UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Daiane Lopes Bulgarelli

“A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação”

RIBEIRÃO PRETO

2011

Daiane Lopes Bulgarelli

**“A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva
independente do estadio de maturação”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

RIBEIRÃO PRETO

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bulgarelli, Daiane Lopes.

A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação, 2011.

126 p. il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Rosa-e-Silva, Ana Carolina Japur de Sá.

1.Maturação *in vitro*. 2.Vitrificação. 3.Oócito bovino.

4.Viabilidade. 5.Desenvolvimento embrionário.

Folha de Aprovação

Daiane Lopes Bulgarelli

Título: “A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

“Ao meu pai **Djalma Bulgarelli Junior** (*in memoriam*) por ser o meu grande mestre, educador e minha maior fonte de inspiração na minha formação pessoal e intelectual. Desde criança, foi ele quem sempre me explicou as diversas formas de resolução dos problemas e equações de matemática, todo o contexto e conceitos das guerras e manifestações que marcaram a história mundial e do Brasil... foi ele quem me incentivou mostrando que é através da fé em Deus, da humildade, do respeito para com as pessoas, do valor da “família”, do amor e da dedicação aos estudos que qualquer pessoa alcança os seus objetivos e ideais... eu só tenho a agradecer à Deus por ter permitido que esse grande homem tenha sido um dos dois grandes responsáveis pela minha existência e por fazer parte da minha vida para todo o sempre...sei que lá do céu ele está muito feliz por ver que a sua filhota “de gênio forte” chegou até aqui...”

“À minha mãe **Lucimar Lopes Bulgarelli**, amiga, companheira e verdadeira irmã... por sempre ter sido o meu equilíbrio, a minha fonte de amor, serenidade e incentivo em contornar todos os obstáculos e nunca desistir, mas sempre persistir no caminho escolhido... ela que desde muito novinha se mostrou uma excelente mãe, sempre cuidou de mim com muito amor, zelo e dedicação... sempre cuidou dos meus cadernos, do meu lanche, do meu uniforme e principalmente da minha educação... sempre me apoiou me dando forças para que eu agarrasse as oportunidades de crescimento e aperfeiçoamento profissional que surgiram na minha vida... Agradeço à Deus por ter me presenteado com uma mãe tão maravilhosa e amiga... obrigada por fazer parte da minha vida... AMOR ETERNO !!!”

Agradecimentos Especiais

À **Deus** pela minha existência, minha família, meus professores, minha saúde e por me iluminar e dar forças na minha vida.

À minha orientadora **Prof Dra Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva** pela oportunidade e confiança em realizar este trabalho de mestrado, onde no decorrer dessa caminhada, o conhecimento e a experiência adquiridos tem um valor inestimável para mim. Também, por ter sido, uma verdadeira “mãe professora”, onde com sábias palavras me acalmou em momentos de desespero, me mostrando que no final tudo dá certo. Obrigada por ter me orientado durante este trabalho, sempre com total dedicação, atenção e carinho.

Agradecimento especial em nome da amizade conquistada à **Micheli da Broi, Helena Malvezzi e Carolina Campos** por em tão pouco tempo terem se tornado amigas tão presentes na minha vida, por serem pessoas tão ricas em predicados, muito especiais e importantes para mim em toda essa caminhada. Obrigada por serem compreensivas, companheiras, atenciosas, prestativas em todos os momentos de luta e de expectativas durante a pós-graduação e em todos os momentos de alegrias e angustias que a vida nos proporciona. Independente do rumo que as nossas vidas sigam, a nossa amizade sempre continuará viva, firme e verdadeira em meu coração. Agradeço muito a Deus por ter conhecido vocês e por fazerem parte da minha vida. Quarteto mais do que fantástico !!!

Agradecimentos

À **todos** aqueles que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, especialmente:

À **Alessandra Vireque** pela amizade conquistada, dedicação, empenho e paciência dedicados durante todo o meu treinamento, padronização e realização de todas as técnicas que envolvem esse trabalho e durante a vivência da pesquisa. Tenho um reconhecimento inestimável por todo o conhecimento que adquiri durante esses dois anos, principalmente através da sua força de vontade e pela demonstração de amor pelo que realiza.

À **Caroline Palmieri Pitangui** por ter sido um anjinho que veio para me ajudar, acalmar, dividir e compartilhar alegrias e expectativas durante toda a prática realizada durante este trabalho. Além, da amizade, compreensão e dedicação. Eu não poderia ter tido uma companheira e ajuda melhor do que esta.

Ao **Marcelo Picinin Bernuci** pela sua imensa ajuda, atenção e compreensão durante o dia a dia na realização deste trabalho. Onde através do seu senso crítico e da sua força de vontade, se tornou um exemplo de pesquisador e amigo.

À **Juliana Meola** e ao **Daniel Blassioli Dentillo** pela amizade e pelo carinho conquistado durante a pós-graduação, além das palavras de apoio, que tanto me deram força para acreditar na concretização deste trabalho.

As pós-graduandas **Micheli da Broi, Helena Malvezzi, Carolina Campos, Daiana Pedroso, Gabriela Hidalgo, Jacira Campos, Camila Bonocher, Mary Montenegro, Fernanda Marques, Jhenifer Rodrigues, Flavia Donabella, Francielle Araújo, Lúcia Alves Lara, Luciana Dîb, Luciana Resende, Gislaine e Fabieni Picchi** pela amizade, compreensão de cada uma, pelo carinho, respeito e pelos momentos de descontração ao longo da realização deste trabalho. Vocês são maravilhosas e muito especiais.

À **Daiana Pedroso, Gabriela Hidalgo e Camila Bonocher** pelo carinho, amizade e compreensão atribuídos a mim durante essa caminhada nos momentos de alegrias e angústias.

À **todos os meus amigos** que sempre torceram e me deram apoio para a concretização deste trabalho.

À todos os meus **Familiares** pelo amor, carinho, orações, força e incentivo dedicados à mim na concretização deste trabalho.

Ao meu irmão **Matheus Bulgarelli** por fazer parte da minha vida e por ter me dado força, mesmo que indiretamente durante toda a caminhada deste trabalho.

Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** pela oportunidade em desenvolver meu trabalho de mestrado.

Aos **Docentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia**, especialmente aos do setor da biologia da reprodução pelos ensinamentos, apoio e dedicação prestados.

À todos que trabalham no **Setor de Reprodução Humana** e aos **funcionários do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Maria Albina, Débora, Eduardo, Marisa, Maria Auxiliadora, Sandra, Maria Balbino, Océlia e Cristina**, pelo carinho, ajuda, atenção e incentivo dedicado durante a execução deste trabalho.

À **Cristina Piccinato, Roberta Giorgenon e Camila Kokudai** pela ajuda e atenção inestimável no dia a dia, especialmente com a técnica de leitura de zona pelúcida, com os meios de vitrificação e com todo o suporte necessário para a execução deste trabalho.

À **Marilda Yamada, Maria Aparecida Vasconcelos e Cristiana Ribas** pelo apoio, ajuda, atenção e carinho dedicados a mim durante a execução deste trabalho.

À **Suelen Soares, Rosana, Ricardo, Reinaldo e Ilza** por toda a atenção, apoio e ajuda em todos os momentos.

Ao **Laboratório de Citogenética** da FMRP-USP, em especial a **Prof. Lucia Martelli**, ao **Ciro Pereira, Silvina e Silvio Avelino**, pela inestimável atenção, dedicação e disposição nos testes realizados.

À pesquisadora **Maria Sol Brassesco Annichini** pela ajuda e atenção prestada durante a execução deste trabalho.

