

SILVÉRIO BUNN

**ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA
CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS.**

LAGES – SC

2007

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

SILVÉRIO BUNN

**ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA
CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS.**

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

Orientador: Professor Alceu Mezzalira

Lages –SC

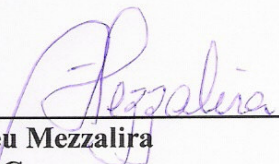
2007

ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS.

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

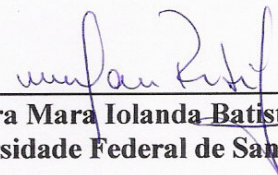
Banca examinadora

Orientador:



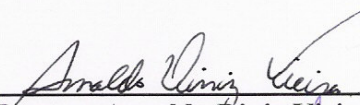
Doutor Alceu Mezzalira
CAV-UDESC

Membro:



Doutora Mara Iolanda Batistella Rubin
Universidade Federal de Santa Maria

Membro:



Doutor: Arnaldo Diniz Vieira
CAV-UDESC

Membro



Doutor: Marcelo Bertolini
CAV-UDESC

Lages 17/02/2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC)

Bunn, Silvério

Estratégia para aumentar a eficiência da
criopreservação de oócitos bovinos imaturos / Silvério
Bunn – Lages, 2007.

49p.

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

1. Nitrogênio. 2. Ovos – Incubação. 3. Bovino –
Inseminação artificial. 4. Criopreservação . I.Título.

CDD – 636.208926

SUMÁRIO

Agradecimentos	VI
Lista de tabelas.....	VII
Lista de figuras.....	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Resumo	X
Abstract	XI
Introdução	01
Revisão de literatura	03
1) Aspectos históricos da criopreservação	03
2) Vitrificação como método de criopreservação celular	05
3) Metodologias abertas de Vitrificação	08
4) Eliminação do vapor de nitrogênio	13
Estratégia para aumentar a eficiência da criopreservação de oócitos bovinos imaturos.	
Artigo a ser enviado para Periódico Especializado	16
Resumo	17
Abstract	19
Introdução	21
Material e métodos	23
Experimento I	27
Experimento II	28
Resultados	29
Discussão	32
Conclusões.....	36
Referências	37
Discussão e conclusão geral	39
Referências	41
Anexos	45
Anexo 01	46
Anexo 02	48

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos dons concedidos, pois é com a fé e a confiança de sua presença que nos motivamos para enfrentar os obstáculos.

Aos meus Pais Valdir e Adélia, pelo apoio e zelo em todos os momentos de minha vida, independente da distância que nos encontrávamos.

Ao meu tio Valmor, que sempre foi confiante da minha capacidade e sempre me apoiou e motivou.

A minha família: Silvia, Luiz e Ana Carolina que sempre foram luz para minha caminhada.

As minhas primas Tuti e Zinha, que junto com toda sua família sempre acompanharam minha caminhada, sendo fontes de estímulo e torcedoras para o meu sucesso.

A minha companheira Andréa, que encontrei nesta caminhada e que é fonte de estímulo, alegria, orgulho e ao final do dia paz.

A equipe do laboratório: Fabiano, Ivens, Renato, Kelyn, Joana, Eduardo, Leonardo, Mateus, Joana, Saul, Pedro...

Ao frigorífico Verdi, em especial ao senhor Valdecir, pela dedicação e apoio.

Agradeço em especial aos doutores Arnaldo, Alceu e Marcelo pelos conhecimentos compartilhados e pelas excepcionais pessoas que são, de um profissionalismo e caráter inquestionável.

Agradeço ainda a Doutora Mara Iolanda Batistella Rubin e ao Doutor Carlos Antonio Mondino Silva pelos conhecimentos repassados e pelos primeiros incentivos na busca pela pesquisa.

E finalmente agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente em minha caminhada.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Primeiros nascimentos resultantes de embriões mamíferos criopreservados.....04

Tabela 2 – Taxas de clivagem e blastocistos obtidas de oócitos bovinos imaturos, envasados em diferentes suportes e vitrificados em nitrogênio líquido super resfriado 30

Tabela 3 – Taxas de blastocistos e percentual de eclosão de embriões obtidos de oócitos bovinos imaturos vitrificados em diferentes suportes30

Tabela 4 – Taxas de clivagem e blastocistos obtidas de oócitos bovinos imaturos, vitrificados em palhetas metálicas, com N₂ líquido super resfriado e diferentes concentrações de crioprotetores na solução de vitrificação (SV)31

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Grades de microscopia eletrônica contendo oócitos.....	09
Figura 02	OPS – Palhetas abertas e estiradas empregadas na vitrificação.....	09
Figura 03	Representação esquemática do nylon mesh.....	10
Figura 04	Micropipeta de vidro.....	11
Figura 05	Representação esquemática do cryoloop.....	11
Figura 06	Gel-Loading Tip.....	12
Figura 07	Representação esquemática Hemi-straw.....	12
Figura 08	Representação esquemática do solid surface vitrification.....	14
Figura 09	Equipamento comercial Vit-IMT usado na vitrificação	15
Figura 10	Equipamento Nitrocooler empregado para vitrificação.....	15

LISTA DE ABREVIATURAS

CCO's – Complexo *Cumulus* Ovócitos.

N₂ – Nitrogênio

DMSO – Dimetil Sulfóxido.

EG – Etileno Glicol.

FSH – Hormônio Folículo Estimulante.

GL-tip – Gel Loading Tip.

LF-Líquido Folicular.

LH – Hormônio Luteinizante.

OPS – Open Pulled Straw.

PB – Palheta em Bisel

MV – Micropipeta de Vidro

PM - Palheta Metálica

GC – Grupo Controle

SV – Solução de Vitrificação

PBS – Phosphated Buffered Saline Solution.

SEE – Soro de Égua em Estro.

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

TCM - Tissue Culture Medium.

VG – Vesícula Germinativa.

RESUMO

A otimização da técnica de vitrificação de oócitos é um dos principais objetivos da criobiologia, pois possibilitará a formação de bancos de germoplasma para manutenção da biodiversidade animal, além de se constituir num importante instrumento na produção de animais transgênicos, clones ou programas de produção *in vitro* de animais. É consenso que a vitrificação é o método mais adequado para criopreservar oócitos e que elevadas taxas de resfriamento melhoram a viabilidade da técnica. Para avaliar o uso de materiais com diferentes condutividade térmica na vitrificação (Experimento 1), 1454 oócitos foram utilizados. Inicialmente os oócitos foram expostos a 10% EG + 10% DMSO + 20% soro de égua em estro (SEE), em TCM Hepes, por 30 segundos. Após, grupos de 5 ou 6 oócitos foram submetidos à solução de vitrificação (SV) composta de 20% EG + 20% DMSO e 0,5M Sacarose, durante 20 segundos, período em foram envasados e mergulhados em nitrogênio super-resfriado. O envase foi realizado em PM (palheta metálica inoxidável, n=265), MV (micropipeta de vidro, n=279), PB (palheta cortada em bisel, n=280), OPS (open pulled straw, n=272). Simultaneamente, um grupo não vitrificado serviu como controle, (GC n=358). No Experimento 2, 709 oócitos foram vitrificados com concentrações reduzidas (25 e 50%) de crioprotetores. Inicialmente os oócitos foram expostos, por 30 segundos, a uma solução de 10% EG + 10% DMSO + 20% SEE, em TCM Hepes. Logo após, foram expostos, por 20 segundos, a uma das soluções de vitrificação: SV100 (n=187), 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sacarose; SV75 (n=187), 15% de EG + 15% de DMSO e 0,375M de sacarose; ou SV50 (n=146), 10% de EG, 10% de DMSO + 0,25M de sacarose, além de um grupo controle não vitrificado (n=189). O reaquecimento foi realizado pela exposição (5 minutos cada) às soluções decrescentes de sacarose (0,30 e 0,15M), aquecidas a 35°C. Os oócitos foram então maturados e fecundados, e os prováveis zigotos cultivados em meio SOFaaci, à 39°C. As taxas de clivagem, de blastocistos e eclosão foram utilizadas com critérios de viabilidade. No experimento 1 não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) nas taxas de clivagem dos tratamentos, que foram inferiores ($P < 0,05$) ao grupo controle. A maior taxa de blastocistos nos grupos vitrificados foi obtida com o tratamento PM (10,2%), que foi superior ($p < 0,05$) aos tratamentos OPS (6,1%) e PB (6,1%), não diferindo do grupo MV (8,0%), embora com tendência de ser superior ($p < 0,1$). Também as taxas de eclosão nos grupos tratados foram semelhantes, sendo inferiores as do grupo controle. No experimento 2, não houve diferença na clivagem entre os tratamentos SV100 e SV75, sendo ambos superiores ($P < 0,05$) ao tratamento SV50. Na taxa de blastocistos, houve diferença entre todos os tratamentos ($p < 0,05$). A maior taxa foi obtida com o grupo controle (38,0%), seguido do tratamento SV100 (10,1%), SV75 (7,6%) e SV50 (0,5%), respectivamente. As taxas de eclosão dos grupos SV100 e SV75 foram semelhantes, sendo inferiores ($p < 0,05$) ao controle. No grupo SV50 não houve eclosão. Conclui-se que o aumento da velocidade de resfriamento melhora a viabilidade pós vitrificação de oócitos bovinos imaturos, sendo que as palhetas metálicas são mais efetivas que os recipientes de menor condutividade (palhetas plásticas), com uma tendência de superioridade quando comparada à micropipeta de vidro. Ainda, a redução dos crioprotetores em percentual igual ou superior a 25% não permite uma adequada crioproteção na vitrificação de oócitos bovinos, com a metodologia proposta neste estudo.

PALAVRAS CHAVE: Vitrificação, Palheta metálica, Micropipeta de vidro, Oócito, Bovino.

ABSTRACT

The main objective of Cryobiology is the optimization of an oocyte cryopreservation technique. It will permit to create germoplasm banks for maintenance of animal biodiversity, serving as an important instrument in transgenic, cloned or in vitro produced animals. It is consensus that the vitrification is the best method to cryopreserve oocytes and that high cooling rates improve the viability. To evaluate the use of carrier tools with different thermal conductivity in vitrification, 1.454 oocytes (Experiment 1) were 30 seconds exposed to 10% EG + 10% DMSO + 20% estrus mare serum (SEE) in TCM Hepes. Just after, groups of 5 or 6 oocytes were exposed (20 seconds) to vitrification solution (SV - 20% EG + 20% DMSO and 0.5M Sucrose). They were loaded in PM (stainless metallic straws, n=265), MV (glass micropipette, n=279), PB (straw bevel cuted, n=280), OPS (open pulled straw, n=272) or maintained without vitrification GC (control group n=358). Vitrification was obtained by plunging it in super cooled liquid nitrogen. In the experiment 2 (n=709) the aim was to evaluate bovine oocytes vitrification in reduced (25 and 50%) cryoprotectants concentration. Oocytes were 30 sec. exposed to the first cryoprotectant solution, and just after during 20 seconds to one of the allows vitrification solutions: SV100 (n=187), 20% EG + 20% DMSO + 0.5M Suc; SV75 (n=187), 15% of EG + 15% of DMSO and 0.375M of Suc; or SV50 (n=146), 10% of EG, 10% of DMSO + 0.25M Suc. A non vitrified group (n=189) was used as control. The re-warming was performed by exposure (5 minutes each) to decreasing sucrose solutions (0.30 and 0.15M), heated up to 35°C. The oocytes were then matured, fertilized, and the presumptive zygotes cultured in SOFaaci medium, at 39°C, in saturated humidity. Cleavage, blastocysts and hatching rates were used as viability criteria. In the experiment 1 there was not differences in cleavage rates ($p>0.05$) among treatments, that were lower ($P <0.05$) than control group. In the vitrified groups, higher blastocyst rates were obtained with PM treatment (10.2%), that was lower ($P <0.05$) than the OPS (6.1%) and PB (6.1%) treatments, not differing from the MV group (8.0%), although with tendency of be higher ($P <0.1$). The treated groups had identical hatching rates, which were lower than the control group. In the second experiment, there was not difference in the cleavage rate among SV100 and SV75 treatments, being both higher ($p <0.05$) than the SV50 treatment. In the blastocyst rates, there was difference among all groups ($P <0.05$). The higher rate was obtained in control group (38.0%), followed by the SV100 (10.1%), SV75 (7.6%) and SV50 (0.5%) treatments, respectively. The hatching rates of SV100 and SV75 groups were similar, being lower ($P <0.05$) than control group. In the SV50 group none blastocyst hatched. We conclude that increasing cooling speed rates improves the viability of immature vitrified bovine oocytes, and that the metallic straws are more effective than recipients of lower conductivity (plastic straws), with a tendency of superiority when compared to the glass micropipette. Still, the reduction of the cryoprotectors in 25% or up does not allow an appropriate cryoprotection to vitrify bovine oocytes, in the conditions of this study.

