da técnica nesse estágio seria que, por ter rompido a VG a velocidade de penetração dos CP (crioprotetores) estaria aumentada, pois a membrana

nuclear é pouco permeável a estas moléculas orgânicas. Esse fato que possibilitaria a diminuição das concentrações de CP, reduzindo também sua toxicidade (Arav et al., 1996; Saragusty et al., 2009). Porém, independente do estágio de desenvolvimento, são observadas alterações ao citoesqueleto (Boiso et al., 2002; Kim et al., 2007; Luciano et al., 2009; Asgari et al., 2011), alterações cromossômicas (Men et al., 2005), alteração nos grânulos corticais (Morato et al., 2008b) e alteração na expressão de genes (Anchamparuthy et al., 2009; Ebrahimi et al., 2010).

O congelamento clássico é um dos métodos disponíveis para a criopreservação celular, porém resultados mostram não ser um método eficaz para ovócitos (Gualtieri et al., 2011; Saragusty & Arav, 2011). Isso porque associado ao resfriamento das soluções durante a queda de temperatura, ocorre a formação intensa de cristais de gelo de tamanhos e formas irregulares, que afetam as organelas e membranas, inviabilizando a função celular pós- descongelamento (Rall & Fahy, 1985).

Atualmente a técnica mais indicada para criopreservação de ovócitos é a vitrificação. Esse método é baseado no processo pelo qual uma solução viscosa se solidifica durante o resfriamento, sem a formação de cristais de gelo, mantendo desta forma, as células em um estágio quiescente (Vajta & Kuwayama, 2006). Durante o processo de criopreservação celular ocorrem três fases distintas: fase líquida, de transição e sólida, sendo a fase de transição a mais crítica para as células. Neste período as membranas e componentes celulares estão mais sensíveis aos danos em decorrência da formação dos cristais de gelo intracelulares. Além de que, a fluidez da membrana é comprometida devido a organização dos ácidos graxos, em uma forma mais gelatinosa. Uma das vantagens da vitrificação é a rápida passagem pela fase de transição lipídica (15 à - 5°C) (Arav et al., 1996). Outra vantagem, é que a técnica dispensa a utilização de equipamento mais especializado. Porém, para que bons resultados possam ser observados, é necessário o emprego de alta viscosidade do meio, resultado de um aumento da concentração dos CPs e diminuição do volume dos crioprotetores, possibilitando assim o armazenamento de ovócitos em N₂L (Saragusty et al., 2009).

A vitrificação apesar de já ter sido utilizada em embriologia de mamíferos, desde 1985 (Rall & Fahy, 1985), obteve avanço significativo quando se aumentou consideravelmente a taxa de resfriamento e aquecimento pela redução no volume da solução de vitrificação (Vajta et al., 1998).

2.2.1 Crioprotetores

Agentes crioprotetores (CP) são solutos orgânicos essenciais para a criopreservação de todas as células. Essas substâncias atuam protegendo as organelas e estabilizando membranas durante a estocagem em nitrogênio líquido, principalmente por substituir e/ou remover a água intracelular (Dobrinisky et al., 1996).

Crioprotetores podem ser divididos em dois grupos, levando-se em conta a permeabilidade celular: os intracelulares, que permeiam a membrana e atuam no interior da célula, a exemplo de álcoois como o dimetilsufóxido (DMSO), etileno glicol (EG) e glicerol (GLY); os extracelulares, que agem sobre a membrana sem ultrapassá-la, neste grupo estão açúcares como a sacarose, frutose, trealose e os de alto peso molecular, como os polímeros de polivinilpirrolidona (PVP) e álcool polivinil (Kasai & Mukaida, 2004).

O DMSO é um CP permeável com alto peso molecular (PM=78,13) dentre os intracelulares, e é bastante utilizado na vitrificação, por induzir muito facilmente o estágio vítreo. Além de preservar a integridade de proteínas isoladas e membranas lipídicas (Anchordoguy et al., 1991; Wood et al., 1993). Sua desvantagem é a alta toxicidade, além da dificuldade de sua preparação em solução, característica atribuída a sua alta capacidade higroscópica.

O EG é um dos crioprotetores com o menor peso molecular (PM=62,1), fato que confere a este CP uma característica peculiar, que é a velocidade de penetração celular, vantagem que o torna fundamental no esquema de transferência direta de embriões bovinos criopreservados. Sua toxicidade é inferior comparada a maioria dos outros crioprotetores, além de seu uso permitir combinações com outros crioprotetores (Vajta et al., 1998).

O GLY é o CP de eleição para a criopreservação de espermatozoides. Foi utilizado pela primeira vez em 1949 por Polge e colaboradores e, durante muito tempo foi também utilizado para a criopreservação de embriões bovinos, devido a sua baixa toxicidade. No entanto, pode induzir diversos danos osmóticos no citoplasma por apresentar baixa permeabilidade. O GLY é o crioprotetor de ação mais lenta, característica atribuída ao seu alto peso molecular (PM= 92,1) e, conseqüentemente, o menos eficiente para ovócitos (Leibo, 2008).

Já os CPs extracelulares são agentes de alto peso molecular e não permeiam as membranas celulares. São divididos em dois grupos: os polímeros e os sacarídeos.

Entre os CPs extracelulares, os compostos mono ou dissacarídeos são os mais empregados nos diferentes métodos de vitrificação, pois são capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional das membranas (Saragusty et al., 2009; Saragusty & Arav, 2011). Além de diminuir os efeitos osmóticos e tóxicos por promover a desidratação e vitrificação intracelular controlada regulam a quantidade de CP intracelular. Estes fatos tornam a utilização destas macromoléculas, ferramentas atrativas à vitrificação. A sacarose, trealose e glicose são os açúcares mais empregados como crioprotetores extracelulares durante a vitrificação. A sacarose tem o efeito adicional de proteção, pois este crioprotetor aumenta a desidratação celular, reduzindo a quantidade de água no citoplasma e evitando a formação de cristais de gelo (Rall, 1987).

Devido à toxicidade em diferentes sítios celulares e em proporções variadas, costuma-se associar mais de um tipo de CP durante a execução da vitrificação. Os efeitos deletérios das soluções de congelamento são minimizados pela seleção adequada e mistura criteriosa dos crioprotetores para cada tipo celular, além da redução do volume final, utilizado em cada técnica (Massip, 2001).

A intensidade com que são usados os CPs podem originar lesões tóxicas às células, uma vez que o grau de comprometimento celular está relacionado diretamente com as composições físico-químicas de cada CP, além do tempo e temperatura de exposição aos mesmos (Fahy et al., 2004).

Durante o processo de congelamento, a velocidade de desidratação celular é controlada pelos CPs extracelulares. Exposição a uma concentração exagerada ou durante um tempo prolongado pode resultar em uma diminuição excessiva do volume celular. O ovócito é a maior célula mamífera, e em seu meio intracelular o volume de água é abundante, seu fluxo para o meio extracelular de uma maneira descontrolada pode levar ao efeito da solução, o qual é caracterizado pela precipitação dos componentes celulares (Vajta et al., 1998).

Bons CPs devem apresentar alta solubilidade, baixa toxicidade e baixo peso molecular para facilitar a passagem pela membrana celular, conferindo uma boa desidratação, sem a precipitação dos componentes celulares (Dobrinsky et al., 1996).

O descongelamento é o processo inverso, onde, a célula tem que ser reidratada e os crioprotetores devem deixar o meio intracelular. Essa etapa requer

cuidados semelhantes aos adotados durante o congelamento, quanto à utilização dos CPs. A exposição direta de ovócitos a meios isosmóticos provocaria um influxo acelerado de água para o interior da célula. Aliado a quantidade de CPs no meio intracelular, este influxo resultaria em um acúmulo exagerado de líquido no ovócito, levando provavelmente ao rompimento do mesmo. A sacarose, bem como outros açúcares, é comumente associada aos meios de reidratação. Ela é responsável por aumentar a osmolaridade dos meios extracelulares, fato que reduz a velocidade de entrada de água e acelera a saída dos crioprotetores (Vajta et al., 1998; Kuwayama et al., 2005), promovendo assim uma reidratação controlada, minimizando o estresse osmótico.

2.2.2 Métodos de vitrificação

Os pioneiros no uso da técnica de vitrificação foram Rall e Fahy (1985), que vitrificaram embriões murídeos utilizando palhetas de envase de embrião (0,25ml). A partir desse trabalho, a técnica de vitrificação foi bastante estudada e vem sofrendo algumas modificações.

Inicialmente, os meios eram muito tóxicos e empregados grandes volumes de solução de crioprotetores. Desde então, o objetivo dos diferentes protocolos e modelos de vitrificação buscaram a redução da concentração dos CPs e o aumento da curva de congelamento. Além da diminuição dos efeitos tóxicos através de associações de diferentes CPs, o emprego de substâncias químicas menos tóxicas (Kuwayama et al., 2006).

Em 1990, Steponkus e colaboradores observaram que, quando a solução entra em contato direto com N₂L, sem o isolamento térmico produzido pelo plástico lacrado, no caso da palheta utilizada por Rall e Fahy (1985), apresenta uma velocidade de congelamento mais acentuada. Através dessa observação, surgiu o conceito de metodologia aberta de vitrificação, onde as estruturas ficam em contato direto com o N₂L, essa metodologia foi utilizada pela primeira vez para a vitrificação de embriões de

Drosophila, justamente com o objetivo de aumentar a velocidade de resfriamento (Steponkus et al., 1990).

As metodologias abertas evoluíram ao logo dos anos, e dentre as propostas que surgiram destacaram-se: grades de cobre de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), *open pulled straw* – OPS (Vajta et al., 1998), *cryoloop* (Lane et al., 1999), micro gotas (Papis et al., 2000), grades de nylon (Matsumoto et al., 2001) e sistema *hemi-straw* (Vanderzwalmen et al., 2003) e *cryotop* (Kuwayama et al., 2005).

Baseado no trabalho de Steponkus et al. (1990), Martino et al. (1996) desenvolveram um modelo que utiliza as grades de microscopia eletrônica como suporte para a vitrificação de ovócitos bovinos. Nesse método os ovócitos são dispostos sobre a grade metálica, logo após é retirado grande parte do meio deixando os ovócitos embebidos em um pequeno volume. Na sequência, a grade é depositada diretamente no N₂L. Com o uso desta técnica foi obtido 15% de blastocistos a partir de ovócitos MII vitrificados, entretanto nenhum estudo foi realizado utilizando ovócitos imaturos.

Posteriormente, a técnica de *open pulled straw* (OPS) desenvolvida por Vajta et al. (1998), provocou um grande impacto no uso da vitrificação sendo uma técnica bastante utilizada para ovócitos e embriões de várias espécies de mamíferos. Vários autores relataram resultados positivos com o uso dessa técnica em embriões, com boas taxas de re-expansão e eclosão (Vajta et al., 1998; Pereira et al., 2005; Siqueira Filho et al., 2011). Em ovócitos também tem sido largamente empregada (Luna et al., 2001; Diez et al., 2005; Morato et al., 2008a), entretanto as taxas de blastocisto são em torno de 5% a partir de ovócitos vitrificados. Neste modelo, o dispositivo no qual os embriões ou ovócitos são alojados, foi desenvolvido a partir de uma palheta de 0,25 ml. Uma das extremidades é aquecida e alongada, resultando em um diâmetro interno reduzido ($\pm 0,8$ mm), o que proporciona uma menor retenção de crioprotetor. Aliado também ao fato de uma menor resistência ao calor, proporcionado pela redução da espessura da parede da palheta (0,07mm).

Ainda visando a redução do volume de crioprotetor utilizado, Lane et al. (1999) desenvolveram o *cryoloop*. É uma espécie de laçada de nylon com 20 μ m 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 e, mergulhadas no N₂L. Entretanto, esse método

apresenta vários inconvenientes entre eles o desprendimento do conteúdo a ser vitrificado durante a imersão no N₂L.

No método da superfície sólida de vitrificação (SSV), os ovócitos, junto à solução de crioprotetores são depositados diretamente sobre uma superfície de metal pré-resfriada a -150°C, a qual é posteriormente mergulhada no N₂L (Dinnyes et al., 2000). Este método foi desenvolvido com o intuito de diminuir o efeito do isolamento térmico causado pelos dispositivos de plástico, visto que o metal é um melhor condutor de calor.

Vanderzwalmen et al. (2003) propuseram um modelo no qual uma microgota com a solução a ser vitrificada, contendo o ovócito é depositada na parede de uma das metades de uma palheta (0,25ml), seccionada no sentido longitudinal. Em seguida essa “hemi” palheta é diretamente mergulhada no N₂. A maioria das metodologias para a vitrificação apresenta um problema que é a identificação, neste modelo, por se tratar de uma palheta, fica mais fácil sua rotulação.