Ao **Laboratório de Micromanipulação de Embriões** da FMRP-USP em especial ao **Reginaldo Vila, Fernanda Elias e Adriana Renzi** pela atenção e prestativa ajuda nos momentos necessários.

Ao **Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução Feminina** do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP à **Profa Dra. Janete Franci**, pela ajuda e disponibilidade na utilização do microscópio de fluorescência.

Ao **Prof Dr. Flavio Meirelles** e aos pós-graduandos **Thiago De Bem e Juliano Sangalli** pela atenção e inestimável ajuda.

À **Prof.Dra Adriana Bos-Mikich** pela atenção, ajuda e carinho dedicados ao meu trabalho e a mim.

À **Banca examinadora**, pela disponibilidade em participar deste momento importante do meu desenvolvimento profissional.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro imprescindível, através da concessão de bolsa de mestrado (processo nº 2009/04102-7) e de auxílio a projeto de pesquisa (nº de processo 2010/09368-2), sem os quais não teria sido possível a execução deste trabalho.

“Ser Feliz não é ter uma vida perfeita.
Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância.
Usar as perdas para refinar a paciência.
Usar as falhas para esculpir a serenidade.
Usar a dor para lapidar o prazer.
Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.”

Augusto Cury

BULGARELLI, DL. “A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação”. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Até o momento a literatura não determinou qual o melhor estadio de maturação (imaturo ou maduro) para que o oócito mantenha sua competência para o desenvolvimento reprodutivo após a criopreservação. O objetivo deste estudo foi determinar em qual estadio meiótico (imaturo -VG (vesícula germinativa) ou maduro- MII (metáfase II)) o oócito é menos susceptível ao dano na criopreservação, utilizando modelo experimental bovino. Foram utilizados ovários de vacas abatidas em matadouro, após a aspiração dos folículos, os oócitos imaturos (VG) foram selecionados para a maturação *in vitro* e vitrificação, e foram divididos em três grupos: 1) oócitos maturados *in vitro* e não submetidos à vitrificação (CONTROLE); 2) oócitos vitrificados imaturos (VG), descongelados e submetidos à maturação *in vitro* (CRIO-MIV); 3) oócitos maturados *in vitro* (MII), vitrificados e descongelados (MIV-CRIO). Os oócitos foram avaliados quanto a: a) maturação nuclear pela técnica de orceína acética; b) integridade da zona pelúcida (ZP) através de microscopia de polarização; c) viabilidade oocitária pela técnica de DEAD-LIVE; d) desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem, produção e eclosão de blastocistos) através da fertilização *in vitro* (FIV) e ativação partenogenética (AT). Não houve diferença na capacidade de maturação nuclear entre os oócitos frescos e descongelados no grupo CRIO-MIV ($p=0,23$). Em relação à zona pelúcida a totalidade dos oócitos (100%) nos três grupos apresentou leitura de zona pelúcida positiva, não havendo correlação com evolução embrionária posterior. Na análise de viabilidade celular pelo DEAD-LIVE verificou-se que houve redução da viabilidade do grupo MIV-CRIO (27%) quando comparado com controle (84%) ($p<0,0001$). Na análise do potencial de desenvolvimento embrionário o grupo controle apresentou melhores taxas de clivagem após FIV (80%) e AT (58%), do que os grupos CRIO-MIV (28%; $p<0,0001$; 28%; $p=0,0002$, respectivamente) e MIV-CRIO (26%; $p<0,0001$; 22%, $p<0,0001$, respectivamente). As taxas de formação de blastocisto e eclosão após FIV nos grupos CRIO-MIV, MIV-CRIO e após AT no grupo MIV-CRIO foram nulas. Houve a produção e eclosão de apenas um blastocisto no grupo CRIO-MIV após AT. No modelo experimental utilizado, o procedimento de vitrificação comprometeu parcialmente a viabilidade dos oócitos medida pela técnica de DEAD- LIVE e completamente o desenvolvimento embrionário subsequente, independente do estadio de maturação meiótica (VG ou MII) durante a criopreservação. No entanto, oócitos vitrificados em estadio de VG e submetidos à MIV foram meioticamente competentes e progrediram até o estadio de MII, sugerindo que o dano não compromete a capacidade de maturação nuclear do oócito. Este estudo não conseguiu determinar qual o melhor estadio meiótico oocitário para criopreservação, já que os dois estadios meióticos (VG e MII) se mostraram igualmente prejudicados pela criopreservação em relação à capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: vitrificação; oócito bovino; maturação *in vitro*; maturação nuclear; zona pelúcida; viabilidade; desenvolvimento embrionário.

Abstract

BULGARELLI, DL. “**Vitrification of bovine oocytes impairs their reproductive capacity independently of maturation stage**”. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Until the present literature has not achieved a consensus regarding the best maturation stage for oocyte to maintain their reproductive capacity after cryopreservation. The aim of this study was to determine, using an experimental bovine model, in which stage of development (VG stage, immature, or MII stage, post-maturation *in vitro*) the oocyte is less susceptible to damage during cryopreservation. Immature oocytes (VG) from the ovaries of slaughtered cows were selected for *in vitro* maturation or vitrification and divided into three groups. The first group (CONTROL) consisted of immature oocytes, matured *in vitro* without vitrification; the second group (CRYO-IVM) consisted of vitrified immature oocytes thawed and submitted to *in vitro* maturation; and the third group (IVM-CRYO) consisted of matured *in vitro* oocytes submitted to vitrification and thawing. The oocytes were evaluated for: nuclear maturation by acetic orcein staining; integrity of the zona pellucida using a polarized microscope; cell viability by the Dead-Live technique; and embryo development (cleavage, production and hatching rate) by *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation. There was no difference in capacity of nuclear maturation between fresh and thawed oocytes ($p=0.23$). Regarding the zona pellucida (ZP), all oocytes (100%) of all three groups (control, CRYO-IVM and IVM-CRYO) presented a positive ZP reading, with no correlation with later embryo evolution. DEAD-LIVE analysis of cell viability revealed reduction of viability in the IVM-CRYO group (27%) compared to control (84%) ($p<0.0001$) and to the CRYO-IVM group (56%) ($p=0.017$), with no difference between the last two groups ($p=0.055$). Analysis of the potential for embryo development by means of *in vitro* fertilization showed that the control group presented better cleavage and blastocyst formation rates than the CRYO-IVM ($p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) and the IVM-CRYO ($p<0.0001$ and $p=0.0004$, respectively) groups. Analyzing the potential for embryo development the control group presented better cleavage by means of *in vitro* fertilization (80%) and parthenogenetic activation (58%) than the CRYO-IVM (28%; $p<0,0001$; 28%; $p=0,0002$, respectively) and the IVM-CRYO groups (26%; $p<0,0001$; 22%, $p<0,0001$, respectively) Analysis of blastocyst formation rates and hatching after FIV and AT in CRYO-IVM and IVM-CRYO groups were null. Vitrification of bovine oocytes causes great impairment of their reproductive capacity regardless of the stage of maturation at the time of freezing. However the vitrified immature oocytes submitted to IVM maintained their capacity of nuclear maturation, as they achieved MII stage. This study was not able to determine which stage was better in reducing crio damage, as both stages (VG and MII) presented equally impaired by the process.

Key-words: vitrification; bovine oocyte; *in vitro* maturation; nuclear maturation; zona pellucida; viability; embryonic development.