Key Words: Vitrification, Glass Micropipette, Metallic straw, Oocytes, Bovine.

INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos dos criobiologistas é o desenvolvimento de uma metodologia adequada para criopreservar oócitos. O armazenamento destas estruturas permite a produção de embriões no momento em que existam receptoras disponíveis. Também possibilita aos pesquisadores eliminar obstáculos relativos a flutuações na disponibilidade ou qualidade de oócitos, e adicionalmente, teria um grande impacto conservacionista, facilitando a preservação de raças ou linhagens ameaçadas de extinção (MEZZALIRA e VIEIRA, 2006). Constitui-se ainda num importante instrumento auxiliar na produção de animais transgênicos, clones ou programas de produção *in vitro* de animais, após ovum pick-up.

As primeiras tentativas de criopreservar oócitos empregaram as metodologias já utilizadas para criopreservar embriões, entretanto os resultados foram desapontadores. Isto ocorreu em função das características particulares dos oócitos, que dificultam a criopreservação. Os oócitos bovinos são estruturas de grande tamanho, baixo coeficiente de permeabilidade, apresenta um complexo citoesqueleto, além de estarem envolvidos pelas células do cumulus, fatores estes que interferem negativamente na sobrevivência, após a criopreservação (LEDDA et al., 2001).

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram orientados na busca de uma alternativa adequada para criopreservar oócitos. O processo de vitrificação é apontado como a alternativa mais viável para se atingir este objetivo. Nos diferentes métodos de vitrificação propostos, dois pontos aparecem com destacada importância, a possibilidade de aumentar a velocidade de resfriamento e a concomitante redução da concentração de crioprotetores. Na busca do aumento da velocidade de resfriamento, a primeira estratégia apontada pela pesquisa foi o contato direto da amostra a ser vitrificada com o N₂ líquido, o que marcou o início da fase das chamadas metodologias abertas. Demonstrado o efeito benéfico do aumento da velocidade de resfriamento, ampliou-se a busca por outras estratégias, para obter taxas ainda mais elevadas. Uma forma proposta foi a eliminação do vapor de N₂, que tem efeito isolante durante o processo de vitrificação. Como alternativas sugeridas para superar este entrave, Dinnyés et al. (1999) propuseram a vitrificação pelo contato direto da amostra em uma superfície metálica resfriada, a chamada “solid-surface vitrification,” que consiste em colocar os oócitos em gotas

de 1 a 2 µl de solução de vitrificação, depositada diretamente sobre uma superfície metálica pré-resfriada (-150 a -180°C), parcialmente submersa em N₂.

Outra estratégia proposta pelos pesquisadores para eliminar o efeito isolante da vaporização do N₂ consiste na aplicação de vácuo sobre o mesmo. Nestas condições ocorre redução da temperatura do N₂ e o bloqueio da sua ebulição. O emprego deste N₂ super-resfriado, na vitrificação, foi avaliado pela primeira vez por Steponkus et al. (1990), que vitrificaram embriões de *Drosophila melanogaster*.

Com oócitos, o N₂ super-resfriado voltou a ser utilizado por Martino et al. (1996), que vitrificaram oócitos maturados em grades de microscopia eletrônica, imersas diretamente no N₂. O passo seguinte foi o emprego de equipamentos que otimizavam o emprego do N₂ super-resfriado, como o Vit-IMT (ARAV et al., 2000). O elevado custo deste equipamento restringiu muito sua aplicação nos diferentes laboratórios. Como alternativa, foi desenvolvido um equipamento utilizado com sucesso na vitrificação de oócitos bovinos, o Nitrocooler (WERLICH et al., 2006; BUNN et al., 2006).

Embora com todos estes avanços, ainda hoje não existe um protocolo adequado para se criopreservar oócitos, sendo necessário estabelecer métodos que possam ter alta viabilidade para os diferentes estágios de desenvolvimento oocitário.

Com o atual nível de conhecimento, sabe-se que a vitrificação do líquido pode ser favorecida por duas vias. A primeira com o aumento da queda de temperatura da amostra a ser vitrificação e a segunda através do emprego de materiais que possibilitem uma transferência mais rápida de calor. Todavia, a taxa de transferência de calor durante o processo de vitrificação pode variar extremamente em função do tipo de suporte utilizado. Desta forma, é oportuno avaliar materiais de maior condutividade térmica no processo de vitrificação. Segundo Liebermann et al. (2002) o aumento da velocidade de condução térmica e a redução da concentração de crioprotetores são as estratégias ideais para a criopreservação de células e tecidos, com a metodologia de vitrificação.

O presente estudo foi conduzido em dois experimentos. O primeiro, com o objetivo de avaliar suportes de diferentes condutividades térmicas sobre o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos imaturos e vitrificados em N₂ super-resfriado. O segundo com o objetivo de avaliar a possibilidade de redução da concentração de crioprotetores, concomitante ao aumento da velocidade de resfriamento da amostra.

REVISÃO DE LITERATURA:

1) Aspectos históricos da Criopreservação

A criopreservação de células sempre despertou a curiosidade dos pesquisadores, tanto no passado, como na atualidade. Com essa curiosidade o Dr. Christopher Polge e seus colegas, em 1949 na Universidade de Cambridge, tentavam repetir um experimento de 1941, cujos pesquisadores testaram soluções de levulose no congelamento de sêmen. Após alguns meses de estudos, várias soluções foram testadas e os resultados apresentaram-se negativos exceto um, que preservou a motilidade dos espermatozóides de galo após o congelamento à temperatura de -79°C . A descoberta foi acidental, já que naquele momento os autores não sabiam a constituição da substância que havia preservado os espermatozóides. Com o auxílio de análises químicas, foi constatado que a amostra continha água, glicerol e proteína. Desta forma, embora por caminhos pouco convencionais, foi revelada a capacidade crioprotetora do glicerol. Esta descoberta foi um marco histórico que proporcionou um grande impulso nas técnicas de criopreservação. Já em 1951, nascia Frosty I, primeiro bezerro resultado do uso de sêmen congelado, iniciando assim uma grande expansão da técnica de inseminação artificial.

A partir da década de 60, a comunidade científica e especialmente o Dr. Peter Mazur, desenvolveram uma série de trabalhos que elucidaram muitos fatores relacionados ao congelamento, resultando no desenvolvimento de uma disciplina que hoje é conhecida como Criobiologia.

Consolidada a importância da criopreservação de espermatozóides, o alvo da criopreservação passou a ser o embrião. Na década de 70 foi desenvolvido o método que permitiu o nascimento dos primeiros animais, inicialmente camundongos (WHITTINGHAM et al., 1972) e logo após do primeiro bezerro (WILMUT et al., 1973). Este método previa o equilíbrio entre a desidratação celular e formação de gelo, o que era obtido mediante o uso de baixas concentrações de crioprotetores e um gradual resfriamento (1 a $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$) até temperaturas muito baixas (-60°C), quando o embrião (envasado em tubos ou ampolas de vidro) era mergulhado no N_2 . A metodologia demandava um longo período de tempo para ser executada, já que tanto o congelamento, como o descongelamento, devia ser processado de

forma lenta. Essa limitação determinou o desenvolvimento de metodologias mais rápidas (WILLADSEN et al., 1978), que culminaram no chamado método “rápido,” hoje conhecido como convencional. Esta metodologia prevê queda de temperatura de 0,3 a 0,6°C/min., desde -7°C até -30°C, quando o embrião (envasado em palheta plástica) é mergulhado em N₂. O resfriamento até temperaturas intermediárias permite adequada desidratação, possibilitando o descongelamento em maior velocidade. A metodologia é atualmente muito empregada na espécie bovina, sendo desenvolvidos procedimentos que possibilitam a transferência direta, quando o descongelamento é realizado sem retirar o embrião da palheta.

Tabela 1. Primeiros nascimentos resultantes de embriões mamíferos criopreservados.

Espécies	Referências
Camundongo	Whittingham et al. (1972)
Bovino	Wilmut and Rowson (1973)
Coelho	Bank and Maurer (1974)
Rato	Whittingham (1975)
Ovelha	Willadsen et al. (1976)
Cabra	Bilton and Moore (1976)
Cavalo	Yamamoto et al. (1982)
Humano	Zeilmaker et al. (1984)
Antilope	Kramer et al. (1983)
Babuino	Pope et al. (1984)
Macaco Cynomolgus	Balmaceda et al. (1986)
Macaco Marmoset	Summers et al. (1987)
Gato	Dresser et al. (1988)
Suino	Hayashi et al. (1989)

Adaptada de Leibo e Songsasen (2002)

Com embriões produzidos *in vivo*, os trabalhos bem sucedidos de criopreservação foram baseados na redução gradual da temperatura, possibilitando uma adequada desidratação. Entretanto, esta técnica não se mostrou adequada para os oócitos, mantendo a busca por metodologias alternativas para a criopreservação destas estruturas. Rall e Fahy (1985) foram

pioneiros no emprego com sucesso da vitrificação para embriões, obtendo a sobrevivência de embriões murinos. Essa nova biotecnologia abriu um novo campo na criopreservação de estruturas biológicas. Nos anos seguintes, a vitrificação continuou sendo avaliada e logo foram relatados resultados exitosos com embriões bovinos (MASSIP et al., 1986; DOBRINSKY et al., 1991).

O nascimento de três bezerros saudáveis com a transferência de embriões produzidos a partir de oócitos bovinos maturados e vitrificados foi relatado por Vajta et al. (1998). Avanços importantes também foram obtidos com oócitos bovinos imaturos, como o relato de gestações posteriormente ao congelamento destas estruturas (OTOI et al., 1995), e a obtenção de bezerros nascidos (KUBOTA et al., 1998). O relato dos primeiros nascimentos após vitrificação de oócitos bovinos imaturos, foi descrito por Vieira et al. (2002), com a obtenção de três produtos saudáveis. Entretanto, mesmo com estes resultados positivos, ainda hoje não existe uma metodologia adequada e economicamente viável para a criopreservação de oócitos, principalmente os imaturos.

2) Vitrificação como método de criopreservação celular

Vitrificação pode ser definida como o processo de solidificação de uma solução a baixas temperaturas, sem a formação de cristais de gelo (LUYET 1937). O fenômeno é obtido com o suficiente aumento da velocidade de resfriamento da solução, e ou com o uso de elevadas concentrações de crioprotetores nas soluções, que impeçam a formação de cristais de gelo. Outros fatores que facilitam a vitrificação são o aumento da pressão hidrostática e a diminuição do volume a qual está relacionada com a velocidade de resfriamento (MACFARLANE, 1987; VAJTA, 2000).

A vitrificação foi primeiramente investigada pelo físico alemão Tammann, que já em 1898. Luyet (1937) expôs a teoria e demonstrou sua aplicação prática em líquidos orgânicos. Kulechova e Lopata (2002), numa retrospectiva do processo, descrevem que as primeiras investigações e descrições do processo datam do século XIX. Luyet, considerado o fundador da criobiologia reconheceu, há mais de 60 anos atrás, o potencial de obtenção de um estado estrutural livre de cristais de gelo, para emprego na criopreservação. Entretanto, nesta época

era reconhecido que as soluções crioprotetoras deveriam ser melhores, para suportar a preservação de células vivas, não havendo clareza de como um procedimento efetivo de vitrificação poderia ser estabelecido, já que nestes primeiros estudos não estava claro como o processo efetivamente se estabelecia.

A vitrificação requer elevadas taxas de resfriamento e elevada concentração de crioprotetor, que são potencialmente tóxicas e causam sérios danos osmóticos. Isto inicialmente levou a um abandono deste método, que foi substituído por outros menos tóxicos e com menores danos osmóticos para as estruturas. Os métodos de congelamento lento passaram a ser mais estudados, pois utilizavam concentrações mais baixas de crioprotetor. Embriões bovinos produzidos *in vivo* e sêmen foram eficientemente criopreservados pelo método de congelamento lento.