A mais recente abordagem para o volume mínimo é o *cryotop*, que consiste de uma haste de polipropileno em que os ovócitos são colocados em volumes mínimos de solução (Kuwayama et al., 2005). Esse sistema tem mostrado bons resultados com a vitrificação de ovócitos humanos (Kuwayama et al., 2005; Cobo et al., 2008). Atualmente é o método de vitrificação mais utilizado, (Morato et al., 2008a; Zhou et al., 2010), porém com resultados inconstantes, com médias de produção de blastocistos em torno dos 5%. Nesse método utiliza-se uma quantidade muito pequena de meio de vitrificação, em torno de 0,1 µl, quantidade muito menor que a utilizada no OPS ($\pm 4\mu\text{l}$), por exemplo. Seu potencial já foi demonstrado em espécies domésticas como bovinos (Morato et al., 2008a, Spriunya et al., 2010), equinos (Tharasanit et al., 2009) e ovinos (Ebrahimi et al., 2010). Esses estudos têm proporcionado informações sobre a sobrevivência, e capacidade de desenvolvimento assim como alterações estruturais sofridos pelos ovócitos vitrificados por *cryotop* (Boiso et al., 2002; Diez et al., 2005; Gualtieri et al., 2011). Recentemente Zhou e colaboradores (2010) apresentaram taxas de produção de blastocisto em torno de 11% utilizando essa técnica.

2.3 Metodologias para Avaliação de Ovócitos Vitrificados

O ovócito em um sistema de produção de embriões *in vitro*, tem de ser capaz de ser fecundado, se desenvolver a blastocisto e gerar uma prenhez e um neonato saudável (Sirard et al., 2000). Porém o processo de vitrificação compromete esta capacidade, provocando alterações estruturais (Arav et al., 1996; Diez et al., 2005; Luciano et al., 2009), nucleares (Luna et al., 2001) e moleculares (Anchamparuthy et al., 2010; Ebrahimi et al., 2010; Chamayou et al., 2011). A avaliação dos ovócitos submetidos à vitrificação busca a caracterização morfológica, molecular e funcional. Entretanto, as metodologias existentes não preservam a viabilidade do ovócito.

Alterações no citoesqueleto estão entre os principais danos causados pelo processo da vitrificação em ovócitos. Em particular, os fusos meióticos de ovócitos em MII são muito vulneráveis, devido a despolimerização dos microtúbulos que ocorre pela exposição aos crioprotetores e às baixas temperaturas (Boiso et al., 2002; Morato et al., 2008b). Técnicas como a imunohistoquímica são capazes de identificar as lesões no citoesqueleto. Nessa técnica, anticorpos, primários e secundários, específicos para tubulina e actina são marcados com corantes fluorescentes, identificando o citoesqueleto. A observação pode ser feita em microscopia de fluorescência simples ou em microscopia confocal. Nesta última é possível a observação de vários comprimentos de onda, o que permite a visualização de uma imagem tridimensional do ovócito, além da identificação de mais de uma proteína simultaneamente. Esta técnica já apresentou resultados mostrando que a tubulina e actina são mesmo afetadas durante os processos de criopreservação de ovócitos bovinos (Albarracin et al., 2005; Adona et al., 2008; Asgari et al., 2011), felinos (Luciano et al., 2009) e suínos (Wu et al., 2006).

A análise de ultraestrutura realizada por microscopia eletrônica de transmissão permite avaliar as alterações nos microtúbulos, nos cromossomos, nas mitocôndrias, na zona pelúcida, incluindo a destruição das junções *gap* entre as células do cumulus e ovócito. Além disso, através dessa técnica também é possível avaliar a precoce distribuição periférica e exocitose dos grânulos corticais (CG), o que pode prejudicar a fecundação, devido ao enrijecimento precoce da zona pelúcida (Fuku, E. et al., 1995; Fuku, E. J. et al., 1995). De fato, essa modificação da zona pelúcida precoce é

um dos principais fatores que provocam resultados insatisfatórios na vitrificação de ovócitos maturados *in vitro* (Wu et al., 2006).

As células do cumulus reduzem a velocidade de penetração dos crioprotetores, no caso de criopreservação de ovócitos imaturos. (Vajta et al., 1998), porém a remoção destas células é incompatível com a maturação ovocitária. (Zhou et al., 2010). Portanto, a avaliação das junções *gap*, ligações entre estas células do cumulus e ovócito, pode caracterizar o grau de comprometimento desse sistema de comunicação após a vitrificação. Uma técnica interessante é a utilização do corante *Lucifer Yellow*, que quando micro injetado no citoplasma, se as junções estiverem ativas, passa, por estas ligações, corando também as células que circundam o ovócito (Vozzi et al., 2001; Atef et al., 2005; Luciano et al., 2009).

Outro fator relevante na sensibilidade à criopreservação e que pode ser avaliado é o perfil lipídico da membrana plasmática. Esse muda concomitantemente com a evolução da maturação, passando de uma composição com ácidos graxos de cadeia longa em ovócitos imaturos, para uma, composta na sua maioria, por ácidos graxos de cadeia curta, a exemplo do colesterol, em ovócitos MII (Arav et al., 1996; Zeron et al., 2001). Nesse estágio há uma maior permeabilidade da membrana plasmática aos crioprotetores. Além da membrana, o tamanho e distribuição das gotas lipídicas se alteram durante a maturação (Fu et al., 2009). Estes lipídios estão diretamente ligados ao estresse oxidativo, diminuindo a resistência do ovócito à vitrificação. Explorar o perfil lipídico, através de colorações, ou mesmo por microscopia eletrônica de transmissão, pode caracterizar organelas como gotas lipídicas e composição de membranas, demonstrando como estas estruturas respondem a criopreservação. Além dessas avaliações, o lipidoma ovocitário pode ser explorado através da espectrofotometria de massa (Fuchs & Schiller, 2008).

Além dos distúrbios estruturais, o comprometimento da cromatina durante o processo de vitrificação é responsável por grande parte da inviabilidade ovocitária após a criopreservação. Técnicas de coloração que permitam a identificação e caracterização do estado da cromatina são importantes e vem sendo extensivamente empregadas, a exemplo da coloração por lacmóide e Hoechst (Luna et al., 2001; Ebrahimi et al., 2010). Esses corantes que tem afinidade pela cromatina tornam possível a identificação de alterações como: fusos multidirecionais, diploidia, degeneração da cromatina e interrupção da meiose em estágios anteriores à MII.

Entre todas as metodologias existentes, avaliações funcionais, como a produção de blastocistos, estabelecimento de gestações e o nascimentos de neonatos saudáveis são alternativas valiosas, para qualquer biotecnia da reprodução. Resultados insatisfatórios com a produção de blastocistos, a partir de ovócitos vitrificados, além da dificuldade de manutenção de receptoras, torna necessário o estabelecimento de metodologias complementares. A avaliação das taxas de fecundação, através de coloração com lacmóide, por exemplo. Através dessa técnica, ovócitos após a fecundação *in vitro*, são avaliados, levando-se em conta a penetração de espermatozoide, descondensação e formação dos pro-núcleos. Além da avaliação de desenvolvimento embrionário em que se avalia clivagem em D2, e taxas de blastocistos em D7 e D8, métodos de cultivo pós-eclosão, expressão gênica, coloração diferencial e contagem de células embrionárias podem ser ferramentas mais acuradas, em determinar a qualidade deste embrião, oriundo do ovócito vitrificado (Horvath & Seidel, 2006; Ebrahimi et al., 2010; Siqueira Filho et al., 2011).

A avaliação molecular pode elucidar questionamentos não esclarecidos pelas análises morfológicas e funcionais. Por exemplo, o estudo da apoptose e da influência dos genes reguladores de processos epigenéticos, ou mesmo de genes marcadores de competência ovocitária, ajudaria a esclarecer o nível de comprometimento celular, em resposta à vitrificação, observado através da alteração dos padrões de estoques de mRNA. Também, a associação da avaliação molecular à técnicas de identificação de proteínas, como imunohistoquímica e/ou *western blot*, podem diagnosticar possíveis alterações nos estoques destes mRNA, como degradação ou tradução. Além da avaliação molecular, a técnica descrita por Gavrieli et al. (1992), denominada "tunel", identifica *in situ* a fragmentação do DNA característica das células apoptóticas e pode ser útil como ferramenta para caracterização do quadro.

2.3.1 Análise da Expressão Gênica

Nas células de eucariontes, os RNA mensageiros (mRNA) são moléculas amplamente distribuídas em todo o citoplasma, são sintetizadas no núcleo através da

transcrição do DNA. Estes mRNA são transportados para os ribossomos, onde são traduzidos em proteínas (Chamayou et al., 2011).

Durante a ovogênese o ovócito sintetiza e acumula mRNA formando “estoques” destes transcritos, esse acúmulo está diretamente relacionado com a competência ovocitária. A atividade da enzima RNA polimerase diminui progressivamente até que o ovócito atinja o diâmetro final ($\pm 130 \mu\text{m}$), e, não apresenta atividade depois do rompimento da VG (Van Den Hurk & Zhao, 2005; Sirard et al., 2006; Caixeta et al., 2009). Apesar dessas informações serem consideradas até pouco tempo como quase que incontestáveis, recentemente foi observado haver transcrição durante a maturação do ovócito. Mamo et al. (2011) utilizando a técnica de microarranjo, observaram um aumento da expressão de alguns grupos de genes, durante a maturação ovocitária, ou seja, entre o rompimento da vesícula e MII (Mamo et al., 2011).

Estudos tem mostrado que a vitrificação de ovócitos parece alterar a abundância relativa de alguns genes (Anchamparuthy et al., 2010; Ebrahimi et al., 2010; Chamayou et al., 2011). Considerando que é comum a observação de ovócitos degenerados após a vitrificação, genes responsáveis em promover ou inibir a apoptose ovocitária, em resposta a vitrificação podem também estar alterados (Anchamparuthy et al. 2010).

As células normalmente entram em processo de degeneração por duas maneiras: apoptose ou necrose. A apoptose é um mecanismo endógeno de degeneração celular, sendo vital para a manutenção da homeostase. O processo apoptótico pode também ser ativado em resposta a vários fatores não fisiológicos, como temperatura, agentes tóxicos e estresse oxidativo (Men et al., 2003a). Entre as características das células apoptóticas estão a marginalização da cromatina e a formação dos corpos apoptóticos (Wyllie, 1997), que são alterações morfológicas resultantes da ação das Caspases.

O sinal de indução da apoptose é primeiramente reconhecido por membros da super-família de receptores de membrana celular (Fas/Faz-L/Apo-1). Ligantes específicos sinalizam agregação e formação de um complexo indutor de morte, que recruta pró-caspases através de proteínas de domínio de morte associada ao receptor (Ebrahimi et al., 2010). A sinalização através da mitocôndria é outra via frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2. Membros pró e anti-apoptótico da família Bcl-2 (Bcl-2 e

Bax) regulam a liberação de citocromo C a partir da membrana mitocondrial interna. Este associa-se com outros fatores incluindo a pró-caspase-9, formando o apoptossomo (Anazetti & Melo, 2005). Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose. Esses estímulos apoptóticos induzidos por agentes diversos, como exposição a agentes químicos ou estresse térmico podem ser independentes da via receptor de morte celular. Neste caso, a via mitocondrial é ativada com envolvimento de alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial e ocorre também a liberação do citocromo C para o citoplasma, que também se liga a fatores como pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subsequentes, a exemplo da Caspase-3 (Men et al., 2003a).

Homeostase é o balanço entre a morte e proliferação celular, logo, a apoptose está sob a influência de alguns reguladores, a exemplo de: c-Myc, p-53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, ciclinas e CK1. A fosforilação e desfosforilação destas proteínas constitui um dos principais mecanismos que regulam uma variedade de processos celulares incluindo a morte celular. Um exemplo disso é a proteína transcrita pelo gene P-53, é conhecida por ser promotora da parada do ciclo celular, que ocorre na fase de G1, para que ocorra uma espécie de “checagem” celular, antes da célula entrar na fase “S”. O aumento na expressão deste gene pode ocorrer em função de possíveis danos ao DNA, em função de algum estresse celular, podendo desencadear a cascata de apoptose (Hussein et al., 2005). Entretanto, estudos avaliando o efeito da vitrificação na expressão de genes ligados a apoptose em ovinos e bovinos não encontraram alterações significativas nos níveis de seus transcritos (Anchamparuthy et al., 2009; Ebrahimi et al., 2010). Porém Men et al. (2003) e Anchamparuthy et al. (2009) salientam a necessidade de mensurar a atividade das Caspases, além de monitorar a variação na sua expressão.

Outro processo importante para o ovócito está ligado aos fatores epigenéticos, estes podem estar envolvidos na aquisição e manutenção da competência durante a maturação ovocitária e são passivos de serem alterados, quando os ovócitos são submetidos ao processo de criopreservação (Chamayou et al, 2011).

As enzimas DNA metiltransferases, são responsáveis pelo estabelecimento (Dnmt-3a e Dnmt-3b) e manutenção (Dnmt-1) dos padrões de metilação. A permanência destes padrões de metilação é necessário para a manutenção dos genes *imprinted*, por exemplo, genes que não podem perder a “memória” durante a

reprogramação genômica (Carrell & Hammoud, 2010). Poucos são os estudos com relação aos processos epigenéticos durante a gametogênese, porém autores demonstraram que para camundongos a metilação global do DNA aumenta até a completa maturação do ovócito e permanece inalterada até que haja a desmetilação passiva que ocorre no início do desenvolvimento embrionário (Dean et al., 2003). Em contrapartida, Fagundes et al. (2011), observaram um menor nível de metilação para um gene específico (IGF-2) no ovócito MII, comparado ao ovócito imaturo, demonstrando que os fatores epigenéticos formam um mecanismo complexo de controle de transcrição e tradução.