Figura 1: Esquema dos grupos experimental	46
Figura 2: (A). Ovário bovino com folículos adequados (2-8 mm diâmetro e boa vascularização) (B) Aspecto ideal do fluido folicular após aspiração.....	47
Figura 3: Oócitos imaturos selecionados para maturação <i>in vitro</i> e/ou vitrificação de acordo com parâmetros morfológicos específicos.....	48
Figura 4: Expansão das células do cumulus – oócito após 24 horas de MIV	49
Figura 5: Imagem de oócitos (A) em estadio de metáfase II (setas indicam: a presença do conjunto cromossômico do oócito e do corpúsculo polar) aumento de 40XX. (B) aumento de 100 XX (C) em estadio de vesícula germinativa (VG) 40XX.....	50
Figura 6: Kits - Cryotop Vitrification (Cryotech lab) (A) Vitrificação (B) Desvitrificação...	51
Figura 7: Visualização da birrefringência de oócito. (A) Oócito com alta birefringência escore positivo (barra verde). (B) Oócito com baixa birrefringência escore negativo (barra vermelha).....	53
Figura 8A e B: oócitos viáveis de acordo com os critérios de viabilidade adotados, emissão de fluorescência verde e ausência de fluorescência vermelha. Enquanto C e D mostram oócito inviável com emissão concomitante das duas fluorescências	54
Figura 9 (A e B): Pool de embriões em D3, observa-se zigotos clivados com 4 e ≥ 8 células.....	56
Figura 10 (A e B): D8 de cultivo embrionário, observa-se a produção de blastocistos (setas).....	56
Figura 11(A e B): D9 de cultivo embrionário, observa-se blastocistos eclodidos (setas)	56
Figura 12 (A e B): Pool de embriões em D3, observa-se zigotos clivados com 4 e ≥ 8 células.....	58
Figura 13 (A e B): D8 de cultivo embrionário, observa-se a produção de blastocistos (setas).....	58
Figura 14 (A e B): D9 de cultivo embrionário, observa-se blastocistos eclodidos (setas)	58
Figura 15: Comparação entre os estadios meióticos (VG e MII) dos grupos controle e CRIO-MIV	61
Figura 16: Análise da Viabilidade oocitária do grupo CRIO-MIV pela técnica do DEAD-LIVE	63

Figura 17: Análise da Viabilidade oocitária do grupo MIV-CRIO pela técnica DEAD-LIVE	63
Figura 18: Análise da Viabilidade oocitária entre os grupos controles, MIV-CRIO e CRIO-MIV	64
Figura 19: FIV D3 de cultivo embrionário: (A) Grupo Controle (B) Grupo CRIO-MIV (C) Grupo MIV- CRIO. D8 de cultivo embrionário: (D) Grupo Controle (E) Grupo CRIO-MIV (F) Grupo MIV-CRIO. D9 de cultivo embrionário: (G) Grupo Controle (H) Grupo CRIO-MIV (I) MIV- CRIO.....	68
Figura 20: AT D3 de cultivo embrionário: (A) Grupo Controle (B) Grupo CRIO-MIV (C) Grupo MIV- CRIO. D8 de cultivo embrionário: (D) Grupo Controle (E) Grupo CRIO-MIV. D9 de cultivo embrionário:(F) Grupo Controle (G) Grupo CRIO-MIV blastocisto hatching (H) Grupo CRIO-MIV blastocisto eclodido (I) MIV- CRIO	69

Tabela 1: Avaliação da integridade da zona pelúcida nos grupos controle, CRIO-MIV e MIV-CRIO	62
---	----

Tabela 2: Avaliação do desenvolvimento embrionário dos oócitos submetidos à fertilização <i>in vitro</i> e ativação partenogenética nos grupos controle, CRIO-MIV e MIV-CRIO.....	67
--	----

Lista de Abreviaturas

AI =	Anáfase I
AMPc =	Adenosina Monofosfato Cíclico
ASCO =	American Society For Clinical Oncology
ASRM =	American Society For Reproductive Medicine
ATP =	Adenosina Trifosfato
AT =	Ativação Partenogenética
BSA =	Albumina Sérica Bovina
Ca ²⁺ =	Íon Cálcio
COCs =	Complexo cumulus oócitos
COH =	Controlled Ovarian Stimulation
CPAs =	Crioprotetores
CRIO =	Criopreservação
DMSO =	Dimetil-Sulfóxido
DNA =	Ácido Desoxirribonucleico
EG =	Etileno-Glicol
FIV =	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH =	Hormônio Folículo Estimulante
G =	Glicerol
GAP =	Gap Junctions
GBVD =	Germinal Vesicle Breakdown (Quebra da Vesícula Germinativa)
HEPES =	N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico
hpi =	horas pós inseminação
ICSI =	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
LH =	Hormônio Luteinizante
MAPK =	Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
MIV =	Maturação <i>in vitro</i>
MPF =	Maturation Promoting Factor (Fator Promotor de Maturação)

MZT =	Maternal Zygotic Transition
MI =	Metáfase I
M II =	Metáfase II
M-199 =	Medium 199
OPS =	Open Pulled Straw
OPU =	<i>Ovum Pick Up</i>
PROH =	1-2-Propanediol
PI =	Prófase I
RA =	Reprodução Assistida
RE =	Retículo Endoplasmático
RNA _m =	Ácido Ribonucléico mensageiro
ROS =	Reactive Oxygen Species
SFB =	Soro Fetal Bovino
SSS =	Soro Sintético Substituto
SSV =	Solid Surface Vitrification
TALP =	Tyroide's albumin lactate pyruvate
TCM-199 =	Tissue Culture Medium
TI =	Telófase I
VG =	Vesícula Germinativa
ZP =	Zona Pelúcida
6DMAP =	6-dimetilaminopurina

1. INTRODUÇÃO	28
1.1. Maturação <i>in vitro</i>	32
1.2. Criopreservação de oócitos.....	34
1.3. A associação entre Criopreservação e Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	39
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo principal.....	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1. Desenho do Estudo	45
3.2. Métodos	47
3.2.1. Seleção oocitária.....	47
3.2.2. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	48
3.2.3. Avaliação da Maturação Nuclear	49
3.2.4. Criopreservação – Vitrificação	50
3.2.5. Análise da integridade da Zona Pelúcida	52
3.2.6. Avaliação de viabilidade oocitária	53
3.2.7. Fertilização <i>in vitro</i>	55
3.2.7.1. Avaliação do Cultivo embrionário	55
3.2.8. Ativação Partenogenética	57
3.2.8.1. Avaliação do Cultivo embrionário	57
3.3. Análise estatística	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Avaliação da Taxa de Maturação Nuclear.....	61
4.2. Avaliação da Integridade da Zona Pelúcida	62
4.3. Viabilidade oocitária.....	62
4.4. Fertilização <i>in vitro</i> e cultivo embrionário	65
4.5. Ativação Partenogenética e cultivo embrionário.....	66
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ARTIGO CIENTÍFICO.....	100

1. Introdução

A preservação da fertilidade em pacientes jovens com neoplasias malignas se tornou nos últimos anos extremamente importante, visto que o número de sobreviventes a essas malignidades aumentou (índice de cura de 0,6% ao ano) devido ao avanço da terapia oncológica. O aumento anual de novos casos de câncer no mundo é de 0,3%, sendo que cerca de 253.000 mulheres foram diagnosticadas com câncer no Brasil em 2010 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011) e nos EUA, no mesmo ano, cerca de 713.000 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). Sendo que, 8% dos casos de câncer em mulheres foi diagnosticado em mulheres em idade reprodutiva (<40 anos de idade) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

Pacientes em idade reprodutiva podem preservar a sua fertilidade através de técnicas de reprodução assistida (RA) antes do início do tratamento oncológico. Esse tratamento consiste em duas terapias principais: a quimioterapia e a radioterapia, que podem ser administradas individualmente ou em associação dependendo do tipo de câncer. Essas terapias são gonadotóxicas e potencialmente esterilizantes, pois destroem uma proporção significativa da população folicular ovariana e, dependendo da idade da paciente e da intensidade do tratamento administrado, pode levar a falência ovariana prematura em 13 a 100% dos casos (BINES; OLESKE; COBLEIGH, 1996; BLUMENFELD et al., 2000).