Entretanto, os métodos convencionais de queda lenta e programada da temperatura, não se mostraram adequados para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* e principalmente para oócitos. Isto ocorre em função dos danos decorrentes da passagem pela fase de transição dos lipídeos, que é dependente do estágio de maturação do oócito. Parks e Ruffing (1992), demonstraram que a simples exposição do oócito bovino por dois minutos à temperatura de 0°C determinou uma redução de 13% nas taxas de fecundação *in vitro*. Arav et al. (1996), em estudo mais detalhado, constataram que os danos aos oócitos ocasionados nesta temperatura decorriam da exposição à faixa termotrópica de transição dos lipídios da membrana. Os autores demonstraram que nos oócitos imaturos (VG) estes danos ocorrem em temperaturas de 13 a 20°C, enquanto em oócitos maturados está centrada entre 13 a 4°C.

Com a crescente importância das biotécnicas relacionadas com a produção *in vitro* de embriões, a punção folicular guiada por ultra-som e as tecnologias de clonagem e transgênese, cresceu o interesse por tecnologias alternativas para a criopreservação de oócitos.

A partir do trabalho de Rall e Fahy (1985), demonstrando pela primeira vez que embriões murídeos poderiam ser criopreservados com sucesso, com a metodologia da vitrificação, o método passou a ser objeto de intensa pesquisa, até os dias atuais. Nesta fase inicial, as soluções de vitrificação eram muito tóxicas, o que levou os pesquisadores a buscarem alternativas para reduzir estes efeitos. Algumas alternativas foram adotadas dos métodos convencionais. Assim nos trabalhos pioneiros, os embriões eram parcialmente equilibrados em soluções de menor concentração de crioprotetor e então submetidos à solução

de vitrificação previamente resfriada a 4°C (RALL e FAHY, 1985; KULECHOVA e LOPATA, 2002), sendo que em alguns casos o tempo total de exposição chegava aos 60 minutos. Estas metodologias iniciais, embora permitissem a criopreservação de embriões, não se mostraram adequadas na criopreservação de oócitos, principalmente em função da reduzida velocidade de resfriamento, antes da vitrificação.

Diferentes alternativas foram propostas para reduzir os efeitos tóxicos dos crioprotetores. A associações de diferentes crioprotetores foi uma delas, outra foi o emprego de substâncias químicas menos tóxicas (FAHY, 1984; RALL, 1989).

O êxito com a vitrificação de embriões de *Drosophila* (STEPONKUS et al., 1990; MAZUR et al., 1992), estruturas sabidamente sensíveis ao resfriamento, deu um novo enfoque na metodologia da vitrificação, que passou então a ser uma alternativa potencialmente viável para criopreservação de oócitos. Estes trabalhos identificaram que a estratégia para o sucesso na vitrificação destas estruturas era o aumento na velocidade de resfriamento e a redução no volume de crioprotetores. Martino et al. (1996) empregaram a vitrificação utilizando grades de microscópio eletrônico como suportes para os oócitos, que eram imersas diretamente em N₂ líquido, obtendo resultados promissores. Seguindo a mesma tendência, Vajta et al. (1997) desenvolveram a tecnologia utilizando palhetas de 0,25 ml estiradas manualmente após serem aquecidas em sua extremidade (OPS). No ano seguinte (VAJTA et al., 1998), foi proposto um protocolo que contemplava os pontos necessários para reduzir a toxicidade e os danos osmóticos dos crioprotetores sem, entretanto, comprometer o fenômeno da vitrificação e que é provavelmente o método mais empregado na criopreservação de oócitos. Este protocolo preconiza a associação de dois crioprotetores internos o dimetilsulfoxido (DMSO) e o etileno glicol (EG), associado a um crioprotetor externo, a sacarose. Os autores indicam a exposição dos oócitos em duas soluções, sendo uma de equilíbrio e a outra de vitrificação. A solução de equilíbrio é composta de 10% de EG e 10% de DMSO e tem a finalidade de adaptar as estruturas e diminuir o tempo de exposição à solução de vitrificação que é composta de 20% EG e 20% de DMSO, mais a sacarose. Com esta metodologia conseguiu-se diminuir o tempo de exposição à solução de vitrificação a qual foi de 20 segundos, proporcionando a diminuição dos danos osmóticos e tóxicos das soluções crioprotetoras.

3) Metodologias abertas de Vitriificação

Uma das formas de aumentar a velocidade de resfriamento é o emprego de metodologias que possibilitam o contato direto entre o N₂ líquido e a amostra a ser vitrificada. Estas são as chamadas metodologias abertas e que passaram a ter um enorme interesse, desde os trabalhos pioneiros de Steponkus et al. (1990) com a vitriificação de embriões de *Drosophila*. Landa e Tepla (1990) desenvolveram a tecnologia da vitriificação em microgotas, as quais são instiladas diretamente no N₂ líquido, obtendo alta taxa de resfriamento. Como inconvenientes do método, logo após a deposição, a gota flutua sobre o N₂ líquido antes da submersão, reduzindo a velocidade de resfriamento. Além disso, a metodologia é pouco prática, pois as estruturas não ficam acondicionadas individualmente, ou seja, tem-se a necessidade do uso de tubos criogênicos para o armazenamento da amostra, dificultando ainda a identificação.

Com base no trabalho de Steponkus et al. (1990), Martino et al. (1996) e Arav e Zeron (1997) utilizaram grades de microscópio eletrônico na vitriificação de oócitos bovinos (Figura 1). O processo compreende a deposição do conteúdo a ser vitrificado sobre a grade metálica, após isto é retirado o excesso de líquido, de tal forma que permaneça apenas um filme sobre a grade, que posteriormente é depositada diretamente no N₂ líquido.

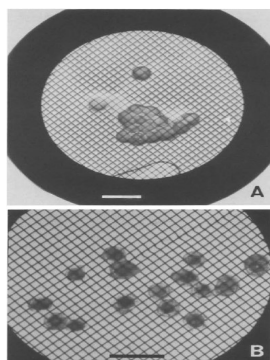


Figura 1 – Grades de microscópio eletrônico contendo oócitos (MATSUMOTO et al., 2001)

Devido ao contato direto da grade com o N₂ líquido e o pequeno volume de solução (1 a 2µl), este método proporciona uma rápida taxa de resfriamento e aquecimento, apresentando ainda a vantagem de possibilitar a criopreservação de um grande número de estruturas simultaneamente, entretanto é dificultado o armazenamento e a identificação.

A metodologia OPS descrita por Vajta et al. (1997), utiliza uma palheta de inseminação artificial de 0,25 ml aquecida em uma placa térmica e estirada manualmente que

permitia a redução do diâmetro original de 1,7mm para 0,8mm e a espessura de suas paredes passando de 0,15mm para 0,07mm (Figura 2). As estruturas são envasadas nas OPS pelo efeito capilar e a taxa de resfriamento quando se mergulha a OPS diretamente no N₂ líquido é de aproximadamente 20.000°C/min, comparando com a velocidade de resfriamento da palheta original, que é de 2.500°C por minuto (VAJTA et al., 1998). Uma vantagem do uso das OPS é a velocidade com que as estruturas podem ser envasadas e recuperadas, reduzindo o tempo de exposição a concentrações muito altas de crioprotetores (BEEBE et al., 2002). Outra vantagem é o uso de volumes muito pequenos, que ajudam a reduzir os danos na zona pelúcida que ocorrem durante o resfriamento e reaquecimento.

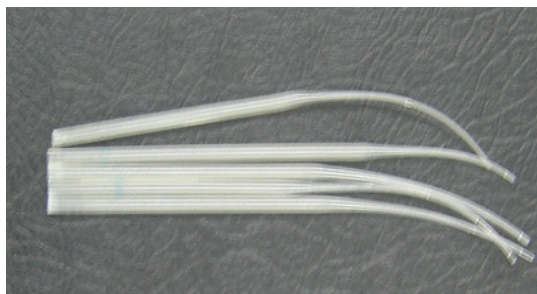


Figura 2 – OPS – Palhetas abertas e estiradas empregadas na vitrificação

O acondicionamento das OPS nos botijões criogênicos se faz depositando a OPS dentro de uma palheta de 0,5 ml pré-resfriada em N₂ líquido. Esta palheta é lacrada evitando assim a contaminação durante o seu armazenamento.

A técnica de vitrificação usando tela de nylon “Nylon Mesh,” descrita por Matsumoto et al. (2001) consiste no uso de uma tela de nylon com 60µm de espessura, confeccionadas em forma triangular, para facilitar o manuseio é amarrado um fio de algodão no *nylon mesh* (Figura 3). O *nylon mesh* contendo as estruturas a serem criopreservadas é mergulhado diretamente no N₂ líquido, de forma semelhante às grades de microscopia eletrônica, permitindo a vitrificação de muitas estruturas ao mesmo tempo. Entretanto, a identificação e o acondicionamento destas nos botijões criogênicos ficam inconvenientes no ponto de vista prático.

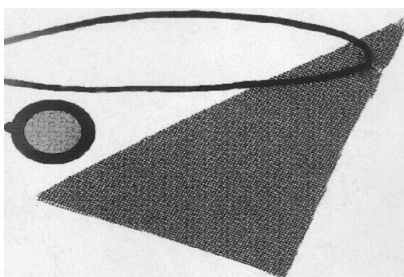


Figura 3 – Representação esquemática do *nylon mesh* e da grade de microscopia eletrônica (MATSUMOTO et al., 2001).

MEZZALIRA et al. (1999) utilizaram micropipetas de vidro na vitrificação de oócitos bovinos. Estas são confeccionadas através do aquecimento e estiramento de tubos de vidro (micro-hematócrito) até obter um diâmetro interno próximo a 0,35mm (Figura 4). Estas micropipetas são utilizadas abertas e o envase das estruturas é feito por capilaridade. Uma vantagem da sua utilização é o seu menor diâmetro em relação às OPS (0,80mm), além de proporcionar maior velocidade de resfriamento pela característica do vidro de ser um material de maior condutividade térmica quando comparado com o poliestireno (HALLIDAY et al., 1996).

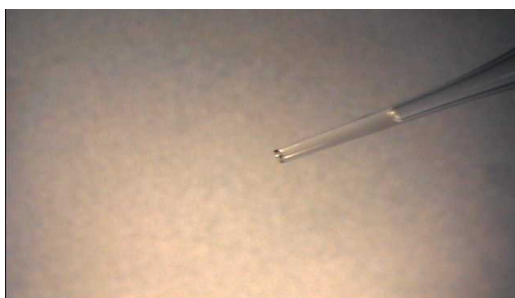


Figura 4 – Micropipeta de vidro

Outra vantagem apresentada pelos autores é que a própria micropipeta de vidro serve como instrumento de manipulação das estruturas que estão sendo vitrificadas e reaquecidas. Assim como a OPS, a micropipeta de vidro pode ser armazenada no interior de uma palheta de inseminação de 0,5 ml, ou ainda em palheta de 0,25 ml, previamente resfriada e posteriormente selada e acondicionada nos botijões criogênicos. Outro ponto positivo é que a micropipeta de vidro é facilmente esterilizada em fornos de alta temperatura, e pode ser reutilizada, entretanto seu efeito capilar fica diminuído por continuas utilizações.

O método de vitrificação *Cryoloop* desenvolvido por Lane et al. (1999), é realizado através de uma espécie de laçada com 20 μ m de largura aproximadamente, utilizando um fio com 0,5 a 0,7mm de diâmetro (Figura 5). O *cryoloop* é imerso na solução de vitrificação para formar um “filme”, onde as estruturas a serem criopreservadas são depositadas, quando o *cryoloop* é mergulhado no N₂ líquido.

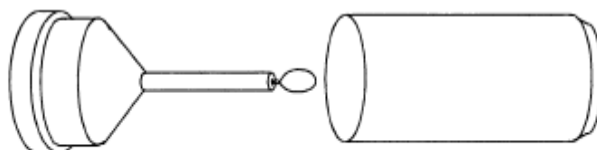


Figura 5: Representação esquemática do *cryoloop* (LANE et al., 1999).

Como inconveniente deste método podemos ter o desprendimento do conteúdo a ser vitrificado do *cryoloop* no momento da imersão no N₂ líquido e conseqüentemente, perda do mesmo. Também no aspecto do armazenamento o mesmo não se mostra prático.