Além de moléculas que agem na fita primária de DNA, como as Dnmts, outras enzimas atuam inibindo ou induzindo a transcrição gênica. Esse controle pós transcricional normalmente ocorre na cauda das histonas e é mediado por enzimas como a histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilase 2 (HDAC2). A primeira é responsável pelo aumento da acetilação das histonas logo, aumento da transcrição, já HDAC 2 está ligada a desacetilação e repressão da transcrição (Gu et al., 2010). A repressão à transcrição gênica também é induzida pela compactação da cromatina, este evento, ocorre antes do rompimento da vesícula germinativa. Nessa etapa a cromatina compactada é chamada de heterocromatina, uma das enzimas responsáveis por essa característica é a histona metiltransferase *supressor of variegation 3-9 homologue 1* (SUV39H1), que metila especificamente a lisina 9 da H3.

A análise da expressão dos genes ligados a apoptose, fatores epigenéticos e genes marcadores de capacidade ovocitária, durante a maturação, ou mesmo em resposta à processos de criopreservação pode ajudar a aprofundar o conhecimento sobre condições de maturação e cultivo in vitro, além de auxiliar no esclarecimento de quais são as vias responsáveis pelo comprometimento ovocitário após processos criobiológicos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal reproduction science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

ALBARRACIN, J. L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. **Molecular reproduction and development**. v. 72, p. 239-49, 2005.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, p. 37-58, 2007.

ANCHAMPARUTHY, V. M.; DHALI, A.; LOTT, W. M.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Vitrification of bovine oocytes: implications of follicular size and sire on the rates of embryonic development. **Journal of assisted reproduction and genetics**. v. 26, p. 613-9, 2009.

ANCHAMPARUTHY, V. M.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Expression pattern of apoptotic genes in vitrified-thawed bovine oocytes. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**. v. 45, p. e83-90, 2010.

ANCHORDOGUY, T. J.; CECCHINI, C. A.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**. v. 28, p. 467-73, 1991.

ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S. B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; CROWE, J. H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 33, p. 589-99, 1996.

ASGARI, V.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Time dependent effect of post warming interval on microtubule organization, meiotic status, and parthenogenetic activation of vitrified in vitro matured sheep oocytes. **Theriogenology**. v. 75, p. 904-10, 2011.

ATEF, A.; FRANCOIS, P.; CHRISTIAN, V.; MARC-ANDRE, S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. **Molecular reproduction and development**. v. 71, p. 358-67, 2005.

BOISO, I.; MARTI, M.; SANTALO, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. **Human reproduction**. v. 17, p. 1885-91, 2002.

BRANDÃO, D. O. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação in vitro**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Belo Horizonte, 2002, 61p. Dissertação de Mestrado. – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, fertility, and development**. v. 21, p. 655-64, 2009.

CARRELL, D. T.; HAMMOUD, S. S. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. **Molecular human reproduction**. v. 16, p. 37-47, 2010.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Human reproduction update**. v. 4, p. 103-20, 1998.

CHAMAYOU, S.; BONAVENTURA, G.; ALECCI, C.; TIBULLO, D.; DI RAIMONDO, F.; GUGLIELMINO, A.; BARCELLONA, M. L. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. **Cryobiology**. v. 62, p. 130-4, 2011.

CHOHAN, K. R.; HUNTER, A. G. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following in vitro maturation. **Animal reproduction science**. v. 76, p. 43-51, 2003.

COBO, A.; BELLVER, J.; DOMINGO, J.; PEREZ, S.; CRESPO, J.; PELLICER, A.; REMOHI, J. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 17, p. 68-72, 2008.

COTICCHIO, G.; ROSSI, G.; BORINI, A.; GRONDAHL, C.; MACCHIARELLI, G.; FLAMIGNI, C.; FLEMING, S.; CECCONI, S. Mouse oocyte meiotic resumption and polar body extrusion in vitro are differentially influenced by FSH, epidermal growth factor and meiosis-activating sterol. **Human reproduction**. v. 19, p. 2913-8, 2004.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GOMEZ, E.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**. v. 64, p. 317-33, 2005.

DINNYES, A.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of reproduction**. v. 63, p. 513-8, 2000.

DEAN, W.; SANTOS, F.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell & developmental biology*. v. 14, p. 93-100, 2003.

EBRAHIMI, B.; VALOJERDI, M. R.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; BAHARVAND, H.; FARROKHI, A. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 20, p. 26-34, 2010.

FAGUNDES, N. S.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V. A.; CAIXETA, E. S.; MACHADO, G. M.; RODRIGUES, F. C.; MELO, E. O.; DODE, M. A.; FRANCO, M. M. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. **Molecular human reproduction**. v. 17, p. 85-91, 2011.

FAHY, G. M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**. v. 48, p. 22-35, 2004.

FARIN, C. E.; RODRIGUEZ, K. F.; ALEXANDER, J. E.; HOCKNEY, J. E.; HERRICK, J. R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal reproduction science**. v. 98, p. 97-112, 2007.

FUCHS, B.; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. **Sub-cellular biochemistry**. v. 49, p. 541-65, 2008.

FU, X. W.; SHI, W. Q.; ZHANG, Q. J.; ZHAO, X. M.; YAN, C. L.; HOU, Y. P.; ZHOU, G. B.; FAN, Z. Q.; SUO, L.; WUSIMAN, A.; WANG, Y. P.; ZHU, S. E. Positive effects of Taxol pretreatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes. **Animal reproduction science**. v. 115, p. 158-68, 2009.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 32, p. 139-56, 1995.

FUKU, E. J.; LIU, J.; DOWNEY, B. R. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Molecular reproduction and development**. v. 40, p. 177-85, 1995.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of cell biology**. v. 119, p. 493-501, 1992.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal reproduction science**. v. 82-83, p. 431-46, 2004.

GORDO, A. C.; HE, C. L.; SMITH, S.; FISSORE, R. A. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**. v. 59, p. 106-14, 2001.

GU, L.; WANG, Q.; SUN, Q. Y. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: dynamics, regulation and functions. **Cell cycle**. v. 9, p. 1942-50, 2010.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; IACCARINO, M.; TALEVI, R. Ultrastructure and intracellular calcium response during activation in vitrified and slow-frozen human oocytes. **Human reproduction**. v. 26, p. 2452-60, 2011.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 49, p. 787-96, 1998.

HORVATH, G.; SEIDEL, G. E., JR. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. **Theriogenology**. v. 66, p. 1026-33, 2006.

HUMBLOT, P.; HOLM, P.; LONERGAN, P.; WRENZYCKI, C.; LEQUARRE, A. S.; JOLY, C. G.; HERRMANN, D.; LOPES, A.; RIZOS, D.; NIEMANN, H.; CALLESEN, H. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 63, p. 1149-66, 2005.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of cell science**. v. 118, p. 5257-68, 2005.

HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. **Molecular reproduction and development**. v. 56, p. 80-8, 2000.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 9, p. 164-70, 2004.

KIM, D. H.; PARK, H. S.; KIM, S. W.; HWANG, I. S.; YANG, B. C.; IM, G. S.; CHUNG, H. J.; SEONG, H. W.; MOON, S. J.; YANG, B. S. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. **The Journal of reproduction and development**. v. 53, p. 843-51, 2007.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**. v. 11, p. 300-8, 2005.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and sterility**. v. 72, p. 1073-8, 1999.

LEIBO, S. P. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures. **Cryobiology**. v. 13, p. 587-98, 1976.

LEIBO, S. P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**. v. 69, p. 37-47, 2008.

LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**. v. 59, p. 90-5, 2009.

LUNA, H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal reproduction science**. v. 68, p. 23-8, 2001.

MAMO, S.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; LEAL, C. L.; AL NAIB, A.; MCGETTIGAN, P.; MEHTA, J. P.; EVANS, A. C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC genomics**. v. 12, p. 151, 2011.

MAPELLI, M.; MASSIMILIANO, L.; CROVACE, C.; SEELIGER, M. A.; TSAI, L. H.; MEIJER, L.; MUSACCHIO, A. Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**. v. 48, p. 671-9, 2005.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of reproduction**. v. 54, p. 1059-69, 1996.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction in domestic animals**. v. 36, p. 49-55, 2001.

MATSUMOTO, H.; JIANG, J. Y.; TANAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**. v. 42, p. 139-44, 2001.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**. v.247, p.125-142, 1984.

MEN, H.; AGCA, Y.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. **Theriogenology**. v. 64, p. 1340-9, 2005.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**. v. 47, p. 73-81, 2003a.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Detection of DNA damage in bovine metaphase II oocytes resulting from cryopreservation. **Molecular reproduction and development**. v. 64, p. 245-50, 2003b.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**. v. 57, p. 137-41, 2008a.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Embryo development and structural analysis of in vitro matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. **Theriogenology**. v. 70, p. 1536-43, 2008b.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**. v. 54, p. 651-8, 2000.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 63, p. 1131-41, 2005.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164 p. 666, 1949.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in

vitro matured oocytes. **Molecular reproduction and development**. v. 75, p. 17-25, 2008.

RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 24, p. 387-402, 1987.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**. v. 313, p. 573-5, 1985.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**. v. 141, p. 1-19, 2011.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.; ARAV, A. Do physical forces contribute to cryodamage? **Biotechnology and bioengineering**. v. 104, p. 719-28, 2009.

SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. **Reproduction, fertility, and development**. v. 23, p. 585-90, 2011.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v. 65, p. 126-36, 2006.

SRIPUNYA, N.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; NAGAI, T.; IMAI, K.; PARNPAI, R. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **The Journal of reproduction and development**. v. 56, p. 176-81, 2010.

STEPONKUS, P. L.; MYERS, S. P.; LYNCH, D. V.; GARDNER, L.; BRONSHTEYN, V.; LEIBO, S. P.; RALL, W. F.; PITT, R. E.; LIN, T. T.; MACINTYRE, R. J. Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. **Nature**. v. 345, p. 170-2, 1990.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. **Reproduction**. v. 128, p. 313-9, 2004.

THARASANIT, T.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C.; STOUT, T. A. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. **Reproduction**. v. 132, p. 759-69, 2006.

TRIPATHI, A.; KUMAR, K. V.; CHAUBE, S. K. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular physiology**. v. 223, p. 592-600, 2010.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular reproduction and development**. v. 51, p. 53-8, 1998.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**. v. 65, p. 236-44, 2006.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 63, p. 1717-51, 2005.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; VAN ROOSENDAAL, E.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human reproduction**. v. 18, p. 1504-11, 2003.

VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D. P.; LEHMKUHL, R. C.; RUBIN, M. I.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 45, p. 91-4, 2002.

VOZZI, C.; FORMENTON, A.; CHANSON, A.; SENN, A.; SAHLI, R.; SHAW, P.; NICOD, P.; GERMOND, M.; HAEFLIGER, J. A. Involvement of connexin 43 in meiotic maturation of bovine oocytes. **Reproduction**. v. 122, p. 619-28, 2001.

WOOD, M. J.; BARROS, C.; CANDY, C. J.; CARROLL, J.; MELENDEZ, J.; WHITTINGHAM, D. G. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in dimethylsulphoxide. **Biology of reproduction**. v. 49, p. 489-95, 1993.

WU, C.; RUI, R.; DAI, J.; ZHANG, C.; JU, S.; XIE, B.; LU, X.; ZHENG, X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. **Molecular reproduction and development**. v. 73, p. 1454-62, 2006.

WYLLIE, A. H. Apoptosis: an overview. **British medical bulletin**. v. 53, p. 451-65, 1997.

YANG, B.; TUANY, F.; RUMPF R.; DODE M.A. N. Comparison of Vitrification Methods on the Viability of Bovine Immature Oocyte. In: THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION 2010 ANNUAL MEETING, 43., 2010, Wisconsin, **Anais** The Intersection Between Genetics, Genomics, and Reproductive Biology, Wisconsin: The Society for the Study of Reproduction Canada, p. 72, 2010.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**. v. 121, p. 447-54, 2001.

ZHOU, X. L.; AL NAIB, A.; SUN, D. W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**. v. 61, p. 66-72, 2010.