As opções disponíveis para a preservação da fertilidade é a criopreservação de embriões, oócitos, tecido ovariano e transposição ovariana nos casos de radioterapia pélvica (ooforopexia) (LEE et al., 2006; HUANG et al., 2007; MARHHOM; COHEN, 2007; HUANG et al., 2010). A escolha da melhor técnica para a preservação da fertilidade depende da idade da paciente, do tipo de tratamento oncológico, da condição civil da paciente, do tempo hábil até o início do tratamento e do potencial do câncer em produzir metástase ovariana (SILVA, 2006).

Atualmente, as Sociedades Americanas de Reprodução Humana (ASRM) e de Oncologia Clínica (ASCO) reconhecem que a única estratégia estabelecida para a preservação da fertilidade feminina consiste em estimulação ovariana controlada (COH) para a obtenção de oócitos maduros, a fim de produzir embriões por técnicas de RA, seguido de criopreservação. (LEE et al, 2006). Porém, em algumas situações a criopreservação de embriões se torna limitada, por não preencher critérios satisfatórios de aplicabilidade de acordo com perfis específicos de certas paciente (CHIAN et al., 2009b). A criopreservação de embriões necessita de duas a cinco semanas antes do tratamento oncológico para que seja realizado todo o procedimento de RA; porém, tanto o tempo de adiamento demandado pela COH, o alto custo e a necessidade do uso de hormônios estrogênicos em pacientes, sendo que algumas apresentam tumores hormônio-dependente, pode interferir no prognóstico da paciente. O congelamento de embriões também não se aplica a pacientes sem um parceiro fixo, com quem deseje constituir prole futura, como é o caso das adolescentes. Uma alternativa seria a utilização de amostras provenientes de banco de sêmen, entretanto este tipo de abordagem se depara com questões religiosas, morais e éticas (MALTARIS et al., 2006; MARHHOM; COHEN, 2007; CHIAN et al., 2009b).

Em alternativa ao congelamento dos embriões, temos o congelamento de tecido ovariano e de oócitos, ambos ainda considerados como técnicas experimentais. A criopreservação de tecido ovariano consiste na remoção do tecido previamente ao início das sessões de quimioterapia e a utilização deste tecido posteriormente à remissão do câncer deverá ser feita por reimplante do tecido ou isolamento dos folículos imaturos e maturação *in vitro*, seguida de técnicas de RA. Assim, essa se torna uma opção disponível para pacientes sem parceiros e para aquelas com limitações de tempo e contra-indicações para estimulação ovariana, porém é atualmente restrita aos grandes centros de assistência à saúde (PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE, 2004).

Considerando os aspectos éticos e legais, a criopreservação de oócitos é vantajosa e poderia ser a técnica de escolha, já que os oócitos por se tratarem de células únicas podem ser descartados futuramente caso não venham a ser utilizados (CHA; CHIAN, 1998; CHIAN et al., 2009a). A principal desvantagem desta técnica é que, assim como no congelamento de embriões, há necessidade COH prévia com gonadotrofinas, sempre com a finalidade de maximizar o número de oócitos recrutados. Desta forma, novamente nos deparamos com a necessidade de adiamento do início do tratamento da doença oncológica para realização de COH (DAVIS, 2006; MARHHOM; COHEN, 2007). Recentemente, alguns autores propuseram a punção dos oócitos ainda imaturos e aplicação de técnicas de maturação *in vitro* associada à criopreservação destes gametas, com intuito de minimizar o tempo de indução e reduzir os custos da COH e a exposição aos altos níveis estrogênicos (CHA; CHIAN, 1998; TUCKER et al., 1998; REVEL; LAUFER, 2002; DONNEZ et al., 2006; LIN; HWANG, 2006; SUNG et al., 2007) e em 2009 Chian and cols relataram o primeiro nascimento de bebê saudável utilizando-se estes oócitos, confirmando que essa estratégia é válida (CHIAN et al., 2009).

Sendo assim, a criopreservação de oócitos e de tecido ovariano possibilitam a obtenção de oócitos em estadio imaturo (VG), contornando as limitações de outras técnicas de preservação da fertilidade para as pacientes oncológicas. Contudo, esses oócitos precisam ser competentes para comandar o desenvolvimento embrionário subsequente. De acordo com esse fato, surge então um novo questionamento em relação ao melhor estadio meiótico oocitário para a criopreservação. A realização da MIV para obtenção de oócitos maduros prévia à criopreservação apresenta melhores resultados do que a realizá-la após a desvitrificação? A literatura ainda não é conclusiva em relação à associação destes procedimentos. Se de fato os resultados forem similares o congelamento de oócitos ainda imaturos facilita a operacionalização clínica no manejo destas pacientes, além de reduzir custos, visto que

somente oócitos que sobreviverem ao processo de congelamento-descongelamento serão expostos à MIV.

1.1. Maturação *in vitro*

A capacidade de maturação *in vitro* de oócitos de mamíferos já é conhecida desde 1935, através de trabalhos publicados por Pincus e Enzmann. Em 1965, Edwards¹ mostrou que oócitos humanos maturavam *in vitro* de maneira semelhante ao *in vivo* e, em 1969, Edwards, Bavister e Steptoe² confirmaram que após a maturação *in vitro*, esses oócitos eram capazes de fertilizarem normalmente (1965; 1969; apud LE DU et al, 2005, p.1). Veeck e colaboradores em 1983 relataram o primeiro nascimento decorrente de oócitos imaturos obtidos de um ciclo estimulado e posterior MIV (VEECK et al., 1983).

Atualmente, mais de 300 crianças saudáveis já nasceram de oócitos maturados *in vitro* (HUANG et al., 2007). Apesar deste número crescente de nascimentos, os resultados ainda são modestos. Neste sentido várias pesquisas têm sido realizadas para melhorar as taxas de maturação *in vitro* de oócitos humanos (CHIAN; TAN, 2002; LIN; HWANG, 2006).

O processo de maturação do oócito é um processo complexo que inclui eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação (GOTTARDI; MINGOTI, 2009), ou seja, é um processo fundamental e de extrema importância. Esse processo compreende alterações nucleares e citoplasmáticas, através de alterações estruturais e bioquímicas (LIN; HWANG, 2006).

Durante a vida fetal inicia-se o processo de formação dos oócitos (oogênese), no qual estes permanecem na fase de prófase I da primeira divisão meiótica através de sinais inibidores sintetizados pelas células foliculares e da granulosa (SIRARD et al, 1998) e o

¹ EDWARDS, R. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature 20, 349–351. 1965.

² EDWARDS R, BAVISTER B, STEPTOE P. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature 21, 632–635. 1969.

núcleo é envolto por envelope nuclear ou vesícula germinativa (VG), o que caracteriza morfológicamente um oócito imaturo. O crescimento oocitário ocorre simultaneamente ao desenvolvimento folicular, portanto a retomada da meiose *in vivo* ocorre após estimulação pelo hormônio luteinizante (LH) e *in vitro* após retirada do oócito do ambiente folicular, o que causam alterações fisiológicas na atividade das células do cumulus (FAIR, 2003; RODRIGUEZ; FARIN, 2004). Contudo, ocorre a quebra da vesícula germinativa (GBVD) e condensação dos cromossomos e assim o oócito progride pelas fases de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), onde metade do número original de cromossomos permanece no oócito e a outra metade é incorporada ao primeiro corpúsculo polar completando a primeira divisão meiótica (MINGOTI; GARCIA; ROSA-E-SILVA, 1995; MEINECKE et al., 2001). Depois o oócito progride até metáfase II (MII) e o citoplasma é dividido assimetricamente, gerando duas células de tamanhos diferentes: o corpúsculo polar e o oócito secundário (CAN; SEMIZ; CINAR, 2003).