O método GL-tip (Gel-Loading Tip) foi descrito por Tominaga et al. (2001), onde as estruturas são primeiramente colocadas em uma solução de equilíbrio por 2 minutos e em seguida, transferidas para solução de vitrificação, as estruturas ficam expostas a esta solução por 30 segundos e em seguida são envasadas por capilaridade nas ponteiros de micropipetas utilizadas para o carregamento de géis de eletroforese (Figura 6), utilizado em torno de 0,7 μ l de solução de vitrificação. Após o envase o GL-tip é mergulhado no N₂ líquido. O armazenamento da GL-tip se dá com a introdução da extremidade mais fina no interior de uma palheta de sêmen de 0,5 ml pré-resfriada no N₂ líquido. Este método facilita a identificação e o armazenamento das estruturas nos botijões criogênicos.

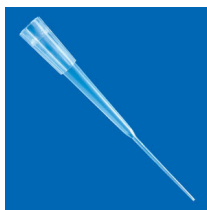


Figura 6: Gel-Loading Tip (USA Scientific modelo 1022-0610)

Vanderzwalmen et al. (2003) propôs a vitrificação de uma micro-gota na parede da palheta a qual foi cortada ao meio (Figura 7). Este método consiste em uma palheta de 0,25ml com a extremidade aberta ao meio no sentido longitudinal, onde a solução de vitrificação contendo a estrutura a ser criopreservada é depositada em uma pequena gota na parede desta palheta, que a seguir é mergulhada diretamente no N₂ líquido. Apresenta a vantagem de vitrificação de um grande número de estruturas, além do rápido e fácil reaquecimento. Por se tratar de uma palheta, sua identificação fica fácil, sendo mantida no interior de uma palheta de 0,5 ml, no botijão criogênico.

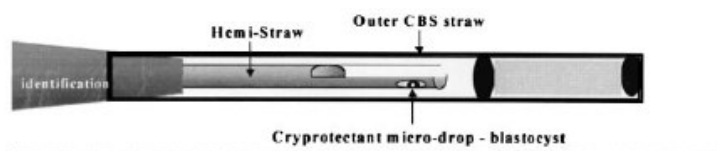


Figura 7: Representação esquemática *Hemi-straw* (VANDERZWALMEN et al. 2003)

Cha et al. (2005) utilizaram grades de microscopia eletrônica comparada com grades de ouro (gold grid). O trabalho foi dividido em duas fases, sendo que na primeira fase oócitos humanos foram vitrificados com grades de cobre de microscopia eletrônica imersas em N₂ líquido, e em uma segunda fase oócitos foram vitrificados com grades de ouro em N₂ super-resfriado até atingir o *slush*. Os autores constataram que as taxas de sobrevivência, fecundação, implantação e prenhez foram superiores no grupo que utilizou a vitrificação em grades de ouro imersas em N₂ super-resfriado (*slush*), constatando que o aumento da velocidade de resfriamento proporcionado pelos diferentes materiais e o N₂ super-resfriado influenciam positivamente na viabilidade dos oócitos vitrificados.

Todos estes métodos empregam alta velocidade de resfriamento e proporcionaram a diminuição das lesões do congelamento, além de permitir uma diminuição das concentrações de crioprotetor e do tempo de exposição a estes (VAJTA, 2000).

4) Eliminação do vapor de N₂

Outra estratégia encontrada pelos pesquisadores para aumentar a transferência de calor da amostra, foi a eliminação vapor de N₂ e o seu conseqüente efeito isolante. Quando a amostra entra em contato com o N₂ líquido este entra em ebulição e por um curto período há a

formação de uma camada isolante, diminuindo assim a velocidade de resfriamento (DINNYÉS et al., 1999).

Uma das alternativas propostas para superar este entrave foi a vitrificação pelo contato direto da amostra com uma superfície metálica resfriada (Figura 8) “solid-surface vitrification,” (DINNYÉS et al., 1999). O método consiste na deposição dos oócitos em uma solução de equilíbrio, seguindo-se a passagem por três pequenas gotas de solução de vitrificação, sendo a última gota de 1 a 2 μl depositada diretamente sobre uma superfície metálica pré-resfriada (-150 a -180°C), parcialmente submersa em N_2 . O tempo total de exposição à solução de vitrificação é de 25 a 30 segundos.

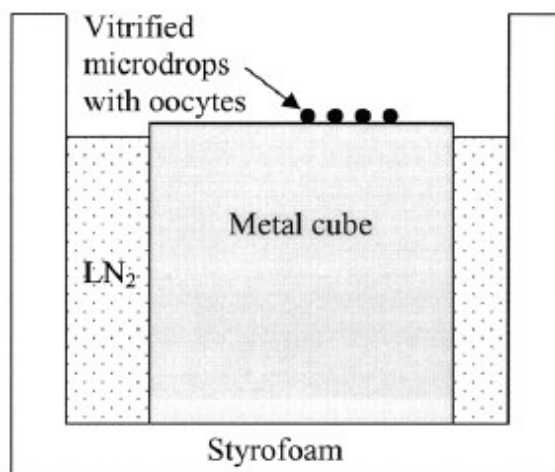


Figura 8: Representação esquemática do solid surface vitrification (DINNYÉS 1999)

Outra estratégia empregada para eliminar o efeito isolante do vapor de N_2 foi com a aplicação de vácuo sobre o mesmo. Desta maneira ocorre a redução da temperatura do N_2 , que previne a ebulição, que só ocorre em temperaturas superiores a -196°C. Quando atinge -210°C, o N_2 solidifica. Quando o vácuo é suspenso, o N_2 se liquefaz novamente, entretanto, por um período de aproximadamente 5 minutos, a ebulição é prevenida (WERLICH et al., 2006).

O emprego deste N_2 super-resfriado foi avaliado pela primeira vez por Steponkus et al. (1990) que vitrificaram embriões de “*Drosophila melanogaster*”. Os autores associaram o N_2 super-resfriado com a vitrificação em grades de microscopia eletrônica e obtiveram 18,4% de eclosão larval dos embriões. Alguns anos após, o N_2 super-resfriado voltou a ser utilizado por Martino et al. (1996), que vitrificaram oócitos maturados em palhetas de 0,25ml ou grades de microscopia eletrônica, imersas em N_2 líquido normal ou super-resfriado. Os autores

observaram maior viabilidade com as grades de microscopia eletrônica que, no entanto, não foram influenciados pelo emprego de N₂ líquido normal ou super-resfriado. A mesma estratégia foi estudada por Arav et al. (2000), que obtiveram bons resultados na vitrificação de oócitos, utilizando um equipamento comercial para a produção de vácuo sobre o N₂ líquido (Vit-IMT, Israel – Figura 10). Os autores obtiveram a idêntica viabilidade com oócitos maturados e vitrificados em relação aos não vitrificados. Adicionalmente, obtiveram 14% de desenvolvimento embrionário com oócitos imaturos vitrificado (ARAV et al., 2000). O equipamento produz uma redução da pressão sem a concomitante redução do volume, o que determina uma redução da temperatura, que nestas condições pode chegar até -210°C, quando se forma uma espécie de floculação, denominada “Slush”. Embora com características importantes, o equipamento teve uma distribuição muito restrita em função do elevado custo. Em função disto, alternativas de menor custo passaram a ser pesquisadas. Werlich et al. (2006) também descrevem um equipamento (Figura 10) para a produção de vácuo sobre o N₂ líquido, obtendo aumento da viabilidade de oócitos imaturos vitrificados, que produziram taxas de desenvolvimento embrionário semelhante ao grupo de oócitos maturados e vitrificados.



Figura 9. Equipamento comercial Vit-IMT usado na vitrificação



Figura 10 Equipamento Nitrocooler empregado para vitrificação

O sucesso da vitrificação está ancorado em três fatores: viscosidade da solução de vitrificação, velocidade de resfriamento e reaquecimento e volume da amostra (YAVIN e ARAV, 2007). Halliday et al. (1996) relatam que metais possuem coeficientes de condutividade térmica até 2000 vezes superiores ao de materiais como o poliestireno. Desta forma, o emprego de palhetas metálicas como suporte para a vitrificação de oócitos bovinos, pode permitir um considerável aumento na taxa de resfriamento, sendo importante que se avalie esta possibilidade.

ARTIGO A SER ENVIADO PARA PERÍODICO ESPECIALIZADO

**ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE
OÓCITOS BOVINOS IMATUROS.**

ESTRATÉGIA PARA AUMENTAR A EFICIÊNCIA DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS.

Bunn, S.¹; Mezzalira, A.¹

RESUMO

Para avaliar o uso materiais com diferentes condutividade térmica, na vitrificação, 1454 oócitos (Experimento 1) foram inicialmente expostos por 30 segundos a 10% EG + 10% DMSO + 20% soro de égua em estro (SEE) e a seguir a uma solução de vitrificação (SV) com 20% EG + 20% DMSO e 0,5M Sacarose, por 20 segundos. O envase foi realizado em PM (palheta metálica inoxidável, n=265), MV (micropipeta de vidro, n=279), PB (palheta cortada em bisel, n=280), OPS (open pulled straw, n=272), em grupos de 5 ou 6 oócitos, além de um grupo controle (GC), n=358, não vitrificado. O Experimento 2 (n=709) avaliou a redução da concentração de crioprotetores (25 e 50%), na vitrificação de oócitos bovinos. Após 30 segundos de exposição na primeira solução, os oócitos tiveram 20 segundos de exposição a uma das soluções de vitrificação: SV100 (n=187), 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sacarose; SV75 (n=187), 15% de EG + 15% de DMSO e 0,375M de sacarose; ou SV50 (n=146), 10% de EG, 10% de DMSO + 0,25M de sacarose. Um grupo não vitrificado (n=189) foi o controle. Após o reaquecimento, os oócitos foram maturados, fecundados, e os prováveis zigotos cultivados em meio SOFaaci à 39°C. Como critério de viabilidade utilizou-se as taxas de clivagem, blastocistos e eclosão. As taxas de clivagem no experimento 1, foram similares ($p>0,05$) entre os tratamentos, sendo inferiores ($p<0,05$) ao GC. Entre os grupos vitrificados, maior taxa de blastocistos foi obtida no tratamento PM (10,2%), que foi superior ($p<0,05$) aos tratamentos OPS (6,1%) e PB (6,1%), não diferindo do grupo MV (8,0%), embora com

tendência de ser superior ($p < 0,1$). Os grupos tratados tiveram semelhantes taxas de eclosão, que foram inferiores ao GC. No experimento 2, não houve diferença na clivagem entre os tratamentos SV100 e SV75, sendo ambos superiores ($p < 0,05$) ao tratamento SV50. Na taxa de blastocistos, houve diferença entre todos os tratamentos ($p < 0,05$), sendo a maior taxa obtida com o GC (38,0%), seguido do tratamento SV100 (10,1%), SV75 (7,6%) e SV50 (0,5%), respectivamente. As taxas de eclosão dos grupos SV100 e SV75 foram semelhantes, sendo inferiores ($p < 0,05$) ao controle. No grupo SV50 não houve eclosão. Conclui-se que o aumento da velocidade de resfriamento melhora a viabilidade pós vitrificação de oócitos bovinos imaturos, sendo que as palhetas metálicas são mais efetivas que os suportes de menor condutividade (palhetas plásticas), com uma tendência de superioridade quando comparada à micropipeta de vidro. A redução dos crioprotetores em percentual igual ou superior a 25% não permite uma adequada crioproteção na vitrificação de oócitos bovinos, com a metodologia proposta neste estudo.

Palavras Chave – Vitrificação, Micropipetas de vidro, Palheta metálica, Oócitos bovinos.