CAPITULO 2

1 RESUMO

A vitrificação com *cryotop* surgiu como uma opção promissora para a criopreservação de ovócitos, por minimizar efeitos negativos e melhorar as taxas de sobrevivência. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da vitrificação em diferentes momentos da maturação *in vitro* (MIV), quanto às características morfológicas, funcionais e moleculares de ovócitos bovinos. Foram utilizados complexos-cumulus-ovócitos (CCOs) obtidos de ovários de abatedouro. Para os experimentos 1 e 2, os ovócitos foram distribuídos em 4 grupos: controle (GC) não vitrificado; 0 hora vitrificado (V0); 8 horas vitrificado (V8) e 22 horas vitrificado (V22). Todos os grupos vitrificados foram desvitrificados e retornaram para a MIV até completar 24 horas. Para a avaliação da cromatina, CCOs foram desnudados, fixados e corados com lacmóide. Para a taxa de fecundação, ovócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV), e após 18 horas de co-cultivo com os espermatozoides foram fixados e corados com lacmóide. O desenvolvimento embrionário foi avaliado, pelas taxas de clivagem e blastocistos em D2, D7 e D8, após a inseminação (pi). Para análise estatística foi empregado o teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). Quanto ao experimento 3, primeiramente foi quantificada a expressão de genes ligados à apoptose (Caspase-3 e P-53) e ao controle epigenético (HDAC 2, Dnmt-1e SUV39H1) em ovócitos maturados *in vitro* por 0 (GC0), 8 (GC 8), 22 (GC22) e 24 horas (GC24). Posteriormente, foi avaliado o efeito da vitrificação em diferentes momentos da MIV (0, 8 e 22 horas) na expressão desses mesmos genes. Para isso ovócitos de todos os grupos vitrificados e do controle foram coletados às 24 horas de MIV. A avaliação da expressão gênica, foi realizada por qPCR e os dados analisados por ANOVA one-way, ($P < 0,05$). A capacidade do ovócito de atingir MI, clivar e se desenvolver até blastocisto foi superior no grupo controle ($P < 0,05$) comparado aos grupos vitrificados, não havendo diferenças significativas entre estes ($P > 0,05$). Já a taxa de fecundação foi superior no grupo controle ($P < 0,05$), sendo

que o grupo V0 foi o que apresentou as menores porcentagens de ovócitos fecundados e maior de ovócitos degenerados ($P < 0,05$) comparado aos demais grupos. Quanto ao perfil de expressão gênica em ovócitos durante a MIV, foi observado que os níveis de transcritos do gene Caspase-3 estavam aumentados ($P < 0,05$), nos grupos GC22 e GC24, comparados à GC0 e GC8, também foi observado um aumento ($P < 0,05$) da expressão do gene Dnmt-1, nos grupos GC8, GC22 e GC24 comparados ao GC0. Entretanto, não foi observada alteração na abundância dos transcritos em nenhum dos grupos submetidos à vitrificação ($P > 0,05$), comparados ao CG24. Conclui-se que, apesar dos baixos resultados, a vitrificação pode ser empregada para a conservação de ovócitos bovinos, independente do momento da MIV. Os níveis de transcritos avaliados não foram alterados em resposta à vitrificação. Entretanto, foi constatado um aumento na expressão da Caspase-3 e Dnmt-1, durante a MIV.

Palavras chaves: Vitrificação, *cryotop*, ovócitos, bovino.

2 ABSTRACT

Vitrification by cryotop method has emerged as a promising option for oocytes cryopreservation, by minimizing negative effects and improving survival rates. The aim of this research was to evaluate the effect of vitrification at different times point during in vitro maturation (IVM) on functional, morphological and molecular characteristics of bovine oocytes. For all the experiments cumulus-oocytes-complexes (COCs) were obtained from slaughterhouse ovaries. In first and second experiments, oocytes were distributed into 4 groups: control non-vitrified(CG); 0 hour vitrified (V0); 8 hours vitrified (V8) and 22 hours vitrified (V22). In all groups oocytes were vitrified and warmed, and then returned to incubator until 24 hours of IVM. For chromatin evaluation, COCs were denuded, fixed and stained with lacmoid. To evaluate fertilization rates, oocytes, were fixed and stained with lacmoid 18 hours after in vitro insemination (pi). Embryonic development was accessed by cleavage and blastocyst rates at D2, D7 and D8 (pi.). Data were analyzed by Chi-square test ($P < 0.05$). A third experiment was designed to evaluated mRNA expression of apoptosis (Caspase-3 and P-53) and epigenetic control related genes (HDAC 2, SUV39H1 and Dnmt-1). First gene expression was quantified at different time points during oocyte IVM: 0 (CG0), 8 (CG 8), 22 (CG22) and 24 hours (CG24). Then, the effect of vitrification at different moments of IVM (0, 8 and 22 hours) on genes expression was studied. Gene expression was performed by qPCR and data were analyzed by one-way ANOVA ($P < 0.05$). The ability of the oocyte to reach MII after maturation, to cleave and to develop to blastocyst was higher in CG ($P < 0.05$), compared to vitrified groups, which did not differ among them ($P > 0.05$). For fertilization rates, CG also presented superior results compared to all vitrified groups ($P < 0.05$). However, when vitrified groups were compared, V0 had

the lowest rate of fertilized oocytes and higher rate degenerated oocytes than the other groups ($P < 0.05$). Gene expression profile in oocytes during IVM, showed that mRNA levels of Caspase-3 were increased ($P < 0.05$) in both CG22 and CG24 compared to CG0 and CG8. An increase in Dnmt-1 gene expression was also observed ($P < 0.05$) in CG8, CG22 and CG24 compared to CG0. No difference in mRNA relative abundance was observed in any of the vitrified group ($P > 0.05$), compared to CG24. In conclusion, despite the poor results, vitrification can be used to preserve bovine oocytes, regardless to IVM time. Transcript levels of the studied genes were not affected by vitrification procedure. However, an increase in mRNA levels of Caspase-3 and Dnmt-1 genes was observed during IVM, suggesting transcription processes during this period.

Keywords: Vitrification, Cryotop, Bovine, Oocyte

3 INTRODUÇÃO

O sucesso da criopreservação de ovócitos traz inúmeros benefícios para o uso das técnicas de reprodução assistida tanto em animais como em humanos. Na produção *in vitro* de embriões, a possibilidade de criopreservação dessas estruturas otimizaria a logística, por facilitar o transporte a longas distâncias e maximizar a disponibilidade de receptoras. Essa técnica é também uma ferramenta importante para formação de bancos de material genético e comercialização de material biológico, além de ser indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção. Isso porque, para que essas possam ser trabalhadas e regeneradas, é fundamental que sejam recuperáveis não só os espermatozoides, mas também os ovócitos. Além disso, com a evolução das biotecnologias, estes ovócitos criopreservados poderiam também ser utilizados para produção de animais transgênicos e em programas de clonagem, por transferência nuclear.

Já em relação aos humanos, o desenvolvimento de um método eficaz de criopreservação ajudaria meninas e mulheres com problemas oncológicos, pois uma vez, submetidas a processos quimio ou radioterápicos, ficam sujeitas a perda prematura da função ovariana (Boiso et al., 2002).

Porém a criopreservação de ovócitos é ainda uma técnica pouco eficiente, considerando que a capacidade de desenvolvimento embrionário posterior é insatisfatória na maioria dos mamíferos. Essa alta sensibilidade à criopreservação pode ser explicada por suas características morfológicas e funcionais peculiares, como o tamanho celular, volume de água no citoplasma, organização do citoesqueleto, distribuição de organelas e estágio da meiose (Fuku et al., 1995; Hochi et al., 1998; Diez et al., 2005; Adona et al., 2008).

Dentre os métodos de criopreservação disponíveis, a vitrificação é o método mais apropriado para ovócitos de mamíferos domésticos (Saragusty & Arav, 2011). Essa técnica é baseada no uso de alta concentração e viscosidade de crioprotetores e de curvas de congelamento muito acentuadas. Essas características, físico químicas da vitrificação conseguem evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, diminuindo muito os danos às membranas e organelas. Entretanto, devido às altas concentrações de crioprotetores, os ovócitos também são expostos a um estresse tóxico demasiadamente alto, tornando necessário o desenvolvimento de metodologias que utilizem um volume menor de solução de vitrificação (Vajta et al., 1998; Vieira et al., 2002).

Na tentativa de resolver esse problema Kuwayama et al. (2005) desenvolveram o método de *cryotop*, em que o volume final de solução de vitrificação não ultrapassa 0,1µl. Esse método, até o presente, apresenta os melhores resultados para a criopreservação de ovócitos em humanos e em várias espécies de animais domésticos.

Outro fator importante que está envolvido no comprometimento do ovócito durante o processo de vitrificação é o estágio da meiose em que se encontra. Vários estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para a vitrificação de ovócitos, em bovinos. Entretanto, existe muita controvérsia com relação a esse assunto. Enquanto alguns autores defendem que os ovócitos em vesícula germinativa seriam mais resistentes a criopreservação por não apresentarem fusos meióticos, outros atribuem aos ovócitos em MII uma maior capacidade de suportar a criopreservação.

Portanto, existe a necessidade de se conhecer como os ovócitos nos diferentes estágios da maturação respondem ao processo de vitrificação e quais os processos mais afetados. Esse conhecimento auxiliará não só na determinação de qual o estágio a ser utilizado para a criopreservação mas também na mudança de protocolos e métodos que possam melhorar a eficiência da técnica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Primeiramente foi realizado um pré-experimento onde, ovócitos foram retirados em diferentes momentos da MIV, desnudados, fixados e corados com lacmóide para a determinação da cinética nuclear, durante a maturação in vitro. A partir desta cinética, foram selecionados os momentos de interesse para cada experimento.

4.1.1 Experimento 1: Avaliação da maturação nuclear em ovócitos submetidos à vitrificação em diferentes estágios da meiose.

O objetivo desse experimento foi avaliar a maturação nuclear e possíveis alterações à cromatina em ovócitos vitrificados em estágios distintos da meiose. Para tal, foi utilizado um total de 315 ovócitos, distribuídos em 4 grupos (Figura 2.1).

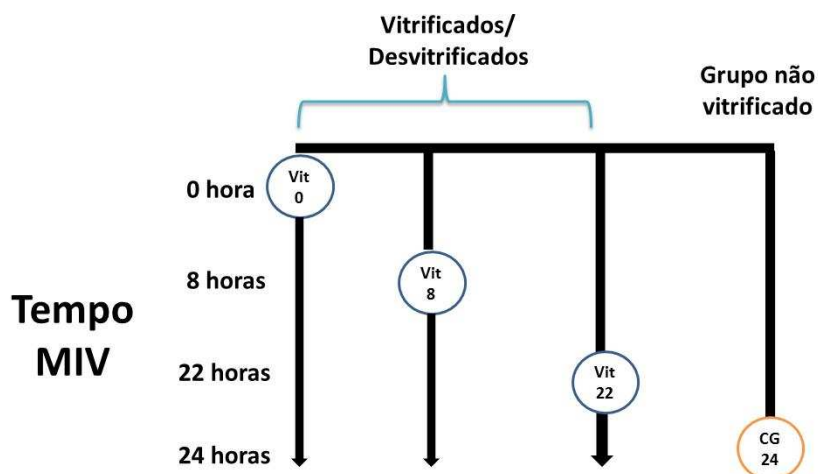


Figura 2.1. Esquema representativo dos grupos de ovócitos utilizados nos experimentos 1, 2 e 3: Vit 0 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após seleção); Vit 8 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após 8 horas de MIV); Vit 22 (grupo de ovócitos vitrificados e desvitrificado após 22 horas de MIV) e GC 24 (grupo controle, ovócitos não vitrificados). Ovócitos de todos os grupos completaram 24 horas de MIV.

4.1.2 Experimento 2: Avaliação da fecundação e desenvolvimento embrionário em ovócitos submetidos, à vitrificação em diferentes estágios da meiose

O objetivo desse experimento foi determinar se o momento escolhido para a vitrificação durante a MIV interfere no desenvolvimento embrionário e nos índices de fecundação após a FIV. Para o desenvolvimento embrionário foram utilizados 883 ovócitos distribuídos em quatro grupos, num total de 7 réplicas. Para a taxa de fecundação, foram utilizados 471 ovócitos distribuídos em 4 grupos por 4 réplicas. Os grupos experimentais (1, 2, 3, e 4) foram os mesmos já descritos no experimento anterior (Figura 2.1).

4.1.3 Experimento 3. Efeito da vitrificação em diferentes momentos da maturação sobre o padrão de expressão gênica em ovócitos bovinos.

O objetivo desse experimento foi avaliar se a vitrificação, realizada em momentos distintos durante a MIV, poderia alterar a abundância relativa de genes relacionados ao controle epigenético (Dnmt-1, HDAC 2 e SUV39H) e de genes ligados à apoptose (Caspase-3 e P-53). Inicialmente foi avaliado o perfil da expressão destes genes durante a MIV (Figura 2.2). Posteriormente, se a vitrificação em diferentes momentos afeta a expressão após 24 horas de maturação, nesta segunda etapa a divisão dos grupos foi a mesma utilizada nos experimentos 1 e 2 (Figura 2.1). Foram utilizados 4 pools de 20 ovócitos de cada grupo.

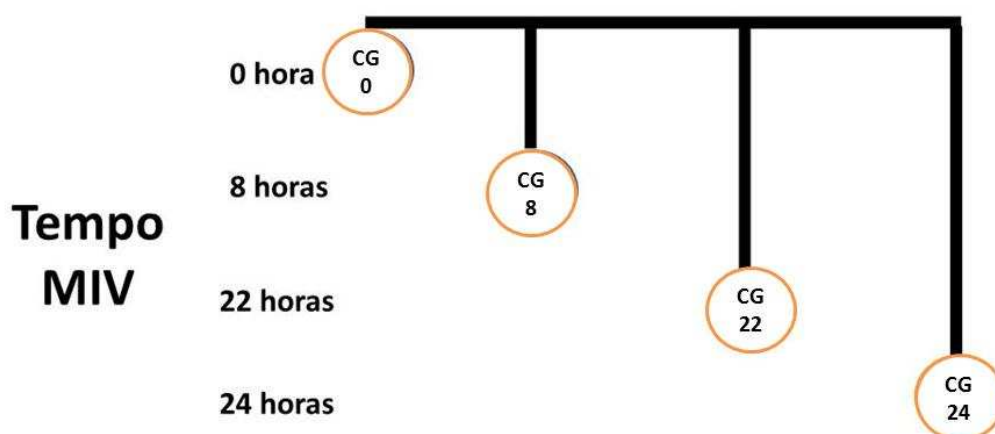


Figura 2.2. Esquema representativo dos grupos de ovócitos para avaliação do perfil de expressão gênica durante a maturação no experimento 3: GC 0 (grupo de ovócitos após seleção); GC 8 (grupo de ovócitos após 8 horas de MIV); GC 22 (grupo de ovócitos após 22 horas de MIV) e GC 24 (grupo de ovócitos após 24 horas de MIV). Ovócitos de cada grupo foram avaliados em diferentes momentos da MIV.