O oócito permanece em MII até a fecundação (MAYES; SIRARD, 2001) devido a presença do fator promotor de maturação (MPF) e da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), dois dos principais fatores envolvidos na regulação da maturação oocitária. O MPF é responsável por modificações envolvidas na regulação da condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, a reorganização dos microtúbulos e organelas citoplasmáticas e a MAPK é essencial em eventos pós-rompimento da VG (KIM ET al., 2000; KANO et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2002).

Por meio da fecundação (natural) ou ativação artificial (por meio de drogas), os fatores de ativação do oócito promovem o término da segunda divisão meiótica, que se caracteriza pela progressão da MII até a fase de telófase II e extrusão do segundo corpúsculo polar. Após a ativação, o zigoto continua seu desenvolvimento por divisão mitótica (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

A maturação citoplasmática envolve alterações metabólicas, que são processos altamente complexos e simultâneos, como síntese de proteínas (SIRARD;RICHARD;MAYES, 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), reorganização de organelas (mitocôndrias e grânulos corticais) através dos microtubulos e microfilamentos, em locais apropriados para iniciar suas atividades específicas (HYTTEL et al.,1997; STOJKOVIC et al., 2001;SUN, 2003), modificações nas concentrações de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) (CONTI et al., 1998), ativação do fator promotor de maturação (MPF) (EPPIG et al., 1996) e da via MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) (KUBELKA et al., 2000).

Um evento importante é a síntese e o acúmulo de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) (DE SOUSA et al., 1998), porque o desenvolvimento do zigoto e embrião de menos de 16 células, dependem desse pool de RNAm e das proteínas acumuladas, até que a transcrição do DNA (ácido desoxirribonucléico) do embrião, transição materno-zigótica, se torne ativa (DE LA FUENTE E EPPIG, 2001; GANDOLFI E GANDOLFI, 2001; LONERGAN et al., 2003). Portanto, a maturação nuclear e citoplasmática do oócito são eventos coordenados e a sincronia entre eles é de extrema importância para que ocorra a maturação do oócito e a capacitação deste para as etapas do desenvolvimento embrionário (WU et al., 1996; LONERGAN et al., 2000).

1.2.Criopreservação de oócitos

O processo de criopreservação de gametas vem sendo utilizado com frequência na prática clínica em RA, tanto de humanos como de animais. A criopreservação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células por tempo indeterminado (TAO; DEL VALLE, 2008).

Os primeiros relatos de oócitos criopreservados com sucesso ocorreram há mais de 30 anos (LEIBO, 2008). Chen (1986) relata a primeira gravidez de oócito humano criopreservado (CHEN, 1986). O primeiro resultado de gestação através da preservação da fertilidade com congelamento de oócitos em paciente oncológica foi relatada por Yang e cols (2007), onde estes fertilizaram os oócitos criopreservados da paciente após considerada a cura do câncer (YANG et al., 2007).

Atualmente existem dois métodos de criopreservação de oócitos: congelamento lento e a vitrificação. Vários estudos são realizados a fim de esclarecer e compreender os mecanismos envolvidos em cada método, pois ambos os métodos podem influenciar nas funções celulares do oócito (SMITH et al., 2010), visto que o processo de criopreservação expõe o oócito a diferentes mecanismos químicos, térmicos e mecânicos (MERYMAN, 1971).

Na criopreservação há o emprego de agentes crioprotetores, que são substâncias que protegem às células contra a desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. Os crioprotetores são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em: crioprotetores permeáveis ou intracelulares, que agem penetrando nas células, e os crioprotetores não-permeáveis ou extracelulares que protegem as membranas celulares através da sua ligação aos fosfolipídios de membrana. Os agentes crioprotetores podem ser alcoóis, aminas, açúcares e proteínas; os crioprotetores permeáveis mais comuns são: Dimetil-Sulfóxido (DMSO), Etileno-Glicol (EG), 1-2-Propanediol (POLLAK et al., 2007) e o Glicerol (G); e os não-permeáveis são os açúcares: sacarose e trealose (CHEN et al., 2000; MANDELBAUM, 2000). É comum a combinação entre os crioprotetores permeáveis e não-permeáveis na criopreservação, dependendo do tipo celular (oócito, embrião ou tecido ovariano) a ser criopreservado e do protocolo empregado. As principais funções dos crioprotetores compreendem a redução do ponto de congelamento, o aumento da viscosidade

do meio e a diminuição da concentração de eletrólitos, diminuindo, assim, o risco de danos osmóticos. Para que sejam efetivos devem apresentar algumas propriedades como alta solubilidade em água para diminuir o ponto de congelamento, alta permeabilidade para minimizar o gradiente osmótico e baixa toxicidade.

O congelamento lento é caracterizado pela exposição das células a baixas concentrações de agente crioprotetor ($\sim 1,5$ mol/l) (PAYNTER, 2000), por um período que pode variar de 20 a 60 minutos (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1997). Nesse método, a célula é resfriada lentamente por redução em rampa da temperatura e realização de seeding, o qual previne o super resfriamento e a extrema desidratação celular (RODRIGUES et al., 2004a). Uma das suas desvantagens é que necessita de equipamento específico e de alto custo, além de causar: desequilíbrio osmótico; formação de cristais de gelo intracelular com maior frequência, que interfere na estrutura dos fusos meióticos; enrijecimento da zona pelúcida (ZP), que pode afetar o processo de fertilização devido ao bloqueio da penetração do espermatozóide (TAO; DEL VALLE, 2008). O congelamento lento de oócitos é uma metodologia que apresenta resultados variáveis, poucos satisfatórios e nem sempre reprodutíveis (KAZEM et al., 1995; PORCU et al., 1997; YOUNG et al., 1998; ALLAN, 2004; NOTRICA et al., 2004; BORINI et al., 2006).

A técnica que revolucionou a história da criopreservação de oócitos e que vem sendo mais recentemente utilizada é a vitrificação (KUWAYAMA et al., 2005; COBO et al., 2008) que é definida como a elevação extrema da viscosidade, levando a solidificação da solução líquida em uma solução vítrea em fração de segundos, caracterizando um congelamento ultra rápido em nitrogênio líquido. A vitrificação surge como alternativa ao congelamento lento, por envolver rápidas taxas de resfriamento (15.000 a 30.000 °C/min) (LIEBERMANN; TUCKER, 2004) e aquecimento em presença de concentrações muito altas de crioprotetores,

prevenindo assim a formação de cristais de gelo, e diminuindo os danos causados a célula (VAJTA et al., 1998; KASAI; MUKAIDA, 2004; LIEBERMANN; TUCKER, 2004).

A vitrificação por ser um método simples, não necessita de equipamentos caros para sua execução e o tempo de equilíbrio e congelamento é reduzido (DOBRINSKY, 2002; KUWAYAMA et al., 2005). Por outro lado, utiliza-se altas concentrações de crioprotetor, o que pode favorecer o risco de danos tóxicos e osmóticos na célula (VAJTA et al., 1998). Uma alternativa para reduzir a toxicidade e os efeitos osmóticos dos crioprotetores é o aumento da velocidade de congelamento, reduzindo o tempo de exposição da célula ao agente crioprotetor (KUWAYAMA, 2007).