ABSTRACT

To evaluate the use of different thermal conductivity carrier tools for vitrification, 1.454 oocytes (Experiment 1) were 30 seconds exposed to 10% EG + 10% DMSO + 20% estrus mare serum (SEE) in TCM Hepes. Just after, groups of 5 or 6 oocytes were 20 seconds exposed to vitrification solution (SV - 20% EG + 20% DMSO and 0.5M Sucrose). They were loaded in PM (stainless metallic straws, n=265), MV (glass micropipette, n=279), PB (bevel cut straw, n=280), or OPS (open pulled straw, n=272) and then plunged in super cooled LN₂. A non vitrified group was used as control (GC, n=358). The second experiment (n=709) aimed to evaluate vitrification of bovine oocytes with reduced (25 and 50%) cryoprotectants concentrations. After 30 seconds exposure to the first solution, oocytes were exposed (20 seconds) to vitrification solutions: SV100 (n=187), 20% EG + 20% DMSO + 0.5M Sucrose; SV75 (n=187), 15% of EG + 15% of DMSO and 0.375M of Sucrose; or SV50 (n=146), 10% of EG, 10% of DMSO + 0.25M Sucrose. A non vitrified group (n=189) was the control. After re-warming, oocytes were IVM, IVF and IVC (in SOFaaci medium, at 39°C). Cleavage rates in the experiment 1 were similar ($p>0.05$) among treatments, being them lower ($p<0.05$) than control. Among vitrified groups, higher blastocyst rate was obtained with PM (10.2%), that was higher ($p<0.05$) than OPS (6.1%) and PB (6.1%). PM (10.2%) had a similar rate than MV (8.0); however, showed tendency to be higher ($p<0.1$). Treated groups had similar hatching rate, being lower than the control. In the second experiment, cleavage rate was similar between SV100 and SV75 treatments, being both higher ($p<0.05$) than SV50. Blastocyst rates differed among all groups ($p<0.05$). Control group rate was (38.0%), followed by SV100 (10.1%), SV75 (7.6%) and SV50 (0.5%). Hatching rates of SV100 and SV75 groups were similar, being lower ($p<0.05$) than control group. The SV50 group had none hatched blastocysts. In conclusion, increased cooling speed improves the viability of vitrified bovine

immature oocytes, and metallic straws are more effective than lower conductivity carrier tools (plastic straws), with a tendency of to be superior when compared to glass micropipette. Moreover cryoprotectant decreasing cryoprotectant concentration in 25% or up does not allow an adequate cryoprotection for bovine oocytes vitrification, under our conditions.

Key Words: Vitrification, Glass Micropipette, Metallic straw, Bovine Oocytes.

INTRODUÇÃO

Atualmente, existe um crescente interesse em entender os fundamentos criobiológicos e superar os obstáculos responsáveis pela baixa sobrevivência, buscando desenvolver melhores métodos de criopreservação para oócitos (WOODS et al., 2004).

Todavia os oócitos dos mamíferos domésticos constituem-se num dos mais difíceis tipos celulares para serem criopreservados. Isto ocorre em função de suas características biológicas, como o alto teor lipídico, o baixo coeficiente de permeabilidade, a alta relação volume/superfície, o envolvimento das células do *cumulus oophorus*, o grande tamanho, além de um complexo citoesqueleto, que interferem negativamente na sobrevivência, após a criopreservação (LEDDA et al., 2001).

Das técnicas disponíveis para a criopreservação de oócitos, a vitrificação é a mais promissora em função de proporcionar alta velocidade de resfriamento e reduzir o tempo de exposição à faixa termotrópica de transição dos lipídios (ARAV et al., 1996). Assim, a estratégia primária de um processo de vitrificação deve ser passar rapidamente pela zona crítica de temperatura (15 a 25°C) para reduzir as lesões (LIEBERMANN et al., 2002).

A otimização da técnica de vitrificação de oócitos possibilitará a formação de bancos de germoplasma para manutenção da biodiversidade animal, além de constituir-se num importante instrumento auxiliar na produção de animais transgênicos, clones ou programas de produção *in vitro* de animais.

À medida que evoluem para estágios mais avançados de desenvolvimento, os oócitos melhoram sua capacidade de congelabilidade (LIM et al., 1992), entretanto nos últimos anos foram obtidos produtos nascidos, derivados de oócitos imaturos vitrificados (VIEIRA et al., 2002), bem como idêntica viabilidade entre oócitos maturados e imaturos, com o emprego de

N₂ super-resfriado (SANTOS et al., 2006), demonstrando que a técnica é viável e está evoluindo para melhor.

Com intuito de aumentar a velocidade de resfriamento, buscou-se o contato direto da amostra a ser vitrificada com o N₂ líquido, marcando o início das chamadas metodologias abertas. Diferentes formas de envase foram propostas, como as “microdrops” (LANDA e TEPLA, 1990), “electron microscope grids” (MARTINO et al., 1996), “open pulled straw” (VAJTA et al., 1997), micropipeta de vidro (MEZZALIRA et al., 1999) e o “cryoloop” (LANE et al., 1999), entre outras. Estas metodologias demonstraram o efeito benéfico do aumento da velocidade de resfriamento, o que ampliou a busca por metodologias que possibilitem velocidades ainda maiores de resfriamento. Uma forma de ampliar esta velocidade seria a eliminação do vapor de N₂, que tem efeito isolante. Para tal, duas formas foram propostas: A chamada “solid-surface vitrification” (DINNYÉS et al., 1999), que vitrifica a amostra pelo contato direto com uma superfície metálica resfriada, mas que apresenta pouca praticidade, e o emprego do N₂ super-resfriado (MARTINO et al., 1996), que previne a ebulição e determina maior taxa de transmissão de calor entre as superfícies. A redução da pressão, sem a concomitante redução do volume, produz diminuição da temperatura, que nestas condições pode chegar até -210°C, quando se forma uma espécie de floculação, denominada “Slush” (ARAV et al., 2000).

Utilizando OPS e N₂ sob vácuo obtido com o equipamento Nitrocooler, idênticas taxas de desenvolvimento de embriões foram obtidas após a vitrificação de oócitos bovinos imaturos ou maduros (SANTOS et al., 2006). Por sua composição, as OPS apresentam baixa condução térmica, sendo possível que materiais de maior condutibilidade proporcionem um incremento da velocidade de resfriamento, principalmente quando associadas ao emprego de N₂ submetido ao vácuo.

A vitrificação depende ainda da adequada interação entre velocidade de resfriamento e concentração de crioprotetor. A concentração excessiva de crioprotetores é nociva para as células, assim como uma insuficiente concentração não produz a crioproteção esperada. Todavia, à medida que se aumenta a velocidade de resfriamento, produzem-se melhores condições para a vitrificação do meio, que assim pode ser obtida com menores concentrações de crioprotetores. Desta forma, um balanço entre a maximização da velocidade de resfriamento e a redução da concentração de crioprotetores é muito importante (LIEBERMANN et al., 2002).

Um adequado método de vitrificação poderá aumentar a viabilidade de oócitos bovinos criopreservados ainda imaturos, possibilitando o seu aproveitamento logo após a obtenção por aspiração folicular, sem a necessidade de um laboratório para a maturação, o que se constitui em importante objetivo da biociência, agricultura, pecuária e medicina.

O presente estudo tem como objetivos: Avaliar o desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos imaturos, vitrificados em N₂ super-resfriado e envasados em suportes de diferente condutividade térmica (Experimento 01), e avaliar a possibilidade de se reduzir a concentração de crioprotetores, quando se utiliza estratégias de maximizar a velocidade de resfriamento (Experimento 02).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Exceto quando indicado, todos os produtos utilizados nos experimentos foram provenientes da Sigma-Aldrich Química Ltda. – São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados em laboratório, com temperatura controlada entre 24 a 26°C.

Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos, coletados em frigorífico, foram transportados em PBS, adicionado de 100 UI penicilina/ml e 0,05 mg estreptomicina/ml, com temperatura entre 30 e 35°C. O tempo decorrido entre a obtenção dos ovários e o seu processamento ficou em torno de 5 horas.

No laboratório, os ovários foram lavados em PBS, procedendo-se a seguir a punção dos folículos entre 2 a 8 mm de diâmetro, através do emprego de uma agulha 18 gauge ligada a uma linha de vácuo, com pressão de aspiração de 20 ml/minuto.

Após a sedimentação do líquido folicular, procedia-se a busca dos complexos cumulus oócitos (CCO's) em lupa estéreo-microscópica, sendo tanto a busca como a seleção realizada no próprio líquido folicular, previamente centrifugado (LEHMKUHL et al., 2000). Foram utilizados apenas CCO's com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por células compactas do *cumulus oophorus*, distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais.

Soluções de vitrificação e reaquecimento

As soluções empregadas na vitrificação foram preparadas imediatamente antes do uso, em placas de quatro poços (Nunc - Roskilde - Dinamarca). No poço 1, adicionava-se 400µl de TCM 199 adicionado de Hepes (TCM Hepes), com 20% de soro de égua em estro (SEE) + 50 µl de EG e +50 µl de DMSO. No poço 2, a solução era composta por 300 µl de TCM Hepes com 0,8M de sacarose, na qual se adicionava 100 µl de EG + 100 µl de DMSO. No poço 3 e 4 depositava-se 400 µl de TCM Hepes com 10% de SEE.

Os oócitos foram expostos à solução de equilíbrio (poço 1) durante 30 segundos e após este período colocados na solução de vitrificação que se encontrava no interior da placa em uma gota de aproximadamente 100 µl e em seguida em uma micro-gota de 2 µl, quando foram envasados. O tempo de permanência na solução de vitrificação era de 20 segundos. Os oócitos foram envasados em grupos de 5 ou 6, sendo que em cada repetição foram vitrificados 25 a 30 oócitos por tratamento.

A solução de reaquecimento era preparada em placa Nunc de quatro poços, depositando-se no poço 1 400 µl de solução de sacarose 0,8M em TCM Hepes, adicionado de 20% de SEE + 800 µl de TCM Hepes com 10% de SEE, obtendo-se uma solução final de aproximadamente 0,3M. No poço 2 depositava-se 200 µl de solução de sacarose 0,8M + 400 µl de TCM Hepes, obtendo a mesma solução do poço 1. No poço 3 depositava-se 100µl de solução de sacarose 0,8M + 400µl de TCM HEPES, obtendo-se uma solução final com aproximadamente 0,15M de sacarose. Finalmente, no poço 4 depositava-se 400 µl de TCM Hepes.

Vitrificação

Para a vitrificação, utilizou-se o equipamento Nitrocooler, que era abastecido com aproximadamente 500 ml de N₂ líquido e mantido em funcionamento, para produção de vácuo, por um período de 5 minutos, quando ocorria a solidificação do N₂. O equipamento era desligado e a tampa aberta, quando os oócitos devidamente envasados foram então mergulhados no N₂, em posição oblíqua. A seguir, os oócitos foram depositados num recipiente contendo N₂ em atmosfera normal, retirados do equipamento e mantidos em N₂ até o momento do reaquecimento.

Reaquecimento e remoção dos crioprotetores

O reaquecimento era realizado através da exposição do recipiente ao ar por 3 segundos, seguido da imersão da extremidade contendo os oócitos em 1,2 ml de uma solução de sacarose 0,3M, contido no poço 01 da placa de reaquecimento. Logo após serem localizados, os oócitos foram transferidos para o poço 02, contendo a mesma solução, porém sem a contaminação dos crioprotetores. Nesta solução os oócitos permaneciam por cinco minutos, sendo logo a seguir transferidos para uma solução contendo 0,15M de sacarose (poço 3), onde permaneciam por mais 5 minutos. Ao final deste período, foram depositados em TCM Hepes e então submetidos à maturação.

Maturação *in vitro*

Após o reaquecimento, os oócitos vitrificados, bem como os do grupo controle, foram acondicionados em placas Nunc, e submetidos à maturação *in vitro* em meio TCM-199 - sais de Earle (GIBCO BRL, Paisley, UK)) adicionado de 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de Hepes, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/ml, 0,5 µg/ml de LH e 10% de SEE, por 24 horas a 39,0° C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e de umidade saturada.

Fecundação *in vitro*

A fecundação *in vitro* foi realizada com 2×10^6 espermatozoides/ml, selecionados pelo método de swim-up em meio Talp-Fert adicionado de 30 µg/ml de heparina, 0,72 µg/ml de penicilamina, 0,26 µg/ml de hipotaurina e 0,04 µg/ml de epinefrina, com incubação por um período de 18 a 20 horas, em estufa de cultivo com 5% CO₂ e 95% de umidade relativa.

Cultivo dos embriões

Ao final do período de fecundação, era procedida a remoção das células do cumulus através de agitação mecânica e a transferência das estruturas para o meio SOFaaci (Holm et al, 1999), suplementado com 5% de SEE e mantido sob óleo mineral em estufa de cultivo a 5% CO₂ e 95% de umidade relativa. Após 24 horas de cultivo procedia-se na avaliação da clivagem, sendo as estruturas não clivadas removidas. A partir deste momento foram utilizadas bolsas gaseificadas com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂, para o cultivo adicional por mais 130 horas, quando era avaliada a taxa de blastocistos.