4.2 Obtenção dos Ovócitos

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de reprodução animal (LRA) da Embrapa, no Cenargen, Brasília-DF e no Campo Experimental Sucupira (CES), Riacho Fundo I-DF. Ovários de fêmeas bovinas foram coletados imediatamente após o abate e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% Na Cl) suplementado com penicilina G (100 UI/ml) e sulfato de estreptomicina (100 µg/ml) a 35°C. O tempo máximo transcorrido entre coleta dos ovários e o início da punção folicular foi de quatro horas.

Os complexos-cumulus-ovócitos (CCO) foram aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro com o auxílio de seringa de 10 ml e agulha 40 X 12 (18 G), o líquido folicular era depositado em tubos de 15 ml (TPP[®], Trasadingen, Suíça), após dez minutos de repouso o pellet era retirado e transferido para uma placa de petri de 100 mm (TPP[®]) contendo PBS (Nutricell[®], Campinas – SP, Brasil) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) e antibióticos (penicilina e estreptomicina).

Com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon- SMZ 650) era realizada a busca dos ovócitos. Somente os CCOs com citoplasma homogêneo e mais de três camadas compactas de células do cumulus foram utilizados. Após a seleção, os grupos foram distribuídos nos diferentes tratamentos.

4.3 Vitrificação e Desvitrificação

Para a vitrificação foram utilizadas as soluções e o protocolo de acordo com a metodologia do *cryotop* desenvolvido por Kuwayama et al. (2005), porém as hastes e o equipamento utilizado (Figura 2.3) foram adquiridos da Ingá-med[®] (Maringá-PR, Brasil). A solução de manutenção (SM), composta de TCM-199 Hank's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) suplementada com 20% de SFB foi usada para manutenção dos ovócitos durante a vitrificação e desvitrificação. Todas as

manipulações foram realizadas sobre placa aquecedora na temperatura de 39°C, em sala aquecida (25- 27°C). Todos os meios utilizados estavam aquecidos a temperatura ambiente, com exceção da solução de desvitrificação 1 (DV1) aquecida a 37°C.

Para vitrificação os CCOs em grupos de 3 a 5 foram submetidos a 3 banhos sequenciais na solução de equilíbrio (SV1), constituída de SM acrescido de 7,5% etileno glicol e 7,5% de DMSO, permanecendo em cada gota (banho) por 3 minutos, o tempo total de exposição à SV1 ficou entre 9 e 15 minutos. Após o equilíbrio os ovócitos eram transferidos para a solução de vitrificação (SV2), composta por SM suplementado com 15% etileno glicol, 15% DMSO e 0,5 M de sacarose, nesta solução os ovócitos passaram por 4 banhos sequenciais, totalizando 45 - 60 segundos.

Os ovócitos eram então colocados nas hastes de vitrificação com auxílio de micro pipeta de vidro com diâmetro aproximado de 150 µm, imediatamente após a deposição dos ovócitos nas hastes o excesso de solução era retirado deixando somente uma fina camada (aproximadamente 0,1µl) sobre os ovócitos. Então a haste era submergida verticalmente no nitrogênio líquido.

Para a desvitrificação, a haste era retirada do N₂L com o auxílio de uma pinça e a extremidade contendo os CCOs era mergulhada na solução de desvitrificação 1 (DV1), composta por SM mais 1 M de sacarose. Os CCOs permaneciam na DV1 por 1 minuto, e posteriormente eram transferidos para uma solução menos concentrada (DV 2) composta por SM acrescido de 0,5 M de sacarose, durante 3 minutos. Finalmente os CCOs eram submetidos a duas lavagens em gotas de SM, permanecendo 5 minutos em cada gota.

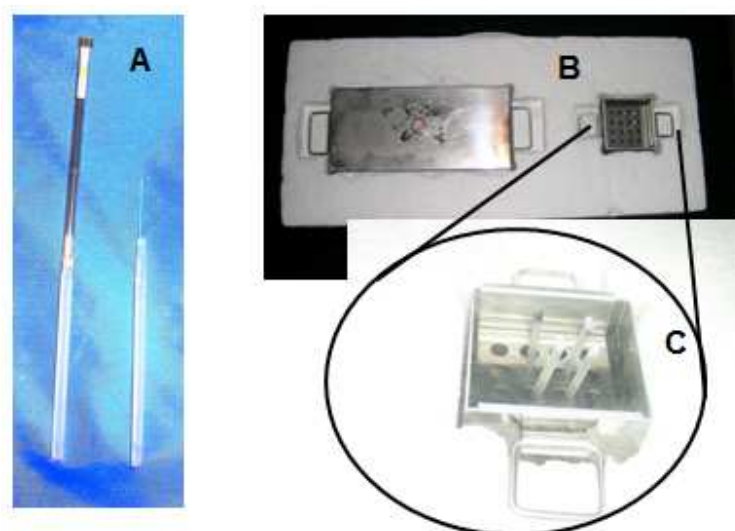


Figura 2.3. Hastes de polipropileno (A), equipamento com compartimentos contendo nitrogênio (B e C) (Ingá-med[®]), utilizados para a vitrificação de ovócitos, pelo método de *cryotop*.

4.4 Maturação In Vitro

Os COCs selecionados foram distribuídos em quatro grupos: não vitrificado, utilizado como grupo controle 24 horas (GC), vitrificados imediatamente após a seleção (V0), vitrificado às 8 horas (V8) e vitrificado às 22 horas (V22) de maturação in vitro (MIV). Os grupos vitrificados foram vitrificados, desvitrificados e retornaram imediatamente para a MIV para completar 24 horas de maturação.

Os CCOs de todos os tratamentos eram lavados e transferidos em grupos de 30, para gotas de 200 μ l de meio de maturação composto por TCM-199 com sais de Earl's (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada), suplementado com 10 μ g/ml de FSH, 10% soro fetal bovino, 50 μ g/ml amicacina e 1 μ g/ml de L- glutamina. As gotas eram feitas em placas de 60 mm (TPP[®]) e cobertas com óleo mineral (360 Medical Fluid 350 CST- DOW CORNING[®]). As placas foram previamente estabilizada por duas horas em incubadora a 39°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4.5 Avaliação da Maturação Nuclear

Para a avaliação da maturação nuclear, CCOs de todos os tratamentos ao término das 24 horas de maturação foram expostos a 0,3% de hialuronidase durante 5 minutos, logo após as células do cumulus foram removidas por sucessivas pipetagens. Os ovócitos desnudos foram fixados em uma solução (3:1) de álcool etílico e ácido acético, onde permaneceram por pelo menos 48 horas. No dia da avaliação os ovócitos foram colocados sobre lâmina e cobertos com lamínula, corados com corante lacmóide em solução de ácido acético glacial a 45%.

A avaliação morfológica dos ovócitos corados foi realizada em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1,000X). Os ovócitos foram classificados em: (a) maturados, aqueles que apresentam o estágio de metáfase II com cromossomos alinhados na placa metafásica, (b) imaturos, aqueles que não atingiram o estágio de MII, (c) anormais, aqueles com aberrações cromossômicas tais como diploidia, fusos multidirecionais, disco metafásico anormal ou dispersão cromossômica e (d) degenerados, aqueles que apresentavam cromatina não identificável (Figura 2.4).

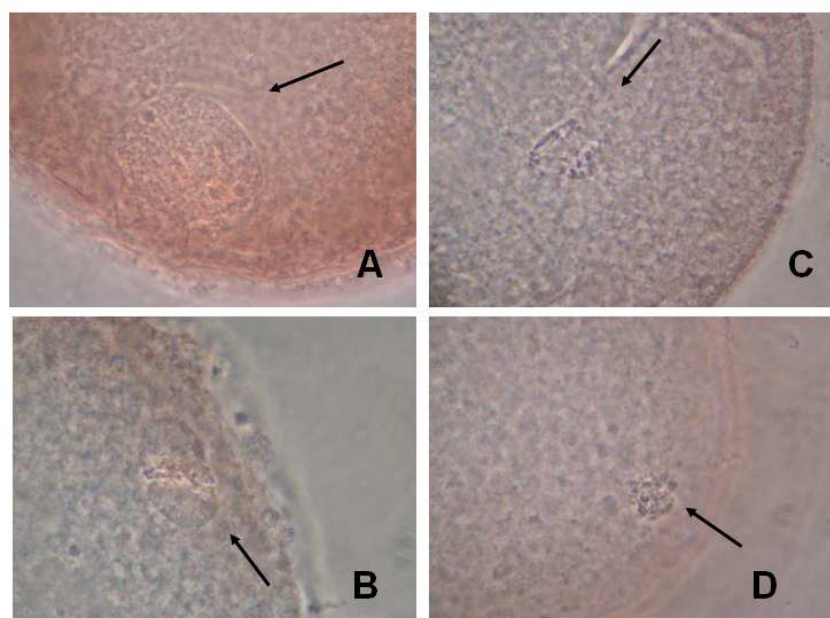


Figura 2.2. Ovócito em VG (A); Ovócito MII (B); Ovócitos com cromatina anormal (C); Ovócitos com cromatina degenerada (D). As setas indicam a cromatina em cada imagem.

4.6 Seleção Espermática e Fecundação In Vitro

Para todos os experimentos foi utilizado sêmen de três partidas, de um único touro da raça Nelore, previamente testados para a FIV. O sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos, em banho maria e as células espermáticas selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* 45 e 90%.

As amostras de sêmen foram colocadas sobre um volume de 800µl, composto por 400µl de gradiente de *Percoll* 45% e 400µl de *Percoll* 90%, colocados em microtubos de 2 ml e centrifugados a 5.400 g por 5 minutos. Após a centrifugação o pellet foi transferido para um meio TALP (Parrish et al., 1995) e centrifugado por mais 5 minutos a 5.400 g (Machado et al., 2009). O pellet resultante foi ressuspensionado em meio TALP, suplementado com 2mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/ml de heparina, constituintes do meio de fecundação (FEC).

Os ovócitos maturados foram transferidos para gotas de 200 µl de meio FEC, onde foram adicionados os espermatozoides em uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. Espermatozoides e ovócitos foram co-incubados por 18 horas a 39°C em 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da inseminação in vitro considerado como dia 0.

4.7 Cultivo In Vitro

Após o período de 18-20 horas de co-incubação os prováveis zigotos foram lavados e transferidos para o cultivo in vitro. Foram utilizadas gotas de 200µl de meio de fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de sódio tri citrato, 2,77 mM myo-inositol e 5% de SFB (SOFaaci; Holm et al., 1999), coberto com óleo mineral (360 Medical Fluid 350 CST-DOW CORNING®) e cultivados por 8 dias a 39°C e 5% de CO₂. Os embriões foram avaliados no dia 2 para taxa de clivagem, e nos Dias 6, 7 e 8 pós inseminação (pi) para as taxas de blastocisto

4.8 Avaliação das Taxas de Fecundação

Para a avaliação das taxas de fecundação os prováveis zigotos foram transferidos do meio de fecundação 18 horas após o início da FIV, fixados em solução (3:1) de álcool etílico e ácido acético por pelo menos 48 horas.

No dia da avaliação os ovócitos foram colocados sobre lâmina, cobertos com lamínula e corados com lacmóide (solução de 1% em ácido acético glacial a 45%). A análise foi realizada em microscopia de contraste de fase (Nikon Eclipse E200, 1.000X).

As estruturas foram classificadas nas seguintes categorias: a) não fecundados, ovócitos que apresentavam somente a presença da cromatina feminina; b) fecundados aqueles que apresentavam espermatozóide com cabeça íntegra ou descondensada, pró-núcleos feminino e masculino, polispermia ou clivagem (Figura 2.5) e, c) degenerados, aqueles com cromatina não identificável.

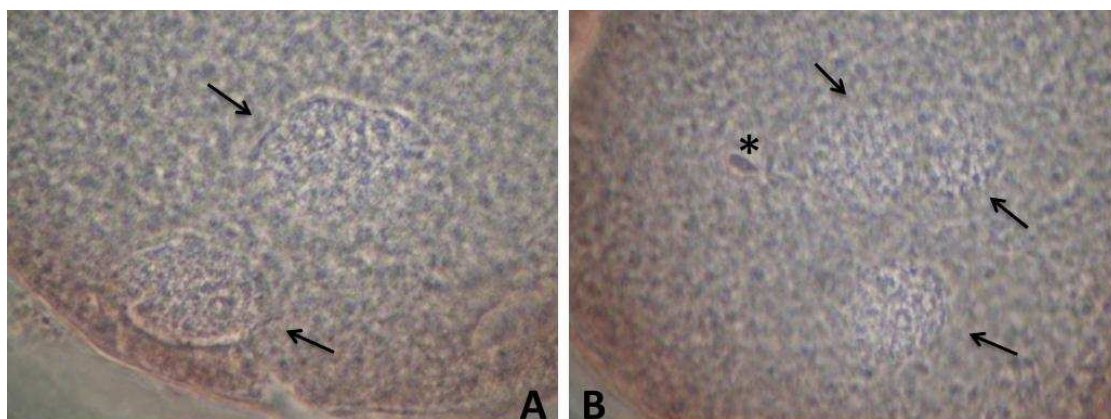


Figura 2.5. Ovócitos fecundados: fecundação normal, presença de dois pró-núcleos (A); fecundação polispérmica, presença de três pró-núcleos e de uma cabeça de espermatozoide solta (B). Setas e asterisco indicam os pró-núcleos e a cabeça do espermatozoide, respectivamente.