Para a vitrificação o tamanho e a forma celular são considerados extremamente importantes. O oócito é uma das maiores células do corpo humano, chegando a 150µm quando maduro (VAN DEN HURK, ZHAO, 2005). A forma oval do oócito permite a este uma distribuição homogênea dos crioprotetores permeáveis. Portanto, a exposição por um longo período provoca uma concentração continua de gradientes da periferia para o centro do oócito ou vice versa. Sendo que, uma parte do oócito não será protegida, o que resultará em dano osmótico e conseqüente mudança de forma do oócito, que pode ser prejudicial ao seu citoesqueleto (KUWAYAMA, 2007).

Dentre os potenciais danos causados nos oócitos pela criopreservação, temos os danos irreversíveis causados nas gotas lipídicas citoplasmáticas e nos lipídios constituintes da membrana celular (RUFFING et al., 1993). Em comparação, o oócito bovino contém uma concentração de lipídios citoplasmática bem maior em relação ao oócito humano, o que atribui a este último uma maior resistência à vitrificação (BERNARD et al., 1992). Em relação à membrana citoplasmática, o processo de criopreservação provoca transição do estado líquido para gel, em um processo irreversível que é prejudicial para o futuro desenvolvimento, sendo a membrana do oócito sensível (KUWAYAMA, 2007).

Na tentativa de contornar todos os problemas envolvidos no processo de criopreservação, diferentes protocolos de vitrificação têm sido desenvolvidos, variando basicamente na composição e concentração de crioprotetores (CPAs), no método de congelamento (SRIPUNYA et al., 2010) e nos dispositivos de acondicionamento das amostras, os quais podem ser: grades de microscopia eletrônica de transmissão (MARTINO, SONGSASEN, LEIBO 1996), capilares de vidro (HOCHI et al., 1994), palhetas abertas estendidas (OPS- Open Pulled Straw) (VAJTA et al., 1998), Cryoloop (LANE;SCHOOLCRAFT;GARDNER,1999),Cryotop (KUWAYAMA et al., 2005), Criotips (KUWAYAMA et al., 2005), Superfície Sólida de Vitrificação (SSV- Solid Surface Vittrification) (DINNYES et al,2000), Microgotas (Microdrop) (PAPIS;SHIMIZU; IZAIKE, 2000), Flexipet-Denuding Pipette (LIEBERMANN; TUCKER, 2002), Nylon Mesh (MATSUMOTO et al., 2001), Hemi-Palhetas (Hemi Straw) (KUWAYAMA; KATO, 2000).

Dentre esses dispositivos, o cryotop é um sistema que permite o carregamento de oócitos ou embriões com volume mínimo. Oócitos de diferentes espécies, humanos (ANTINORI et al., 2007; KUWAYAMA, 2007), suínos (LIU et al., 2008), eqüinos (BOGLIOLO et al.,2006), ovinos (SUCCU et al., 2007), bovinos (CHIAN et al., 2004) e de búfalos (GASPARRINI et al., 2007) foram vitrificados com sucesso, usando este método.

Kuwayama and cols (2005) em seu trabalho com vitrificação afirmam que as principais vantagens da vitrificação é a taxa de resfriamento extremamente rápida (23.000°C/min) o qual previne lesão no oócito, pelo fato do volume de vitrificação ser muito baixo. Assim, altas taxas de aquecimento (42.000 °C/min) são alcançadas evitando a formação de cristais de gelo no processo de descongelamento e a concentração de crioprotetores permeáveis é reduzida em 30%, minimizando os efeitos potencialmente tóxicos (KUWAYAMA et al., 2005). Uma das limitações deste método é em relação ao número reduzido de oócitos vitrificados por haste (palheta – cryotop), sendo recomendado no

protocolo de três oócitos por palheta, o que leva ao aumento no tempo de execução da técnica quando for necessário vitrificar vários de oócitos (SPRIPUNYA et al., 2010). Outra preocupação com o uso do cryotop é pelo fato deste ser um sistema aberto, onde as células são expostas diretamente no nitrogênio líquido, permitindo um risco potencial de transmissão de doenças através do nitrogênio líquido contaminado (BIELANSKI et al., 2000).

O método cryotop vem aumentando sua aplicação na rotina dos laboratórios de reprodução assistida, com altas taxas de sobrevivência oocitária, desenvolvimento *in vitro* e gestação em relação à criopreservação pelo método lento (KATAYAMA et al., 2003; STEHLIK et al., 2005; LUCENA et al., 2006; KUWAYAMA, 2007).

1.3. A associação entre Criopreservação e Maturação *in vitro* de oócitos

Uma estratégia totalmente aplicável em pacientes oncológicas é a associação entre a criopreservação de oócito e maturação *in vitro*. Como algumas pacientes não podem ser estimuladas com gonadotrofinas, os oócitos imaturos (VG) podem ser captados e então submetidos a dois protocolos: (1º) maturação *in vitro* seguido de criopreservação ou (2º) criopreservação dos oócitos imaturos seguido de MIV, para futura aplicação de RA.

Essa associação entre as técnicas de criopreservação e maturação *in vitro* é efetivamente comprovada através da literatura, demonstrando que é uma alternativa pouco invasiva e uma estratégia válida de preservação da fertilidade, que resulta em gestação com nascimento saudável.

Portanto não há consenso sobre qual estadio meiótico (VG ou MII) apresenta maior resistência aos possíveis danos causados pela criopreservação, pois os dois estadios apresentam configuração nuclear e estrutural diferentes, os quais os conferem vantagens e desvantagens.

O estadio de vesícula germinativa (bloqueado em prófase da primeira divisão meiótica) por apresentar uma membrana nuclear que envolve e protege a cromatina e a ausência do fuso meiótico confere maior resistência e menor dano após a criopreservação, garantindo assim a ausência de anormalidades cromossômicas durante as divisões celulares e maior taxa de sobrevivência ao processo de maturação *in vitro* e criopreservação (CHA; CHIAN, 1998; TUCKER et al., 1998). Conseqüentemente é apontado por diversos trabalhos como mais resistentes do que os oócitos maduros (GALLICANO, MCGAUGHEY, CAPCO, 2004; BATTAGLIA et al., 1996; KIM et al 2010). Porém, a criopreservação pode causar sérios danos devido à baixa estabilidade da membrana plasmática e a interrupção das projeções das células do cumulus, o qual controla a comunicação intercelular entre as células do cumulus e o oócito durante a maturação e FIV, levando a não aquisição da competência oocitária, sobrevivência e subsequente desenvolvimento embrionário (PARK et al., 2005; MAGNUSSON et al., 2008).

Já os oócitos em estadio maduro estão bloqueados na metáfase da segunda divisão meiótica (MII) com 23 cromossomos alinhados na placa metafásica e apresentam fuso meiótico. Durante a criopreservação, cristais de gelo podem se formar e causar rompimento e despolimerização do fuso meiótico, levando a anormalidades cromossômicas e não desenvolvimento embrionário subsequente. Também pode provocar exocitose prematura dos grânulos corticais que estão distribuídos no córtex e próximos à membrana plasmática (ADONA ET AL., 2008) causando enrijecimento da zona pelúcida (ZP), bloqueando a penetração do espermatozóide e não levando a não fertilização desses oócitos (GOOK et al., 1994; FABBRI et al., 2001). Porém, a ICSI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide) pode até certo ponto, minimizar este efeito (GOOK et al., 1994; KIM et al., 2007), principalmente em humanos, onde atualmente é estabelecida e empregada como a principal técnica de fertilização *in vitro* nos laboratórios de reprodução assistida. De acordo com os

dados de Cha and Chian, (1998), a taxa de fertilização de oócitos humanos maturados *in vitro*, criopreservação e inseminados por ICSI, apresentaram diferença significativa (64.3%) em comparação com aqueles oócitos submetidos à FIV convencional (27.3%) (CHA; CHIAN, 1998).