EXPERIMENTO 01

Para o envase utilizavam-se embalagens constituídas por diferentes suportes, dependendo do tratamento: As palhetas metálicas (PM) utilizadas no tratamento PM foram construídas a partir da parte metálica de cateteres (BD Insyte-W) medindo 1.1 x 48 mm, dos quais se extraiu o êmbolo e a porção em bisel. No tratamento micropipetas de vidro (MV), as micropipetas foram confeccionadas a partir de capilares de micro-hematócrito, estirados manualmente, após o aquecimento em chama. No tratamento palheta em bisel (PB) foram utilizadas palhetas de 0,25 ml, das quais foram retirados os êmbolos, sendo uma das extremidades cortadas na diagonal, de forma a produzirem uma extremidade em bisel. Para o tratamento open pulled straw (OPS) foram utilizadas palhetas de 0,25 ml, aquecidas em placa aquecedora (Fanem - modelo 250) e estiradas manualmente até obter um diâmetro aproximado de um terço do original.

Foram utilizados 1454 oócitos de qualidade excelente ou boa, em onze repetições, distribuídos entre os grupos experimentais, sendo 265 no grupo PM, 279 no grupo MV, 280 no

grupo PB, 272 no grupo OPS e 358 no GC, não vitrificado. Foram realizadas 10 repetições, sendo que o GC era mantido em líquido folicular até o final da vitrificação, quando também era submetido à maturação, juntamente com os oócitos vitrificados.

EXPERIMENTO 02

No segundo experimento foram utilizados 709 oócitos de qualidade excelente ou boa, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com oito repetições. No grupo 1 (n=187), utilizou-se a mesma solução de vitrificação empregada no experimento 01, agora denominada SV100. No grupo 2 (n=187), reduziu-se a concentração de crioprotetores em 25%, sendo denominada SV75. No grupo 3 (n=146), reduziu-se a concentração de crioprotetores em 50%, sendo denominada SV50. Os demais procedimentos de vitrificação foram semelhantes ao experimento 1, sendo utilizado para o envase, apenas as palhetas metálicas. Um GC, não vitrificado (n=189), também foi utilizado.

Nos dois experimentos, após atingir o estágio de blastocisto, os embriões foram mantidos por 72 horas adicionais em cultivo, para determinação da eclosão.

Os critérios de viabilidade adotados, tanto para o Experimento 1 como para o Experimento 2, foram a taxa de clivagem (D2), taxa de blastocistos (D7), e taxa de eclosão (D9), sendo os dados percentuais submetidos a transformação em arco seno raiz quadrada para a correção da normalidade dos resíduos e posteriormente submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (SAS, 2004). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dos 1454 oócitos utilizados no experimento 1, 686 clivaram e 205 chegaram ao estágio de blastocisto. Não foram observadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre as taxas de clivagem dos grupos vitrificados que, todavia, foram significativamente inferiores ao GC ($P<0,05$).

Em relação ao desenvolvimento até o estágio de blastocisto, o grupo PM apresentou taxa significativamente superior (10,2%) aos tratamentos OPS (6,1%) e PB (6,1%), respectivamente ($p<0,05$). Os grupos PM (10,2%) e MV (8,0%) não diferiam entre si ($P>0,05$), sendo observado, no entanto, uma tendência de superioridade ($P<0,1$) do grupo PM. A taxa de blastocistos do GC (35,0%) foi superior ($P<0,05$) aos grupos vitrificados em PM (10,2%), MV (8,0%), OPS (6,1%) e PB (6,1%), como pode ser observado na Tabela 02.

O percentual de eclosão nos grupos vitrificados apresentou uma variação de 41,0 a 56,0%, não sendo constatada diferença significativa ($P>0,05$). Entretanto, todos os grupos foram significativamente inferiores ao GC não vitrificado (77,0%), como é demonstrado na Tabela 03.

No experimento 02, foram utilizados 709 oócitos que resultaram em 314 clivagens e 106 blastocistos. Como demonstra a Tabela 03, não houve diferença estatística ($P>0,05$) nas taxas de clivagem entre os tratamentos SV100 (39,2%), SV75 (31,2%), que foram superiores ao tratamento SV50 (11,7%). Já o GC apresentou as melhores taxas de clivagem (86,0%), que foram superiores ($P<0,05$) aos grupos tratados.

TABELA 2. Taxas de clivagem e blastocistos obtidas de oócitos bovinos imaturos, envasados em diferentes suportes e vitrificados em N₂ super resfriado.

Tipo de Suporte (Tratamento)	Oócitos maturados (n)	Clivagem (%)	Blastocistos (%)
Vitrificados em OPS	272	31,4 ^a	6,1 ^a
Vitrificados em PB	280	32,6 ^a	6,1 ^a
Vitrificados em PM	265	43,7 ^a	10,2 ^b
Vitrificados em MV	279	31,8 ^a	8,0 ^{ab}
Controle não vitrificados	358	86,0 ^b	35,0 ^c

a,b,c Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença pelo teste de Tukey (P<0,05).

TABELA 3. Taxas de blastocistos e percentual de eclosão de embriões obtidos de oócitos bovinos imaturos vitrificados em diferentes suportes.

Tipo de Suporte (Tratamento)	Blastocistos		Blastocistos eclodidos
	n	(%)	(%)
Vitrificados em OPS	17	6,1	50,0 ^a
Vitrificados em PB	17	6,1	41,0 ^a
Vitrificados em PM	27	10,2	53,0 ^a
Vitrificados em MV	22	8,0	56,0 ^a
Controle não vitrificados	122	35,0	77,0 ^b

a,b Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nas taxas de produção embrionária houve diferença significativa entre todos os tratamentos (p<0,05). O GC apresentou a maior taxa de desenvolvimento embrionário

(38,0%). Nos grupos tratados observou-se uma queda na taxa de blastocistos, que foi mais significativa com as menores concentrações de crioprotetores (Tabela 4).

TABELA 4. Taxas de clivagem e blastocistos obtidas de oócitos bovinos imaturos, vitrificados em palhetas metálicas, com N₂ líquido super resfriado e diferentes concentrações de crioprotetores na solução de vitrificação (SV).

Tratamento	Oócitos maturados Nº	Clivagem (%)	Blastocistos (%)
SV100	187	39,2 ^a	10,1 ^b
SV75	187	31,2 ^a	7,6 ^c
SV50	146	11,7 ^b	0,5 ^d
Controle	189	86 ^c	38 ^a

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

As taxas de eclosão dos grupos SV100, 59,0% e SV75, 62,0% foram semelhantes, sendo inferiores (p<0,05) ao controle (85,0%). Já o grupo SV50 não teve eclosão embrionária (0%).

DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores desenvolvidos no laboratório Prof. Assis Roberto de Bem, SANTOS et al. (2006) demonstraram que o uso do N₂ super-resfriado aumenta a viabilidade embrionária após a criopreservação de oócitos imaturos. Este incremento na produção de embriões foi atribuído ao aumento da velocidade de resfriamento com a conseqüente redução no tempo de exposição à faixa crítica de temperatura que se centra ao redor dos 13 aos 20°C (ARAV et al., 1996), reduzindo assim os danos.

O emprego de materiais com diferentes coeficientes de condutividade térmica empregados no envase dos oócitos (Experimento 1) demonstrou a influência deste fator durante a vitrificação. As palhetas de metal proporcionaram as melhores taxas de desenvolvimento embrionário, e apresentam uma condutividade térmica até 2000 vezes maior do que materiais como o poliestireno (HALLIDAY et al., 1996), do qual são confeccionadas as OPS e as palhetas em bisel.

As taxas de clivagem observadas no experimento 01, que são um indicativo de sobrevivência após a criopreservação (FUKU et al., 1995), foram semelhantes nos diferentes grupos, sendo 31,8% no grupo MV, 32,6% no grupo PB, 31,4% no grupo OPS e 43,0% no grupo PM. Estas taxas são semelhantes às obtidas em trabalhos desenvolvidos anteriormente no laboratório, 46,0 a 49,0% (VIEIRA et al., 2002) e 33,9 a 41,2% (SANTOS et al., 2006), este último empregando N₂ resfriado por vácuo. As taxas de clivagem também são comparáveis às obtidas por outros autores após a vitrificação de oócitos bovinos maturados, 50,0% (VAJTA et al., 1998) e 49,1% (MEZZALIRA et al., 2002), demonstrando a viabilidade do processo de vitrificação de oócitos imaturos. Todavia, embora a clivagem dos grupos vitrificados seja satisfatória, foi inferior à observada no GC (86,0%), demonstrando que o

processo de vitrificação utilizado, independente do tipo de suporte empregado, foi danoso para os oócitos. Este fato explica a razão de apenas um pequeno número das estruturas clivadas atingirem estágios mais avançados, como blastocisto. Também no GC houve uma acentuada diferença entre a taxa de clivagem (86,0%) e a taxa de blastocistos (35,0%), demonstrando que fatores ainda não identificados e provavelmente relacionados ao processo de cultivo embrionário (LONERGAN et al., 2003a; LONERGAN et al., 2003b), não oferecem as melhores condições para o desenvolvimento do embrião. É provável que com oócitos vitrificados este fenômeno seja intensificado e assim determine a maior redução na taxa de blastocistos. Em função disto, embora a taxa de clivagem seja um bom critério para avaliar sobrevivência, não é um parâmetro satisfatório para avaliar a posterior viabilidade de desenvolvimento de oócitos até blastocisto (FUKU et al., 1995).

A literatura é escassa em trabalhos comparando diferentes suportes de envase na vitrificação de oócitos. Mezzalira et al. (2002) comparou OPS com micropipetas de vidro no envase de oócitos bovinos maturados para a vitrificação. Os autores não encontraram diferença estatística na produção de blastocistos entre os grupos MV (10,0%) ou OPS (7,9%), e embora tenham utilizado oócitos maturados, os dados são muito semelhantes aos obtidos neste estudo.

No experimento 1, a taxa de blastocistos observada no tratamento PM (10,2%) foi superior aos grupos OPS e PB (6,1% e 6,1%) respectivamente ($p < 0,05$), com uma tendência ($p < 0,1$) de superioridade à MV que obteve 8,0% de blastocistos. Entretanto, ao tratamento MV não diferiu estatisticamente dos tratamentos OPS e PB.

Diferentes autores têm demonstrado que o aumento na velocidade de resfriamento e reaquecimento na vitrificação proporcionam aumento da viabilidade e da taxa embrionária subsequente (MARTINO et al., 1996; ARAV et al., 2000; SANTOS et al., 2006). Também

neste estudo, as maiores taxas de desenvolvimento embrionário foram obtidas com a utilização da palheta de metal, suporte que apresenta maior condutividade térmica, confirmando o efeito positivo do aumento da velocidade de resfriamento na vitrificação de oócitos bovinos.

No tratamento PB era esperado uma viabilidade embrionária semelhante aos suportes de maior condutividade térmica, já que a maior parte do meio contendo os embriões é exposta diretamente ao N₂. A menor viabilidade observada pode ter sido devida ao efeito isolante da parede da palheta, que é bastante espessa.

Liebermann et al. (2002), relatam a importância de um adequado balanço entre a velocidade de resfriamento e a concentração de crioprotetores. À medida que aumenta a velocidade de resfriamento, produzem-se melhores condições para a vitrificação do meio, que assim pode ser obtida com menores concentrações de crioprotetores. Arav et al. (2002), com o aumento da velocidade de resfriamento associado a gotas de pequeno volume (0,5 - 1µl) obtiveram alta viabilidade após a redução para 50 a 75% da concentração original dos crioprotetores, na vitrificação de oócitos bovinos. Em desacordo com estes resultados, no experimento 2, a maior taxa embrionária dos tratamentos foi obtida com a solução SV100 (10,1%), havendo um decréscimo significativo ($P < 0,05$) à medida que se reduziu a solução crioprotetora para 75% (7,6%), ou 50% (0,5%). É possível que esta discrepância de resultados tenha ocorrido em função do maior volume da solução crioprotetora (2 a 3 µl) utilizado no experimento 2.

Nos dois experimentos, após atingir o estágio de blastocisto, os embriões foram mantidos por 72 horas adicionais em cultivo, para determinação da eclosão. A taxa de eclosão foi semelhante para todos os grupos tratados, ficando entre 41,0 e 56,0% no experimento 1 e 59,0 a 62,0% no experimento 2. Todavia, estas taxas foram inferiores às obtidas no GC do experimento 1 (75,0%) e do experimento 2 (85,0%). Lonergan et al. (2003b) sugerem que a

qualidade intrínseca do oócito é o fator chave para determinar a taxa de blastocistos, enquanto o período de cultivo após a fecundação é o mais crítico na determinação da qualidade embrionária. É possível que o processo de vitrificação utilizado neste estudo afete negativamente a qualidade dos oócitos. Da mesma forma, as condições de cultivo empregadas a partir da fecundação não devem ter proporcionado condições para a total recuperação dos oócitos vitrificados, o que explica a diferença entre as taxas de eclosão dos tratamentos vitrificados e dos grupos controles, neste estudo. Mezzalana e Vieira (2006) sugerem a suplementação de indutores de antioxidantes endógenos, como o β -mercaptoethanol, a cisteína ou a cisteamina para melhorar as taxas e a qualidade dos embriões após a criopreservação, sendo oportuno que se avaliem estas estratégias, associadas à vitrificação de oócitos bovinos.