4.9 Armazenamento dos Ovócitos para Análise de Expressão Gênica

Ovócitos dos diferentes tratamentos foram lavados em PBS sem cálcio e magnésio (4 banhos) e transferidos em 10 μ l para um tubo de 0,2 ml com auxílio de um pipetador automático. Posteriormente, foi adicionado ao conteúdo do tubo 20 μ l de RNA later. Os tubos contendo as estruturas foram então, mantidos a 4°C durante 24 horas e, então, transferidos para o congelador à -20°C, onde foram estocadas até a análise. Para cada categoria foram armazenados 4 pools de 20 ovócitos. Em todos os grupos as células do cumulus foram removidas por pipetagens antes do início dos banhos em PBS.

4.10 Extração de RNA e Transcrição Reversa

O RNA total foi extraído de 4 pools de 20 ovócitos utilizando o kit RNeasy Plus® (Qiagen, Mississauga, Ontario, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total (14 μ L) foi submetido à uma reação de transcrição reversa utilizando 200 U de SuperScript III (200U μ L⁻¹; Invitrogen®), 0,5 μ g de Oligo-DT₁₂₋₁₈primer (0,5 μ g/ μ L; Invitrogen®), dNTPs (2.0mM de cada), 0.1mM DTT (0.1mM/ μ L), 40U de RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/ μ L; Invitrogen®) e tampão 1X first strand. As reações foram realizadas utilizando 65° C por 5 minutos, 42° C por 52 minutos e 70° C por 15 minutos para a inativação da enzima. Ao final da reação foi obtido um volume final de 24 μ L de cDNA (0,83 ovócitos/ μ L), o qual foi diluído em 16 μ L de água RNase free para obter um volume final de 40 μ L de cDNA (0,5 ovócito/ μ L). Para quantificação da expressão gênica foi utilizado 1 μ L (0,5 ovócito) do volume final de cDNA obtido.

4.11 Quantificação da expressão de genes por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a análise relativa através do qPCR, utilizou-se o protocolo de amplificação dos “kits” SYBR Green Rox Plus® (LGC Biotecnologia) e Fast SYBR Green Master Mix ® (AppliedBiosystems). As reações utilizando o SYBR Green Rox Plus® (LGC Biotecnologia) foram realizadas com um volume final de 25 µl e as condições para a amplificação dos genes foram: 95°C por 10 min, 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 15 segundos; temperatura de anelamento por 1 minuto), seguido de curva de dissociação padrão. Para o Fast SYBR Green Master Mix ® (AppliedBiosystems) o volume final das reações foi de 10µL, utilizando as condições de 95°C por 20 seg, 50 ciclos (desnaturação: 95°C por 3 seg; temperatura de anelamento por 30 seg), seguido de curva de dissociação padrão. A seqüência dos primers, sua concentração, tamanho do fragmento, temperatura de anelamento, e o SYBR utilizado para cada gene estão apresentados na tabela 2.1. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. As reações foram otimizadas para propiciar máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada amostra foi analisada em triplicata e a eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente.

Tabela 2.1. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do fragmento amplificado em pares de base (PB), SYBER, temperatura de anelamento (TA) e concentração de primer (nM)

Genes	Sequência	PB	SYBR	TA(°C)	nM
Dnmt1	r: GCG AGA GCG CCT CAG CTA	72	LGC	60	300
	f: AAA CAT GGG TGA TAG GAG GAG AGA				
SUV39H1	f: GGA CTG AAT CCT GCC GCA AAT ACC T	307	FAST	62	200
	r: GGC CAT GAA TCC CAA CTG CAG AAA G				
Hdac 2	f: TTA TTT GAA AAT TTA CGC ATG TT	229	LGC	56	200
	r: TTG CTC CTT TCT TAT GAT CAG TC				
Caspase-3	f: AAC AGT CAG TCA GTC AGT TGG GCA	156	LGC	60	300
	r: ACA CAC ACC CGT AGC TGT GAA GAA				
GAPDH	f: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA	119	LGC/FAST	62/60	150
	r: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T				
P-53	f: TGAGTGCACCACCATCCACTACAA	143	FAST	56	200
	r: AAACACGCACCTCAAAGCTGTTCC				

F= primer forward; R= primer reverse

$$\text{Razão} = \frac{\Delta\text{CP}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}{(E_{\text{alvo}})} \cdot \frac{(E_{\text{ref}})}{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{controle} - \text{amostra})}$$

Figura 2.6. Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E alvo é a eficiência do gene alvo; E ref é a eficiência do gene referência; CP é o ciclo *threshold*; $\Delta\text{CP}_{\text{alvo}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo; $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ é desvio de CP do controle – amostra do gene referência.

4.12 Análise Estatística

Para análise dos dados de taxa de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário foi utilizado o teste do Chi-quadrado ($P > 0,05$).

Os valores de expressão dos genes alvos foram normalizados pela expressão do gene endógeno GAPDH. A expressão relativa de cada gene foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Figura 2.6) com correção da eficiência (Pfaffl, 2001). Os dados para quantificação da expressão gênica foram comparados entre os tratamentos usando one-way análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para as amostras paramétricas e Kruskal–Wallis para os dados não paramétricos, o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

5.1.1 Experimento 1 - Avaliação da maturação nuclear, em ovócitos submetidos à vitrificação em diferentes estágios da meiose.

Nesse experimento foi avaliada a maturação nuclear e alterações na cromatina de ovócitos vitrificados em diferentes momentos durante a maturação. Ovócitos não vitrificados (grupo controle) apresentaram as maiores taxas ($P < 0,05$) de MII e menores índices ($P < 0,05$) de ovócitos imaturos, anormais e degenerados. Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada entre ovócitos dos grupos vitrificados 0, 8 e 22 horas com relação as porcentagens de ovócitos maturados, imaturos, anormais e degenerados (Tabela 2.2). O grupo vitrificado às 22 horas apresentou percentagem de imaturos e anormais semelhantes as do grupo controle ($P > 0,05\%$), entretanto apresentaram menor taxa de ovócitos em MII e maior taxa de degenerados.

Tabela 2.2. Avaliação da maturação nuclear de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro

Grupos	N ^o Ovócitos	Estágios da Meiose			
		Imaturos <i>n</i> , (%)	M II <i>n</i> , (%)	Anormais <i>n</i> , (%)	Degenerados <i>n</i> , (%)
Controle não vitrificado	80	1 (1,25%) ^a	64 (80%) ^a	9 (11,25%) ^a	6 (7,5%) ^a
Vitrificado 0 hora	84	8 (9,52%) ^b	37 (44,05%) ^b	22 (26,19%) ^{a, b}	17 (20,24%) ^b
Vitrificado 8 horas	90	5 (5,56%) ^{a, b}	45 (50%) ^b	26 (28,89%) ^b	14 (15,56%) ^{a, b}
Vitrificado 22 horas	81	5 (6,17%) ^{a, b}	45 (55,56%) ^b	16 (19,75%) ^{a, b}	15 (18,52%) ^b

^{a, b, c} Valores com letras diferentes nas mesmas colunas indicam resultados diferentes ($P < 0,05$).

5.1.2 Experimento 2 - Avaliação da taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário, em ovócitos submetidos à vitrificação, em momentos distintos durante a MIV.

Este experimento foi realizado para avaliar a capacidade de ovócitos bovinos vitrificados de serem fecundados e terem desenvolvimento embrionário normal. Com relação ao desenvolvimento embrionário os resultados são apresentados na Tabela 2.3. Os ovócitos submetidos a vitrificação, independente do tratamento, apresentaram uma menor capacidade de desenvolvimento ($P < 0,05$) após a fecundação e cultivo in vitro, mostrando menores taxas de clivagem e blastocistos do que os ovócitos do grupo controle (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Desenvolvimento embrionário a partir de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro

Grupos	N ^o Ovócitos	Clivagem	Blastocistos	Blastocistos	Blastocistos
		D2 <i>n, (%)</i>	D7 <i>n, (%)</i>	D8 <i>n, (%)</i>	D8* <i>n, (%)</i>
Controle não vitrificado	226	200 (88,5) ^a	81 (35,84) ^a	88 (38,94) ^a	88 (44,0) ^a
Vitrificado 0 hora	224	51 (22,77) ^b	6 (2,68) ^b	6 (2,68) ^b	6 (11,76) ^b
Vitrificado 8 horas	218	47 (21,56) ^b	4 (1,83) ^b	5 (2,29) ^b	5 (10,63) ^b
Vitrificado 22 horas	215	52 (24,19) ^b	9 (4,19) ^b	10 (4,65) ^b	10 (19,23) ^b

^{a, b, c} Valores com letras diferentes nas mesmas colunas indicam resultados diferentes ($P < 0,05$).

* Porcentagem de blastocisto em D8 calculado sobre número de clivados em D2.

A tabela 2.4 mostra que quando as taxas de fecundação foram avaliadas, foi observado que os ovócitos de todos os grupos submetidos à vitrificação apresentaram menor taxa de fecundação e maior taxa de degeneração, comparados ao grupo controle ($P < 0,05$). Entre os vitrificados, ovócitos dos grupos 8 e 22 horas apresentaram maiores índices ($P < 0,05$), de fecundação comparados ao grupo 0 hora. A taxa de ovócitos não fecundados foi semelhante entre todos os grupos, porém ovócitos dos grupos vitrificados apresentaram uma maior porcentagem de polispermia. A diferença mais discrepante entre ovócitos do grupo controle e os vitrificados foi observada quanto às porcentagens de degenerados, onde o grupo 0 hora foi o mais afetado ($P < 0,05$), seguido pelos grupos vitrificado com 8 e 22 horas, que foram semelhantes entre si ($P > 0,05$).

Tabela 2.4. Taxa de fecundação de ovócitos bovinos vitrificados em diferentes momentos da maturação in vitro

Grupos	N ^o Ovócitos	Não Fecundados <i>n</i> , (%)	Fecundados		
			Totais <i>n</i> , (%)	Polispérmicos <i>n</i> , (%)	Degenerados <i>n</i> , (%)
Controle não vitrificado	134	15 (11,19%) ^a	109 (81,34%) ^a	5 (3,73%) ^a	10 (7,46%) ^a
Vitrificado 0 hora	112	10 (8,93%) ^a	50 (44,69%) ^c	7 (6,25%) ^{a, b}	52 (46,43%) ^c
Vitrificado 8 horas	119	15 (12,61%) ^a	75 (63,03%) ^b	9 (7,56%) ^{a, b}	29 (24,37%) ^b
Vitrificado 22 horas	106	8 (7,55%) ^a	71 (66,98%) ^b	13 (12,26%) ^b	27 (25,47%) ^b

^{a, b, c} Valores com letras diferentes nas mesmas colunas indicam resultados diferentes ($P < 0,05$).

5.1.3 Experimento 3 - Efeito da vitrificação sobre o padrão de expressão gênica, em ovócitos bovinos.

O experimento 3 foi dividido em duas etapas. A primeira foi para caracterizar a cinética da transcrição dos genes HDAC 2, SUV39H1, Dnmt-1, P-53 e Caspase-3, durante a maturação. Para isso a abundância relativa dos transcritos destes genes, foi quantificada em diferentes momentos durante a maturação in vitro. Para este experimento foram utilizados ovócitos maturados in vitro por 0, 8, 22 ou 24 horas. A segunda etapa foi comparar a abundância relativa dos transcritos dos genes avaliados, em ovócitos do grupo controle com ovócitos submetidos à vitrificação, em momentos distintos durante a maturação in vitro. Sendo que para todos os grupos os ovócitos foram coletados após 24 de maturação.

Com relação ao padrão de expressão dos genes durante a maturação in vitro, pode-se observar que não houve alteração na abundância relativa de mRNA ($P > 0,05$), para os genes HDAC 2 e P-53 (Figura 2.5). Entretanto, uma tendência a

aumento dos transcritos para o gene SUV39H1 ($P < 0,10$) foi observado no grupo 8 horas de maturação (Figura 2.7).