Chian and cols (2009) relataram o primeiro nascimento com sucesso em 2006, a partir de um oócito humano imaturo coletado de um ciclo menstrual espontâneo, submetido a MIV e criopreservado pelo método de vitrificação (CHIAN et al., 2009a), onde taxas de nascimento de 20% a partir de oócitos coletados imaturos, maturados *in vitro* e vitrificados foram relatadas (CHIAN et al., 2009b). Contudo, estudos com bovinos sugerem que os oócitos em MII são mais tolerantes ao processo de criopreservação (HOCHI et al., 1998) e que as maiores taxas de blastocistos bovinos são obtidas de oócitos criopreservados no estadio de MII (LUNA et al., 2001).

Com base em todas estas considerações e este projeto visou avaliar qual a melhor sequência de procedimentos, de acordo com o estadio meiótico oocitário para se obter oócitos desvitrificados, maduros e viáveis para a realização de reprodução assistida, como estratégia de preservação de fertilidade em pacientes submetidas a terapias potencialmente esterilizantes. O uso de modelo experimental bovino neste estudo se justifica pela similaridade no tamanho e morfologia dos ovários humano e bovino, por ambas as espécies serem monovulatórias e policíclicas e por ser um material abundante, barato, de fácil manipulação (FERREIRA et al., 2009).

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Determinar, utilizando modelo experimental bovino, em qual estágio do desenvolvimento, ou seja, estágio de VG (imaturo) ou estágio de MII (maduro), o oócito é menos susceptível aos possíveis danos causados pela criopreservação. Visando assim, a aplicação subsequente nos procedimentos de criopreservação de oócitos humanos, para a preservação de fertilidade de pacientes que são submetidas a tratamento potencialmente esterilizante.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da vitrificação pré e pós maturação *in vitro* dos oócitos, através da sequência dos procedimentos: criopreservação de oócitos imaturos (VG) seguida de MIV ou MIV seguido de criopreservação de oócitos maduros (MII), pelos seguintes parâmetros:

- Maturação nuclear avaliada pela técnica de coloração com orceína acética.
- Viabilidade oocitária determinada pela técnica de DEAD-LIVE.
- Integridade da zona pelúcida determinada por microscopia de polarização (OCTAX PolarAIDE).
- Potencial de desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro*.
- Potencial de desenvolvimento embrionário após ativação partenogenética.

3. Material e Métodos

3.1. Desenho do Estudo

O estudo foi realizado no setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, especificamente no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia – Cultivo Celular. A leitura das amostras processadas pela técnica do Dead-Live em microscópio de fluorescência foi realizada no laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução Feminina do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Após a seleção dos oócitos imaturos através da morfologia do *complexo cumulus oophorus* (COCs) e aspecto do ooplasma os oócitos foram divididos em três grupos:

- Grupo- Controle: constituído de oócitos imaturos submetidos à maturação *in vitro* (sem intervenção da vitrificação);
- Grupo - CRIO-MIV: constituído de oócitos vitrificados imaturos, desvitrificados e submetidos à maturação *in vitro*,
- Grupo - MIV-CRIO: constituído de oócitos obtidos imaturos, maturados *in vitro* e posteriormente vitrificados e desvitrificados.

As avaliações foram realizadas após a maturação *in vitro* e após a desvitrificação, de acordo com cada grupo. Os oócitos foram avaliados quanto ao potencial de maturação nuclear, integridade da zona pelúcida, viabilidade e potencial de desenvolvimento embrionário (clivagem, produção de blastocistos e eclosão) através da fertilização *in vitro* e da ativação partenogenética.

Figura 1. Esquema dos grupos experimental.

Legenda. OPU= *Ovum Pick-Up*; CRIO = Criopreservação; MIV = Maturação *in vitro*; ZP= Zona Pelúcida; FIV= Fertilização *in vitro*; AT= Ativação Partenogenética; CIV= Cultivo embrionário *in vitro*.

3.2. Métodos

3.2.1. Seleção oocitária

a) Colheita e Manipulação dos ovários

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em abatedouro local e após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e transportados ao laboratório imersos em solução fisiológica a 35-37 °C, acrescida de penicilina e estreptomicina (SIRARD; BILODEAU, 1990). Posteriormente, foram lavados em solução fisiológica pré-aquecida na temperatura de 35-37 °C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos.

b) Aspiração, Manipulação dos ovários e seleção dos oócitos

Foram selecionados folículos visíveis apresentando aproximadamente entre 2-8 mm de diâmetro, boa vascularização e coloração do fluido folicular (Figura 2).

Figura 2. (A) Ovário bovino com folículos adequados (2-8 mm diâmetro e boa vascularização). (B) Aspecto ideal do fluido folicular após aspiração.

A aspiração dos folículos foi realizada com agulhas de calibre 25x7mm, adaptadas em seringas de 10mm, após o fluido folicular foi depositado em cálice cônico mantido à temperatura de 38,5 °C. Após a decantação por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o

sedimento lavado com meio TALP (Tyroide's albumin lactate pyruvate media) com tampão HEPES ((*N*-(2-hidroxietil) piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico) e transferido para placa de Petri, mantida em placa aquecedora na temperatura de 38,5 °C.

Os COCs imaturos foram selecionados sob estereomicroscópio baseado em parâmetros morfológicos para seleção dos oócitos viáveis para a maturação *in vitro* (grupo MIV-CRIO) ou vitrificação (grupo CRIO-MIV) dos oócitos imaturos, sendo realizada após a desvitrificação, a MIV dos oócitos imaturos em cocultivo com cinco COCs (complexo *cumulus oophorus*). Os parâmetros morfológicos utilizados para selecionar o COCs foram:

1. Aspecto do ooplasma: oócitos com citoplasma uniforme.
2. Aspecto das células do *cumulus oophorus*: oócitos com várias camadas de células do cumulus compactas (Grau I) e com ≥ 5 camadas de células (Grau II) uniformes.
3. Vacúolos: oócitos sem vacúolos.

(Figura 3). Os COCs selecionados foram transferidos para placa com meio TALP-HEPES.

Figura 3. Oócitos imaturos selecionados para maturação *in vitro* e/ou vitrificação de acordo com parâmetros morfológicos específicos.

3.2.2. Maturação *in vitro* de oócitos

Para a maturação *in vitro* foi utilizado o meio de maturação padrão TCM-199 (Tissue Culture Medium) com sais Earle, HEPES e L-glutamina (Invitrogen, GIBCO Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 100 UI/ml

de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,5 µg/ml de FSH, 5,0 µg/ml de LH e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Os oócitos selecionados de acordo com a morfologia, foram maturados em microgotas de 70 µl, na densidade de 20 COCs/ microgota, em placas de Petri 35mm, cobertas com óleo mineral (SIGMA) a 38,5 °C, 95% de umidade, 5% de CO₂ em ar. Os oócitos permaneceram por um período de 20 ou 24 horas em meio de maturação *in vitro* (dependendo da técnica posterior a ser empregada). Após 20- 24 horas de MIV, foram selecionados os oócitos que apresentaram grau de expansão uniforme das células do cumulus-oócito (Figura 4).

Figura 4. Expansão das células do cumulus – oócito após 24 horas de MIV.