CONCLUSÕES:

-Suportes de maior condutividade térmica, empregados no envase de oócitos bovinos imaturos, melhoram a sua viabilidade durante o processo de vitrificação.

-A utilização de palhetas metálicas confeccionadas a partir de cateteres é de baixo custo, fácil armazenamento em botijões criogênicos e proporcionam maior taxa de embriões após a vitrificação de oócitos bovinos imaturos.

-Nas condições do presente experimento, mesmo com o aumento da velocidade de resfriamento, a redução da concentração dos crioprotetores em percentual igual ou superior a 25% não permite uma adequada crioproteção para oócitos bovinos vitrificados em palhetas de metal.

Agradecemos

CNPq – pelo suporte financeiro

Frigorífico Verdi – pelo fornecimento dos ovários bovinos.

REFERÊNCIAS

ARAV, A., et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v.33, n.6, p.589-599, 1996.

ARAV, A., et al. A new device method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, Los Altos, v.53, p.248, 2000 (abstract).

ARAV, A., et al. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.** v.187, p.77 – 81, 2002.

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

FUKU, E. et al. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Mol. Reprod. Dev.** v.40, p.177 – 185, 1995.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física. Gravitação, ondas e termodinâmica.** Editora afiliada, 4ed. Rio de Janeiro RJ, 1996.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa Medium supplemented with Sodium Citrate and Myo-Inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

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

LANE, M., et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertil. Steril.** v.72, p.1073-1078, 1999.

LEDDA, S., et al. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v.55, p.1359-71, 2001.

LEHMKUHL, R.C., et al. Desenvolvimento de ovócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.276, 2000. (Supl.).

LIEBERMANN, J., et al. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of reproduction**, v.67, p.1671–1680, 2002.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.37, p.351-361, 1992.

LONERGAN, P., et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction** v.126, p.337–346, 2003a.

LONERGAN, P., et al. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns, **Reprod Dom Anim**, v.38, p.259–267, 2003b.

MARTINO, A., et al. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996.

MEZZALIRA, A., et al. Criopreservação de ovócitos bovinos em micropipetas de vidro. In: CICLO DE ATUALIZAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA 10, **Anais**. Lages SC, 1999.

MEZZALIRA, A., et al. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. **Theriogenology**, v.57, p.472 – 472, 2002.

MEZZALIRA, A., et al. Vitriificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.2, p.108-114, 2002.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.191-196, 2006 (Supl 1).

SANTOS, R. M., et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1501-1506. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Users guide**: statistics: version 6.03. Cary, NC, 1988. v.2, 956 p. 2004.

VAJTA, G., et al. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**, v.18, p.191-95, 1997.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** v.51, p.53–58, 1998.

VIEIRA, A.D., et al. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.45, p.91–94, 2002.

WOODS, E. J., et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146–156, 2004.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO GERAL:

As biotecnologias relacionadas com a reprodução apresentaram uma significativa evolução nas últimas décadas. A produção *in vitro* de embriões, que teve um notável impulso nos anos 80 e 90, implementaram outras biotécnicas. Da mesma forma, desde a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol em 1949, um grande avanço foi observado na criopreservação, inicialmente com sêmen congelado, que proporcionou uma grande expansão da técnica de inseminação artificial e posteriormente com embriões.

Apesar de todo este avanço nas diferentes biotecnologias e inclusive na criopreservação, o mesmo não ocorreu com a crioconservação de oócitos, principalmente os imaturos. Assim, a obtenção de uma metodologia adequada para a criopreservação de oócitos continua a ser um importante objetivo da comunidade científica.

Avanços importantes foram relatados com o congelamento de oócitos bovinos imaturos, como o relato de gestações (OTOI et al., 1995), e a obtenção de bezerros nascidos (KUBOTA et al., 1998). Entretanto, a vitrificação se mostrou como o método mais adequado para criopreservar oócitos, proporcionando o nascimento de bezerros após vitrificação de oócitos bovinos maturados (Vajta et al., 1998) e imaturos (Vieira et al., (2002).

O incremento da viscosidade ou da taxa de resfriamento e reaquecimento aumenta a probabilidade de ocorrer a vitrificação. Já o aumento do volume da solução de vitrificação diminui a probabilidade de ocorrer a vitrificação (YAVIN e ARAV, 2007). Neste aspecto, Halliday et al. (1996) identificam que metais possuem coeficientes de condutividade térmica, que pode ser até 2000 vezes superiores ao de materiais como o poliestireno, sendo importante que se avalie esta possibilidade. Entretanto, com alta velocidade de resfriamento, alta concentração de crioprotetor, associado a um baixo volume da amostra a ser vitrificada, é comum a ocorrência de fraturas (YAVIN e ARAV, 2007). Assim, para adequar esta equação, Liebermann et al. (2002), relatam a importância de um balanço equilibrado entre a velocidade de resfriamento e a concentração de crioprotetores.

Na busca por um adequado método de criopreservação de oócitos bovinos, novos estudos devem ser conduzidos buscando avaliar a redução no volume da amostra a ser vitrificada, ou o aumento do tempo de exposição ou ainda reduções menores de 25% na solução crioprotetora.

Um efetivo método de criopreservação de oócitos bovinos teria aplicação imediata no estabelecimento de bancos genéticos, na produção embrionária *in vitro* e em programas de produção de clones (BOOTH et al. 1999) ou transgênicos (YANG et al., 2007), contribuindo assim de forma significativa para o avanço da ciência.

Como contribuição para a criopreservação de oócitos bovinos, o presente estudo demonstrou que o aumento da velocidade de resfriamento melhora a viabilidade de oócitos bovinos imaturos vitrificados. Foi ainda demonstrado que o emprego de N₂ super-resfriado associado ao uso de materiais de maior condutividade térmica, como as palhetas metálicas, proporcionam aumento da velocidade de resfriamento, melhorando as condições para a obtenção da vitrificação e por conseqüência aumentando a viabilidade após o reaquecimento. Embora o segundo experimento não tenha proporcionado a manutenção ou aumento da viabilidade, com a redução da concentração de crioprotetores, é possível que isto tenha sido motivado por excesso de volume da amostra vitrificada.

REFERÊNCIAS

ARAV, A., et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, p.589-599, 1996.

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

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

ARAV, A., et al. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.** v.187, p.77-81, 2002.

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

BOOTH et al. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts. **Theriogenology**, v. 51, p.999 – 1006, 1999.

BUNN, S., et al. Vitriificação de oócitos bovinos imaturos envasados em suportes com diferentes condutividades térmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.322, 2006 (resumo)

CHA, K., et al. Improved Clinical Outcomes Were Obtained From Vitrified Oocytes Using Gold Grid and Slush-Liquid Nitrogen After Failing the Fresh IVF-ET Program. **Fertility and sterility**, v.84, p. 351-352, 2005.

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

DOBRINSKY, J.R. et al. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. **Theriogenology**, v.35, p.194, 1991.

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

FUKU, E., Liu, J. and Downey, B. R. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Mol. Reprod. Dev.** v.40, p.177 – 185, 1995.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física. Gravitação, ondas e termodinâmica.** Editora afiliada, 4ed. Rio de janeiro RJ, 1996.

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

- KULESHOVA, L. L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v.78, p. 449-452, 2002.
- LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol. (Praha)**, v.36, p. 153-158, 1990.
- LANE, M., et al. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. **Theriogenology**, v.51, p. 167, 1999.
- LEDDA, S., et al. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v.55, p.1359-71, 2001.
- LEIBO S.P; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v.57, p.303-326, 2002.
- LEHMKUHL, R.C., et al. Desenvolvimento de ovócitos bovinos mantidos em líquido folicular e submetidos a FIV. **Arquivos Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.276, 2000. (Supl.).
- LIEBERMANN, J., et al. Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of reproduction**, v.67, p.1671–1680, 2002.
- LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.37, p.351-361, 1992.
- LONERGAN, P., et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction** v.126, p.337–346, 2003a.
- LONERGAN, P., et al. Oocyte and Embryo Quality: Effect of Origin, Culture Conditions and Gene Expression Patterns, **Reprod Dom Anim**, v.38, p.259–267, 2003b.
- LUYET, B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. **Biodynamica**, v.1, p.1-14, 1937.
- MACFARLANE, D. R., Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. **Cryobiology** v.24, p.181-195, 1987.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1059-1069, 1996.
- MASSIP A, van der Zwalmen P, Scheffen B, Ectors F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. **Cryo Letters**, v.7, p.270–273, 1986

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

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

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

MEZZALIRA, A., et al. Vitrification of matured bovine oocytes treated with cytochalasin B. **Theriogenology**, v.57, p.472 – 472, 2002.

MEZZALIRA, A., et al. Vitriificação de ovócitos bovinos com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.2, p.108-114, 2002.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A. D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.34, p.191-196, 2006 (Supl 1).

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

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

POLGE, C., et al. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

RALL, W.F., FAHY, G.M., Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ by vitrification. **Nature**, v.313, p.573–575. 1985.

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

SANTOS, R. M., et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1501-1506. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Users guide**: statistics: version 6.03. Cary, NC, 1988. v.2, 956 p, 2004.

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

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of in vitroproduced bovine embryos. **J. Reprod. Dev.**, v.47, p.267-273, 2001.

VAJTA, G., et al. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**, v.18, p.191-95, 1997.

VAJTA, G., et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.

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

VANDERZWALMEN, P. et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human reproduction** v.18, p.1504-1511, 2003.

VIEIRA, A.D., et al. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology** v. 45, p. 91–94, 2002.

Werlich, D. E., et al. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 77-82, 2006.

WHITTINGHAM, D.G., LEIBO, S.P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296°C. **Science**, v. 178, p. 411-414, 1972.

WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. In vitro storage of cattle embryos. In: WILLADSEN, S. M. **Control of reproduction in the cow**. Ed. SREENAN, J.M., Luxemburg, Commission of the European Communities, Luxemburg, p. 428- 436, 1978.

WOODS, E. J., et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146–156, 2004.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v. 92, p. 686-690, 1973.

YANG, B. C. et al. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, article In Press, 2007.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions **Theriogenology**, v. 67 p.81–89, 2007.

ANEXOS

**RESUMOS APRESENTADOS NA XX REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
TECNOLOGIA DE EMBRIÕES
Araxá – MG, 24 a 27 de agosto de 2006.**

ANEXO 01

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS ENVASADOS EM SUPORTES COM DIFERENTES CONDUTIVIDADES TÉRMICAS.

Bunn, S.; Bertolini, M.; Cruz, F.B.; Vieira, A.D.; Pedrazzi, C.; Cesaro, M.P.; Ortigari, I.; Ribeiro, E.S.; Mezzalira, J.C.; Mezzalira, A.

Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem – Centro de Ciências Agroveterinárias CAV – Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC – Lages SC

E-mail – mezzalira@cav.udesc.br

O aumento na velocidade de resfriamento é tido como condição necessária para melhorar a viabilidade pós-reaquecimento de oócitos vitrificados. Entretanto, esse aumento de velocidade pode ser diretamente influenciado pela temperatura do líquido refrigerante e pela condutividade térmica do suporte de vitrificação. O N₂ líquido (N₂L) quando submetido ao vácuo se resfria a temperaturas inferiores ao ponto de ebulição (-196°C), eliminando o vapor e favorecendo a troca de calor entre o líquido super-resfriado e a amostra. Este efeito pode ser ampliado com o uso de materiais de maior condutividade térmica. O objetivo deste estudo foi determinar se o uso de N₂ super-resfriado (-210°C) associado ao uso de suportes construídos com materiais de distinta condutividade térmica, podem afetar a subsequente produção embrionária a partir de ovócitos imaturos vitrificados. Complexos cumulus oócitos (n=1454) de qualidade excelente ou boa, obtidos de ovários coletados em abatedouro, foram expostos a uma solução composta de 10% etileno glicol (EG) + 10% dimetil sulfoxido (DMSO) + 20% soro de égua em estro (SEE) em TCM Hepes, durante 30 segundos. Após, grupos de 5 ou 6 oócitos foram submetidos à solução de vitrificação composta de 20% EG + 20% DMSO e 0,5M Sacarose, durante 20 segundos, período em que foram envasados em um de quatro suportes: palhetas metálicas (PM, n=265); micropipetas de vidro (MV, n=279); palhetas plásticas cortadas em bisel (PB, n=280); palhetas plásticas estiradas (OPS, n=272). Como controle, foi utilizado um grupo de oócitos não vitrificados (GC, n=358). A seguir foram mergulhados em N₂L super-resfriado para a vitrificação. No reaquecimento, procedeu-se a exposição dos suportes ao ar por 3 segundos, seguida da exposição dos oócitos (5 minutos cada) às soluções decrescentes de sacarose (0,30 e 0,15M), aquecidas a 35°C. Os oócitos foram então submetidos a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Não foram verificadas diferenças (p>0,05) nas taxas de clivagem (D2 pós-inseminação) entre os tratamentos PM (43,6%), MV (31,8%), PB (32,6%) e OPS (31,4%) que, todavia, foram inferiores (p<0,05) ao GC (86,0%). Nos grupos vitrificados a melhor taxa de blastocistos (D7) foi obtida com o tratamento PM (10,2%), que foi superior (p<0,05) aos tratamentos PB (6,1%) e OPS (6,1%), não diferindo do grupo MV (8,0%) embora com tendência de ser superior (p<0,1). A taxa de blastocistos do GC (35,0%) foi superior (p<0,05) aos grupos vitrificados. Já na taxa de eclosão (D9), não foram observadas diferenças (p>0,05) entre os grupos vitrificados em PM (53,0%), MV (56,0%), PB (41,0%) e OPS (50,0%), que foram inferiores ao GC (77,0%). Os dados permitem concluir que a condutividade térmica do material do suporte de vitrificação da amostra afeta a subsequente produção embrionária a partir de ovócitos imaturos vitrificados. Neste aspecto, as palhetas metálicas foram mais efetivas que os suportes plásticos e apresentaram uma tendência de superioridade em relação as micropipetas de vidro.

Suporte Financeiro – CNPq / UDESC

Agradecimentos – Frigorífico Verdi Pouso Redondo SC

VITRIFICATION OF IMMATURE BOVINE OOCYTES LOADED IN CSUPORTE WITH DISTINCT HEAT CONDUCTIVITIES

Bunn, S.; Bertolini, M.; Cruz, F.B.; Vieira, A.D.; Pedrazzi, C.; Cesaro, M.P.; Ortigari, I.; Ribeiro, E.S.; Mezzalira, J.C.; Mezzalira, A.

Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem – Centro de Ciências Agroveterinárias CAV – Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC – Lages SC
Brazil

E-mail – mezzalira@cav.udesc.br

Higher cooling speeds seem to improve oocyte viability after re-warming following vitrification. Cooling rate is directly influenced by the freezing temperature and the material's thermal conductivity. The exposure of liquid nitrogen (LN₂) to vacuum reduces its temperature below the boiling point (-196°C), which improves heat exchange between the super cooled LN₂ and the exposed sample. In addition, the use of materials with higher heat conductivities tends to further improve the cooling speed during vitrification. The aim of this study was to evaluate the use of super-cooled LN₂ (-210°C) in association of distinct thermal conductivity support, which may affect the subsequent embryo development of vitrified immature bovine oocytes. Bovine cumulus-oocyte complexes of excellent and good quality (n=1454) obtained from slaughterhouse ovaries were exposed for 30 sec to 10% ethylene glycol (EG) + 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) + 20% estrous mare serum (SEE) in TCM-Hepes. Next, groups of 5 to 6 oocytes were exposed to a vitrification solution composed of 20% EG + 20% DMSO and 0.5 M sucrose for 20 sec, to be finally loaded to one of four distinct support: stainless metallic straws (SMS, n=265); glass micropipettes (GMP, n=279); bevel-slashed plastic straws (BSS, n=280); open pulled plastic straws (OPS, n=272). A not vitrified group was used as a control (CG, n=358). Once loaded, support was plunged into super-cooled LN₂. Re-warming and re-hydration were performed immediately after nitrification by a 3-sec exposure to air, followed by 5-min exposures at 35°C to decreasing concentrations of sucrose solutions (0.30 and 0.15M). Control and vitrified Cocks were submitted to IVP protocol. No differences (p>0.05) were observed in cleavage rates (D2 pos insemination) among SMS (43.6%), GMP (31.8%), BSS (32.6%) and OPS (31.4%), but all were lower (p<0.05) than CG (86.0%). In vitrified groups, better blast cyst rate (D7) was observed in SMS (10.2%), that was higher (p<0.05) than BSS (6.1%) and OPS (6.1%), and not different from GMP treatment (8.0%), even so with trend of being higher (p<0.1). The blast cyst rate of CG (35.0%) was significantly higher than vitrified groups. When hatching rate (D9) was evaluated, no differences was observed (p>0.05) among vitrified groups SMS (53.0%), GMP (56.0%), BSS (41.0%) and OPS (50.0%), and all them were lower than CG (77.0%). Data allow us to conclude that the thermal conductivity of nitrification support affect the subsequent embryo development of vitrified immature bovine oocytes. In this regard, metallic straws were more effective than plastic support, with a trend to be superior to glass micropipettes.

ANEXO 02

REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CRIOPROTETORES NA VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS, ASSOCIADA A ALTA VELOCIDADE DE RESFRIAMENTO.

Bunn, S.; Bertolini, M.; Cruz, F.B.; Martins, L.T.; Gaudêncio Neto, S.; Wentz, K.C.; Paulini, F.; Munhoz, J.J.; Mezzalira, A.

Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem – Centro de Ciências Agroveterinárias CAV – Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC – Lages SC

E-mail – mezzalira@cav.udesc.br

A criopreservação de oócitos é ainda associada à baixa sobrevivência após o reaquecimento, o que tem limitado sua aplicação. O método de vitrificação tem se mostrado mais eficiente na criopreservação de oócitos que outros métodos de congelamento. O estado vítreo de uma solução é obtido pelo aumento da viscosidade resultante da alta concentração de crioprotetores, bem como por alta velocidade de resfriamento que impeça a cinética de formação de gelo. Em nosso laboratório, o uso de N₂ super-resfriado (-210°C) e de palhetas metálicas inoxidáveis, que possivelmente aumentou a velocidade de resfriamento, resultou em maiores taxas de blastocistos, após vitrificação de oócitos imaturos, com o uso da solução composta por 20% de etileno glicol (EG) + 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) + 0,5M sacarose. Taxas elevadas de resfriamento podem permitir uma concomitante redução na concentração de crioprotetores, minimizando a toxicidade. O objetivo deste estudo é avaliar a redução na concentração de EG + DMSO, entre 25 e 50%, na vitrificação de oócitos bovinos. Oócitos bovinos de qualidade excelente ou boa, puncionados de ovários obtidos em abatedouro (n=709), foram expostos por 30 segundos a uma solução composta de 10% EG + 10% DMSO + 20% soro de égua em estro (SEE) em TCM Hepes. Logo após, os oócitos foram expostos por 20 segundos a uma das soluções de vitrificação: SV100 (n=187), 20% EG + 20% DMSO + 0,5M Sacarose; SV75 (n=187), 15% de EG + 15% de DMSO e 0,375M de sacarose; ou SV50 (n=146), 10% de EG, 10% de DMSO + 0,25M de sacarose, além de um GC não vitrificado (n=189). Após o envase, realizado em grupos de 5 ou 6, as palhetas metálicas foram submersas em N₂ líquido submetido ao vácuo. O reaquecimento foi realizado logo após a vitrificação, por exposição ao ar por 3 segundos, seguido da exposição por 5 minutos em cada solução de sacarose (0,30 e 0,15M). A seguir procedeu-se a maturação e a fecundação, sendo os prováveis zigotos cultivados em meio SOFaaci, à 39°C com 5% CO₂ e umidade saturada. Na avaliação da clivagem, não houve diferença (p>0,05) entre os tratamentos SV100 (39,2%) e SV75 (31,2%), sendo ambos superiores (p<0,05) ao tratamento SV50 (11,7%). No GC a taxa de clivagem foi 87,0%, significativamente superior aos tratamentos. Na avaliação da taxa de blastocistos houve diferença entre todos os tratamentos (p<0,05). A maior taxa foi obtida com o GC (38,0%), seguido do tratamento SV100 (10,1%), SV75 (7,6%) e SV50 (0,5%), respectivamente. As taxas de eclosão dos grupos SV100 e SV75 foram semelhantes, 59,0% e 62,0%, respectivamente, sendo inferiores (p<0,05) ao controle (85,0%). Conclui-se que a redução dos crioprotetores em percentual igual ou superior a 25% não permite uma adequada crioproteção para oócitos bovinos vitrificados, resultando na redução da taxa de embriões obtidos. Novos estudos devem ser conduzidos para avaliar a possibilidade de redução dos crioprotetores, em percentuais inferiores a 25%.

REDUCTION IN CRYOPROTECTANT CONCENTRATIONS ON THE VITRIFICATION OF IMMATURE BOVINE OOCYTES, UNDER A HIGH COOLING RATE.

Bunn, S.; Bertolini, M.; Cruz, F.B.; Martins, L.T.; Gaudêncio Neto, S.; Wentz, K.C.; Paulini, F.; Munhoz, J.J.; Mezzalira, A.

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

Oocyte cryopreservation is still associated with subsequent low survival rates after freezing, which has delayed its widespread use and application. Vitrification procedures, however, appear to be more efficient for the cryopreservation of bovine oocytes than other freezing methods. The formation of a glass-like solution during vitrification can be obtained by increasing the cooling speed, which hinders the kinetics of ice formation, and/or by increasing viscosity, through an increase in cryoprotectant concentrations. In our laboratory, the use of super cooled nitrogen (-210°C) and stainless metallic straws, which possibly cause an increase in cooling speed, resulted in higher blastocyst rates after the vitrification of immature oocytes using a solution containing 20% ethylene glycol (EG) + 20% dimethyl sulfoxide (DMSO) + 0.5 M sucrose. A high cooling speed may enable a parallel reduction in cryoprotectant concentrations, minimizing the solution toxicity. The aim of this study was to evaluate the reduction in EG + DMSO concentrations (by 25% and 50%) for the vitrification of immature bovine oocytes. Bovine oocytes of excellent or good quality (n=709), aspirated from slaughterhouse bovine ovaries, were exposed for 30 sec to 10% EG + 10% DMSO + 20% estrous mare serum (SEE) in TCM-Hepes. Then, groups of oocytes were exposed for 20 sec to one of three vitrification solutions: SV100: 20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose (n=187); SV75: 15% EG + 15% DMSO + 0.375 M sucrose (n=187); SV50: 10% EG + 10% DMSO + 0.25M sucrose (n=146). A control group was not vitrified (n=189). Stainless metallic straws loaded with 5 to 6 oocytes were plunged into super cooled liquid nitrogen. Re-warming was performed immediately after vitrification, by 3 sec of exposure to air, followed by a stepwise cryoprotectant dilution in 0.30 and 0.15 M sucrose solutions for 5 min each. Following in vitro maturation and fertilization, presumptive zygotes were in vitro-cultured in SOFaaci medium, at 39°C, 5% CO₂ and saturated humidity. Cleavage rate was higher in the control group (87.0%) than all vitrification treatments, but no differences ($p>0.05$) were observed between SV100 (39.2%) and SV75 (31.2%) groups, which, in turn, were higher ($p<0.05$) than the SV50 treatment (11.7%). Blastocyst rates were different among all treatment groups ($p<0.05$), with the highest rate observed in the control group (38.0%), followed by the SV100 (10.1%), SV75 (7.6%) and SV50 (0.5%) treatments. Hatching rates were similar between SV100 and SV75 groups (59.0% vs. 62.0%, respectively), but lower and higher ($p<0.05$) than the control (85.0%) and SV50 (0.0%) groups, respectively. In conclusion, a reduction in 25% or 50% in cryoprotectant concentrations, under a high cooling rate, did not confer adequate cryoprotection to immature bovine oocytes, resulting in lower development to the blastocyst stage. Further studies still need to be conducted to evaluate the effectiveness to reduce cryoprotectant concentrations to values lower than 25% for the vitrification of immature bovine oocytes at higher cooling rates.