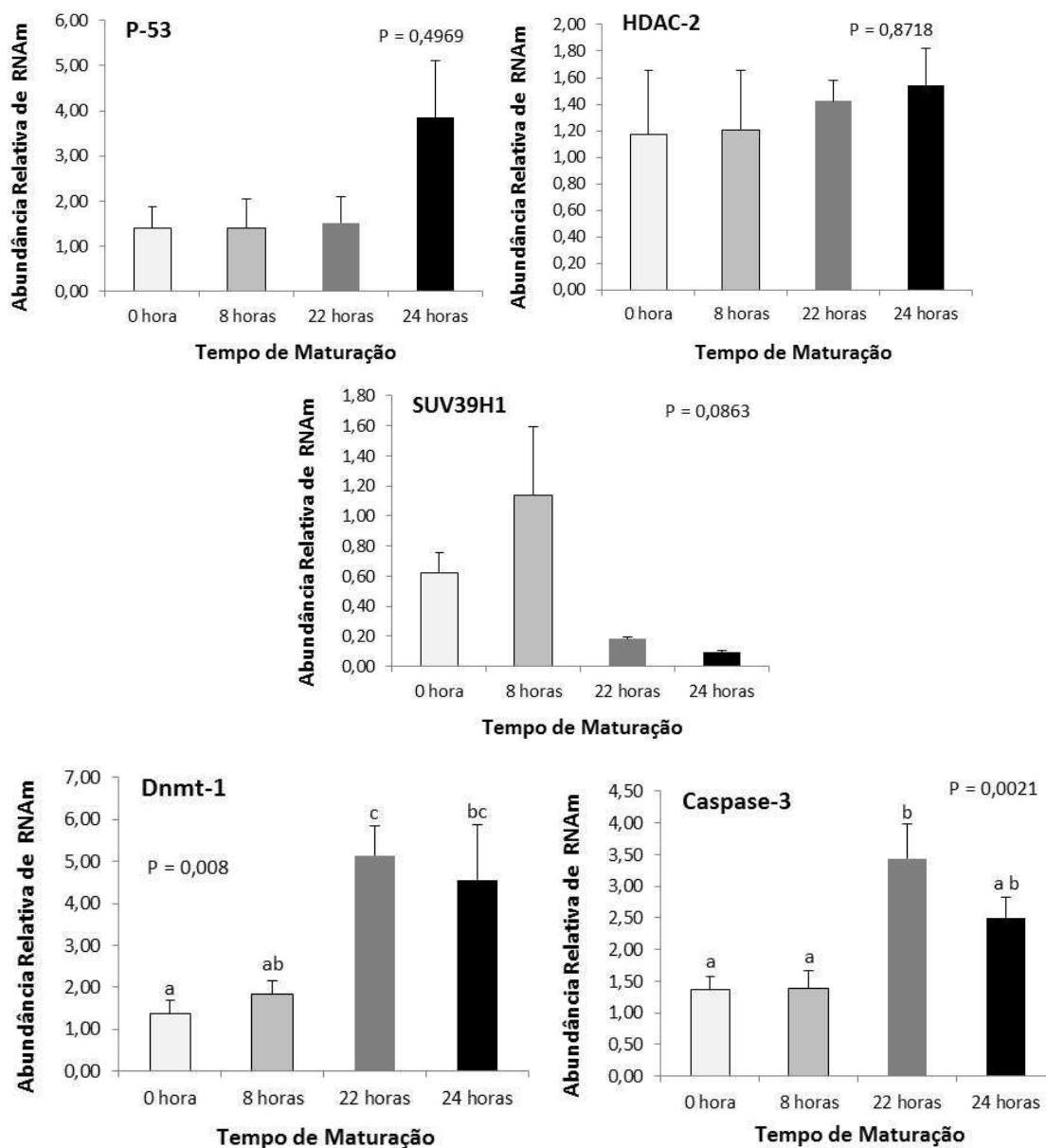


Figura 2.7. Nível de transcritos dos genes DNMT1, HDAC 2, SUV39H1, Caspase-3 e P-53, analisados por PCR em Tempo Real, em ovócitos obtidos em diferentes momentos durante a maturação in vitro (0 hora, 8 horas, 22 horas e 24 horas). Os dados (média \pm EP) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência.

^{a,b}Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Em contrastes, os genes Dnmt-1 e Caspase-3, apresentaram um comportamento diferente dos demais. Para ambos foi observado um aumento no nível dos transcritos as 22 horas maturação. Já às 24 horas os níveis foram semelhantes aos observados às 8 horas para a Dnmt-1 e às 0 e 8 para a Caspase-3 ($P < 0,05$).

Quando a quantidade relativa de transcritos dos genes estudados foi comparada entre ovócitos vitrificados em diferentes momentos da maturação e ovócitos do grupo controle, nenhuma diferença foi observada ($P > 0,05$) no nível de expressão (Figura 2.8).

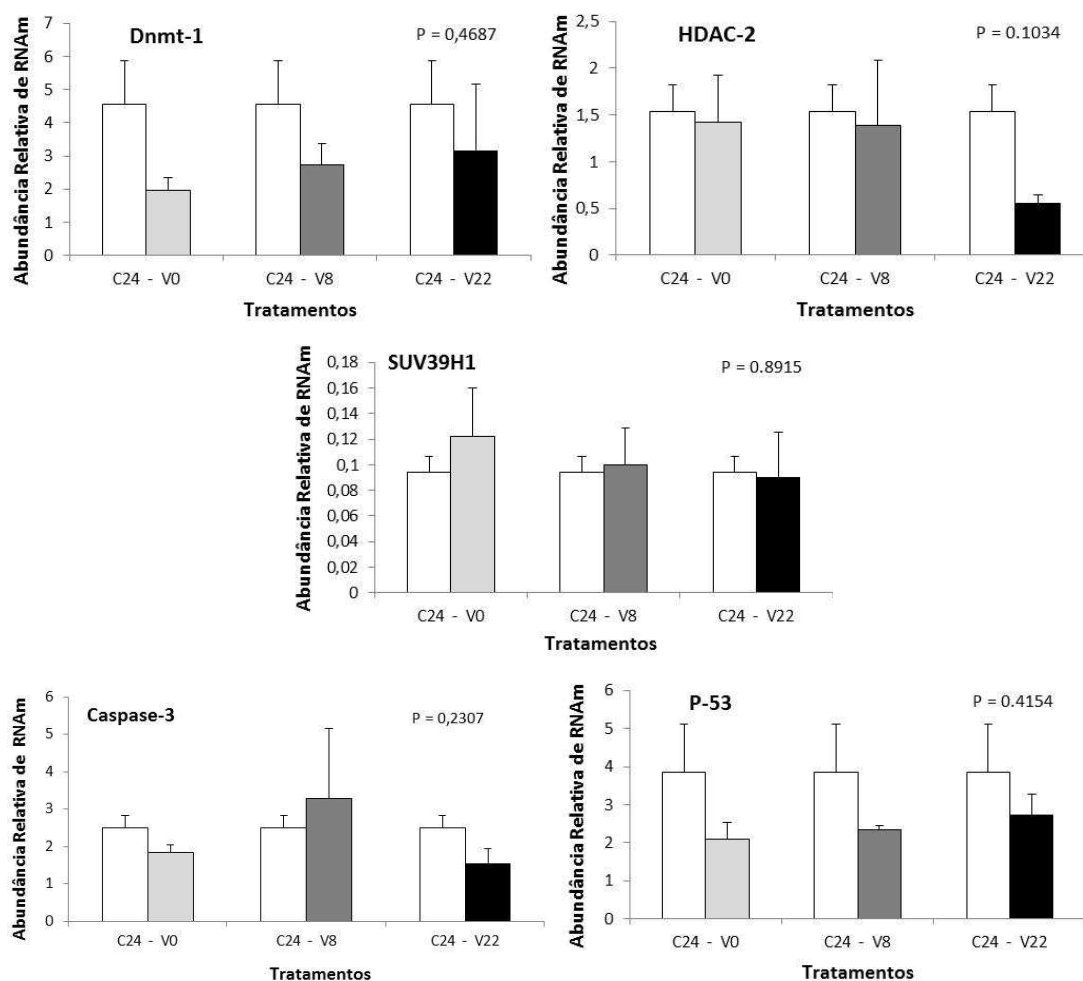


Figura 2.8. Nível de transcritos dos genes DNMT1, HDAC 2, SUV39H1, Caspase-3 e P-53, analisados por PCR em Tempo Real em ovócitos submetidos a vitrificação em as 0 (V0), 8 (V8) e as 22 horas (V22) de maturação e ovócitos não vitrificados (C24), as 24 horas na MIV. Os dados (média \pm EP) foram normalizados pelo gene GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência. Diferentes letras nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

5.2 Discussão

Atualmente a vitrificação é considerada a técnica mais eficiente para a conservação de ovócitos bovinos. Porém, os resultados obtidos até o presente ainda não permitem a sua utilização como ferramenta viável, para o armazenamento do germoplasma feminino. Nas últimas décadas as pesquisas focaram no aprimoramento dessa técnica, onde foram testadas diferentes associações de crioprotetores, inclusão de compostos no meio como o uso de proteínas “*anti freeze*”, diferentes dispositivos para armazenagem e principalmente redução do volume dos crioprotetores e aumento da velocidade de congelamento. Entre todas as alternativas resultantes desses estudos para a vitrificação de ovócitos bovinos, a metodologia do *cryotop* (Kuwayama et al., 2005) tem apresentado os resultados mais promissores, e por esse motivo foi a técnica de escolha para a realização deste estudo.

No experimento 1, foi avaliada a capacidade de ovócitos bovinos apresentarem MII normal, depois de vitrificados em momentos distintos durante a maturação.

Conforme esperado, os resultados mostraram que independente do momento da vitrificação, os grupos vitrificados apresentaram menor percentagem de ovócitos com MII normal e maior ocorrência de alterações e degeneração de cromatina do que os não vitrificados. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os grupos vitrificados. Apesar dos estudos que avaliaram o melhor momento para a vitrificação durante a maturação *in vitro* (Hochi et al., 1998; Luna et al., 2001; Brandão, 2002; Men et al., 2002), mostrarem resultados divergentes em resposta à vitrificação era esperado que alguma diferença entre os grupos. No geral, ovócitos imaturos são considerados menos resistentes à vitrificação e mais susceptíveis às lesões provocadas pelo resfriamento (Arav et al., 1996) quando comparados aos ovócitos MII (Luna et al., 2001; Albarracin et al., 2005). Além disso, as células do cumulus, necessárias ao ovócito em GV, servem como barreira mecânica, diminuindo a velocidade de penetração celular dos CPs. Portanto, o comprometimento do ovócito VG vitrificado, poderia também estar associado à perda prematura da comunicação com as células do cumulus, pelo rompimento das junções *gap*, em resposta a vitrificação (Luciano et al., 2009; Zhou et al., 2010).

Quanto aos ovócitos bovinos no estágio de GVBD, há ainda maiores controvérsias, alguns autores mostram que durante este estágio, os gametas têm uma menor sensibilidade à criopreservação, por apresentar uma maior permeabilidade aos CPs quando comparado à ovócitos VG. Mas por outro lado, eles não apresentam os fusos meióticos formados, fato que minimizaria as lesões ao citoesqueleto, distúrbio comumente observado em ovócitos MII submetidos à vitrificação (Hochi et al., 1998). Alguns autores também atribuem aos ovócitos MII a maior capacidade de suportar a vitrificação (Men et al., 2002). Nesse estágio o ovócito já concluiu a meiose resultando em menores problemas com a expulsão do primeiro corpúsculo polar, e apresenta uma distribuição de organelas adequada para a fecundação. Outro motivo pelo qual ovócitos vitrificados com 22 horas seriam mais resistentes é que esses já estando maturados não mais necessitam das células do cumulus, fato que permitiria a remoção das mesmas antes da vitrificação (Zhou et al., 2010), facilitando a entrada dos CPs.

Considerando que os ovócitos vitrificados às 22 horas, que presumivelmente já teriam completado a MII, apresentaram a mesma taxa de MII do que os vitrificados em outros momentos, pode-se inferir que o dano causado pela vitrificação foi muito severo. Isso pode ser constatado pela rapidez em que os efeitos prejudiciais da vitrificação foram detectados, ou seja, em um período de apenas duas horas já ocorreu um aumento significativo na percentagem de ovócitos com cromatina anormal e degenerados.

O segundo experimento avaliou a funcionalidade do ovócito, submetido à vitrificação, quanto a sua capacidade de clivar e se desenvolver até o estágio de blastocisto, após a fecundação *in vitro*. De forma semelhante ao observado para a maturação nuclear, o estágio da meiose em que o ovócito foi vitrificado não afetou a taxa de clivagem e produção blastocistos. Entretanto, o processo de vitrificação causou uma redução drástica na produção de embriões, com taxas de blastocistos inferiores a 5%. Esses resultados estão de acordo com a maioria dos relatados na literatura, entretanto estudos recentes obtiveram taxas em torno de 10% quando ovócitos em estágio de VG foram vitrificados pelo método de *cryotop* Zhou et al. (2010). Ainda com relação ao desenvolvimento embrionário é importante observar que além dos danos que já podem ser observados nos ovócitos logo após a maturação e fecundação, outros aspectos bioquímicos do ovócito, que só se manifestam posteriormente no desenvolvimento, também podem ter sido afetados. Isso porque após a clivagem, em torno de 15% dos ovócitos se desenvolveram até o estágio de blastocisto comparado

com mais de 40% no grupo controle. Entretanto, apesar do pequeno número de blastocistos obtidos, os resultados mostram que é possível produzir embriões de ovócitos vitrificados em qualquer estágio da maturação estudado. A avaliação da qualidade embrionária, através da contagem de células, coloração diferencial e mesmo a transferências dos embriões produzidos a partir dos ovócitos vitrificados (Vieira et al., 2002), poderia ter gerado melhores informações, sobre a qualidade dos blastocistos oriundos de cada grupo de ovócitos vitrificados.

Durante a maturação do ovócito, as organelas citoplasmáticas estão sujeitas aos processos de remodelação e redistribuição, sendo que a vitrificação tem sido relatada como causadora de alterações nesses processos. Os grânulos corticais estão entre as organelas mais susceptíveis aos danos em decorrência da vitrificação. Normalmente depois da MIV, estes grânulos apresentam uma distribuição periférica e isolada, e quando vitrificados organizam-se em grupos. Esta alteração pode provocar uma falha na liberação do cálcio, necessária ao bloqueio da polispermia, o que poderia causar uma redução no desenvolvimento embrionário. A criopreservação também pode causar uma liberação prematura do conteúdo dos grânulos corticais causando endurecimento da zona pelúcida dificultando também a fecundação. Portanto, avaliar se as baixas taxas de clivagem encontradas não foram devido a problemas no processo de penetração do espermatozóide no ovócito, foi também avaliada a capacidade dos ovócitos vitrificados nos diferentes momentos da MIV de serem fecundados. Os resultados mostraram que independente do momento da maturação, ovócitos vitrificados às 0, 8 ou 22 horas apresentavam comprometimento da fecundação, comparados aos do grupo controle. Entretanto, esses grupos vitrificados também apresentaram uma maior taxa de degeneração o que justificaria a menor fecundação. Dentre os grupos vitrificados o grupo à 0 hora (VG) foi o mais afetado, apresentando as menores taxas de fecundação e maiores taxas de degeneração. Esses resultados sugerem que as baixas taxas de clivagem não foram devido a problemas na penetração, mas sim a alta taxa de degeneração dos ovócitos já no momento da fecundação. É interessante observar que o grupo vitrificado à 0 hora, apesar de ter menor taxa de fecundação, apresentou taxa de clivagem semelhante aos vitrificados às 8 e 22 horas. É possível que o processo de degeneração nesses dois grupos ainda não tinha sido desencadeado no momento da fecundação e, quando retirados para avaliação às 18 horas de co-cultivo ainda apresentavam-se normais. Como nesses grupos a vitrificação foi realizada mais tarde do que no 0 hora, o processo degenerativo também se completaria mais tarde, ou

seja, após a avaliação da fecundação. Associando todos esses resultados pode-se supor que a degeneração da cromatina foi o principal dano observado em resposta a criopreservação.

Além das avaliações morfológicas e funcionais realizadas nos experimentos 1 e 2, a quantificação de transcritos de genes ligados a processos biológicos importantes para o ovócito, tais como apoptose e padrão epigenético, foram realizadas no experimento 3. O correto padrão epigenético, que regula a atividade dos genes, é essencial para a fecundação e desenvolvimento embrionário normal. Estudos têm indicado que modificações epigenéticas são as principais responsáveis pelas modificações na dinâmica da estrutura da cromatina e na consequente regulação da expressão gênica (Xue et al., 2010). Essas modificações envolvem dois principais eventos, a metilação do DNA e as modificações nas histonas (metilação e acetilação) (Prather et al., 2009). Sendo que o controle dessas modificações é feita por ação de enzimas tais como DNA metiltransferases (DMNTs), histona acetilase (HAT1), e histona desacetilase (HDAC2). O outro evento importante para a célula é a apoptose. A avaliação do perfil de expressão de genes relacionados poderia auxiliar na elucidação dos efeitos da vitrificação no ovócito. Na célula, o início da apoptose é originado por um sinal, que é recebido a nível de membrana ou de organelas e, posteriormente moléculas como as transcritas pelo gene P-53 são ativadas. Essa mensagem então é transmitida para reguladores centrais, que são fatores pró e anti- apoptóticos (BAX e Bcl-2). Se a célula “decidir” pela morte, é ativado então o quarto estágio, que é mediado pela atividade de fatores promotores de morte celular a exemplo da Caspase-3.

Inicialmente foi determinado o perfil de expressão desses genes durante o período de maturação e, posteriormente foi quantificado o nível de transcritos em resposta a vitrificação pelo método do *cryotop*.

Dos cinco genes avaliados dois apresentaram um aumento na expressão e um uma tendência de aumento de expressão durante o período de maturação. Esses resultados estão em desacordo com a literatura (Van Den Hurk & Zhao, 2005; Sirard et al., 2006) que na maioria das pesquisas concordam não haver transcrição no período entre a retomada da meiose e a ativação do genoma, que no bovino ocorre no período de 8-16 células. Além disso, durante esse período há formação de heterocromatina, fato que torna o DNA teoricamente menos passível ao processo de transcrição. Entretanto, recentemente um estudo em ovócitos bovinos mostrou um aumento da expressão dos genes PLAU, ANXA 1, STC 1, SERPINE 1, doze horas após o início da maturação e

dos genes *STC 1* e *LUM* em ovócitos MII (Mamo et al., 2011). Esses resultados, apesar de serem os únicos na literatura que suportam os nossos achados, reforçam que é possível ocorrer a transcrição após a retomada da meiose, e sugerem a necessidade de mais estudos para comprovar esse fato.

Um aumento nos níveis de transcritos do genes *Dnmt-1* foi observado as 22 horas de maturação. A *Dnmt-1* é a enzima responsável pela manutenção da metilação e está comumente associada aos processos de replicação do DNA, porém sua presença também foi relatada durante a gametogênese (Lodde et al., 2009; Bessa, 2011). Logo após a fecundação começam as divisões mitóticas sucessivas e a demetilação do DNA, que só não pode ocorrer nos genes *imprint*. Portanto, pode-se especular que este aumento de mRNA da *Dnmt-1* no final da maturação seja necessário para garantir a manutenção da metilação dos genes *imprint*. Ainda, é importante ressaltar que após a ativação do genoma, a transcrição é realizada pelo embrião, durante este período há um processo intenso de metilação global de DNA, é possível que este aumento de expressão, seja ao menos em parte, necessário para a manutenção, durante os primeiros ciclos. Outra hipótese a ser considerada para justificar a diferença significativa observada, seria que mesmo durante a MIV haver uma baixa transcrição, possivelmente ocorreu um decréscimo acentuado na tradução deste mRNA. O período que antecede a retomada da meiose é marcado por um DNA com altos níveis de metilação, depois da GVBD com a progressão da meiose pode haver ocorrido uma queda brusca nessa tradução, fato que associado com uma “leve” transcrição resultaria em diferenças detectáveis no ovócito MII comparado ao VG.

Além da *Dnmt-1*, aumento na expressão do gene da Caspase-3 foi também observado às 22 horas de maturação. Apesar da Caspase-3 ser uma enzima presente no estágio final da apoptose, sua presença não indica necessariamente sua atividade. O ovócito deve ser fecundado logo após atingir MII, caso isso não ocorra é normal que entre em apoptose. Para que isso aconteça os estoques de transcritos do gene Caspase-3 devem estar armazenadas para que possam ser utilizados quando necessário. Porém a necessidade de mensuração da atividade da Caspase-3, pode avaliar o real comprometimento do ovócito, pela via da apoptose (Men et al., 2003).

Foi observada também durante o período de maturação uma tendência ao aumento na transcrição do gene da histona lisina metiltransferase (*SUV39H1*), que é responsável pela metilação da H3/K9, o qual estimula a repressão da transcrição. Esse aumento ocorreu nas primeiras 8 horas de maturação, possivelmente porque o ovócito

após retomar a meiose precisa acabar de formar a heterocromatina, que é a cromatina mais compactada, com menores níveis de transcrição que é característico dessa fase. Apesar do presente estudo verificar que ocorreu transcrição durante a maturação, esse evento não é o padrão geral desse período.

Quando a quantidade relativa de transcritos foi avaliada em ovócitos vitrificados em diferentes momentos da maturação não foi observado para nenhum dos dois genes de apoptose (Caspase-3 e P-53) investigados, alterações em decorrência da vitrificação. Este achado está em concordância com outros autores que também não observaram alterações na abundância de transcritos de genes ligados a apoptose (Anchamparuthy et al., 2010; Ebrahimi et al., 2010). Apesar de ter sido especulado o uso de marcadores de apoptose como ferramenta para elucidar os efeitos deletérios da criopreservação, é preciso ter em mente que este é um processo normal à célula. A apoptose é a morte celular programada, evento necessário para manutenção da homeostase em vários processos biológicos, não necessariamente sendo causada por um fator externo, como, por exemplo, o estresse térmico. Esses resultados sugerem que pode haver outra via responsável por induzir a degeneração do ovócito após a vitrificação. Outra via provável para a degeneração seria a via de necrose celular.

A vitrificação, assim como observado para os genes relacionados a apoptose, não foi capaz de alterar a abundância dos transcritos dos genes responsáveis pelo controle epigenético, quando comparado aos ovócitos do grupo não vitrificado, maturado por 24 horas. Chamayou e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de diferentes métodos de criopreservação em ovócitos humanos e observaram uma redução na abundância relativa de mRNA de sete dos 18 genes avaliados. É possível que se um maior número de genes tivesse sido avaliado no presente estudo o efeito da vitrificação na integridade molecular também tivesse sido detectada.

Ficou claro nesse estudo que a degeneração é o maior problema dos ovócitos vitrificados, e que essa possivelmente não aconteça por apoptose mas por outra via. Entretanto, conhecer mais da resposta molecular assim como de outros aspectos tais como as alterações ao citoesqueleto e às organelas após a vitrificação, é necessário para identificar os eventos e ou estruturas mais afetadas. Somente com esses conhecimentos será possível proteger o ovócito através de manipulação seja das soluções ou dos métodos de vitrificação e com isso aumentar a eficiência da técnica.

6 CONCLUSÕES

A vitrificação por *cryotop* independente do estágio da meiose em que é realizada afeta negativamente a maturação nuclear, padrões de fecundação, índices de clivagem e desenvolvimento embrionário. Entretanto, possibilita o armazenamento de ovócitos bovinos em N₂L, sem alterar padrões de expressão de alguns genes relacionados ao controle epigenético e a apoptose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal reproduction science**. v. 108, p. 49-65, 2008.

ALBARRACIN, J. L.; MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T. Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocytes and their subsequent development. **Molecular reproduction and development**. v. 72, p. 239-49, 2005.

ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S. B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; CROWE, J. H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 33, p. 589-99, 1996.

BESSA, I. R. **Perfil da expressão de genes candidatos para a aquisição da competência durante o crescimento ovocitário em bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 71p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

BOISO, I.; MARTI, M.; SANTALO, J.; PONSÁ, M.; BARRI, P. N.; VEIGA, A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. **Human reproduction**. v. 17, p. 1885-91, 2002.

BRANDÃO, D. O. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes momentos da maturação in vitro**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Belo Horizonte, 2002, 61p. Dissertação de Mestrado. – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

COBO, A.; BELLVER, J.; DOMINGO, J.; PEREZ, S.; CRESPO, J.; PELLICER, A.; REMOHI, J. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 17, p. 68-72, 2008.

DIEZ, C.; DUQUE, P.; GOMEZ, E.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNANDEZ, A.; FACAL, N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**. v. 64, p. 317-33, 2005.

EBRAHIMI, B.; VALOJERDI, M. R.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; BAHARVAND, H.; FARROKHI, A. IVM and gene expression of sheep cumulus-oocyte complexes following different methods of vitrification. **Reproductive biomedicine online**. v. 20, p. 26-34, 2010.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 32, p. 139-56, 1995.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 49, p. 787-96, 1998.

HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**. v. 50, p. 1285-99, 1998.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**. v. 11, p. 300-8, 2005.

LODDE, V.; MODINA, S. C.; FRANCIOSI, F.; ZUCCARI, E.; TESSARO, I.; LUCIANO, A. M. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. **European journal of histochemistry : EJH**. v. 53, p. 199-207, 2009.

LUCIANO, A. M.; CHIGIONI, S.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; LUVONI, G. C.; MODINA, S. C. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. **Cryobiology**. v. 59, p. 90-5, 2009.

LUNA, H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal reproduction science**. v. 68, p. 23-8, 2001.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; FILHO, E. S.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 71, p. 1289-97, 2009.

MAMO, S.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; LEAL, C. L.; AL NAIB, A.; MCGETTIGAN, P.; MEHTA, J. P.; EVANS, A. C.; FAIR, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC genomics**. v. 12, p. 151, 2011.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**. v. 47, p. 73-81, 2003.

MEN, H.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**. v. 57, p. 1095-103, 2002.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**. v. 57, p. 137-41, 2008.

PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**. v. 44, p. 859-69, 1995.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**. v. 29, p. e45, 2001.

RACEDO, S. E.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; SALAMONE, D.; NIEMANN, H. Effects of follicle size and stages of maturation on mRNA expression in bovine in vitro matured oocytes. **Molecular reproduction and development**. v. 75, p. 17-25, 2008.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**. v. 141, p. 1-19, 2011.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**. v. 65, p. 126-36, 2006.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular reproduction and development**. v. 51, p. 53-8, 1998.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 63, p. 1717-51, 2005.

VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D. P.; LEHMKUHL, R. C.; RUBIN, M. I.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**. v. 45, p. 91-4, 2002.

XUE, K.; SONG, J.; WEI, H.; CHEN, L.; MA, Y.; LIU, S.; LI, Y.; DAÍ, Y.; ZHAO, Y.; LI, N.; Synchronous behaviors of CBP and acetylations of lysine 18 and lysine 23 on histone H3 during porcine oocyte first meiotic division. **Molecular Reproduction & Development**, v.77, p.605–614, 2010.

ZHOU, X. L.; AL NAIB, A.; SUN, D. W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the *Cryotop* method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**. v. 61, p. 66-72, 2010.