3.2.3. Avaliação da Maturação Nuclear

Para determinação do estadio de maturação nuclear, os oócitos foram primeiramente desnudados (remoção das células do *cumulus oophorus*) com solução de hyaluronidase (SIGMA) 0,03% em TCM-HEPES com auxílio de um micropipetador. Posteriormente, os oócitos foram lavados e transferidos para uma lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada.

Nas lâminas foram colocados 10 oócitos para o grupo vitrificação e 20 oócitos para o grupo controle. Nas bordas das lamínulas, foram realizadas pequenas gotas de cola (silicone), para pressionar suavemente a lamínula sobre a lâmina criando uma pressão nos oócitos,

levando a distensão da zona pelúcida. As lâminas foram colocadas em fixador (3:1) composto de metanol e ácido acético, por no mínimo 24 horas. Após a fixação, foi realizada a coloração das lâminas com aceto-orceína e a vedação da lâmina com esmalte incolor, para posterior avaliação através de microscópio óptico nos aumentos de 40 e 100x (LUNA;FERRARI; RUMPF, 2001). As configurações cromossômicas foram avaliadas para os seguintes estadios da maturação nuclear: metáfase I (MI), metáfase II (MII) (Figura 5 A, B), vesícula germinativa (VG) (Figura 5 C) (LUNA;FERRARI; RUMPF, 2001).

Figura 5. Imagem de oócitos (A) em estadio de metáfase II (setas indicam: a presença do conjunto cromossômico do ócito e do corpúsculo polar) aumento de 40XX (B) aumento de 100XX. (C) em estadio de germinativa (VG) 40XX.

3.2.4. Criopreservação – Vitrificação

Para a técnica de criopreservação foram selecionados preferencialmente oócitos com ausência de: pigmentações, retração citoplasmática e vacúolos e aqueles com zona pelúcida íntegra. Os oócitos foram vitrificados e desvitrificados de acordo com a metodologia e protocolo do kit comercial de vitrificação e desvitrificação Cryotop Vitrifcation (marca Cryotech) (Figura 6). Foram vitrificados três oócitos por palheta -cryotop (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japão), onde esta consiste em uma haste fina de polipropileno (ponta do cryotop) de 0,4mm de largura x 20 mm de comprimento x 0,1 mm de espessura, ligadas a um cabo de plástico de 3 cm e com uma tampa de plástico que conferem proteção no armazenamento (KUWAYAMA et al., 2007).

As soluções de vitrificação são constituídas por meio básico M-199, HEPES suplementado com Soro Sintético Substituto (SSS) com etilenoglicol (EG), sacarose e dimetilsulfóxido (DMSO). A metodologia do kit consiste em uma fase de equilíbrio realizada com solução contendo EG, DMSO e sacarose, respeitando o tempo exigido em cada etapa (3min, 3 min e 9 min), depois os oócitos foram colocados em solução de vitrificação no máximo em 90 segundos, então foram carregados em um volume muito pequeno de meio (0,1µl), onde foi aspirado o excesso de meio e depois a palheta (cryotop) foi imersa em nitrogênio líquido. Posteriormente, a tampa de plástico foi acondicionada sobre a parte fina do cryotop, que contém os oócitos fixados e assim foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento da desvitrificação (KUWAYAMA et al.,2005).

No descongelamento ou aquecimento, a tampa de plástico foi removida do cryotop, ainda com a palheta submersa em nitrogênio líquido. Depois, a ponta do cryotop foi imersa diretamente em uma placa a 37 °C contendo meio básico M-199 com HEPES (suplementado com SSS) e sacarose para contrabalançar o choque osmótico causado pelos crioprotetores permeáveis acumulado intracelularmente. Seqüencialmente, os oócitos foram mantidos em equilíbrio por 2 horas em meio livre de gonadotrofinas, em estufa de cultivo a 38,5° C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade (KUWAYAMA et al., 2007).

Figura 6. Kits Cryotop Vitrification (Cryotech lab) (A) Vitrificação (B) Desvitrificação .

3.2.5. Análise da integridade da Zona Pelúcida

Para a avaliação da integridade da zona pelúcida foi utilizado um microscópio invertido (Nikon Eclipse TE-355 2000), equipado com um vídeo, câmera e o com o hardware do microscópio de polarização (OCTAX polarAIDE™ implemented in OCTAX eyeware; MTG, Altdorf, Germany). Este método produz uma imagem que analisa quantitativamente a birefringência da zona pelúcida do oócito, através da orientação radial das glicoproteínas da camada interna da ZP (OLDENBOURG, 1996; PELLETIER;KEEFE; TRIMARCHI, 2004).

Como a ZP possui três camadas estruturais, onde os filamentos são arranjados de formas diferentes, há a exibição de diferentes birefringências com o Polscope. Os filamentos da camada interna da ZP são arranjados radialmente e exibem alta birefringência, enquanto os filamentos das outras camadas são orientados tangencialmente e retardam a luz a um menor grau, exibindo birefringência moderada. As camadas são separadas pela camada média, o qual exibe mínimo de birefringência devido à orientação ao acaso dos filamentos (KEEFE et al., 1997). De acordo com essa birefringência, o sistema gera automaticamente um número elevado (>20) de perfis de intensidade distribuídos em todo o perímetro da célula analisada. Em cada um destes perfis de intensidade, características como intensidade máxima de birefringência e largura da camada interna, são combinadas e fornecem uma análise por oócito (EBNER et al., 2010).

Todos os oócitos foram previamente desnudados com hyaluronidase 0,03% (SIGMA) e por repetidos movimentos (desnudamento mecânico) com auxílio de um micropipetador. Depois, foram distribuídos individualmente em microgotas de meio TCM-199 (GIBCO) suplementado com albumina sérica bovina (BSA), em placa de Petri revestidas com vidro na parte inferior (MatTek Corp., Ashland, MA). Assim, foram mantidos antes da avaliação por no mínimo uma hora em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 38,5 °C.

Os oócitos foram analisados individualmente e o escore da birefringência da ZP (positiva:verde ou negativa:vermelha) foi automaticamente gerada pelo programa (Figura 7)

Figura 7. Visualização da birrefringência de oócitos. (A) Oócito com alta birefringência escore positivo (barra verde). (B) Oócito com baixa birrefringência escore negativo (barra vermelha).

No grupo controle, os oócitos foram avaliados após 24 horas de MIV, para avaliar a influência da MIV na integridade da ZP. No grupo CRIO-MIV os oócitos foram vitrificados imaturos, desvitrificados, maturados *in vitro* por 24 horas e avaliados, para verificar a influência da vitrificação em associação com a MIV. Já no grupo MIV-CRIO os oócitos foram avaliados em dois momentos: pós-maturação, onde estes foram maturados *in vitro* por 24 horas e depois avaliados. Pós-vitrificação, onde os mesmos foram vitrificados, desvitrificados e avaliados.

3.2.6. Avaliação de viabilidade oocitária

A viabilidade oocitária após a maturação *in vitro* e vitrificação foi estimada pela técnica do DEAD-LIVE, no qual permite diferenciar células viáveis e inviáveis, de acordo com a cor da fluorescência emitida, devido a marcação pela calceína e pelo homodímero de etídio, por leitura em microscopia de fluorescência (filtro FITC e RODAMINA, respectivamente) (MALTARIS et al., 2006b). De acordo com os princípios da técnica, a

calceína utiliza o cálcio como co-fator, o qual é metabolizada por células com viabilidade preservada, emitindo fluorescência verde. O homodímero de etídio, por sua vez, somente consegue penetrar em células cuja membrana plasmática tenha perdido sua integridade, emitindo fluorescência vermelha.

Para a avaliação da viabilidade oocitária, realizamos a análise qualitativa das imagens obtidas por microscopia de fluorescência, considerando-se que a viabilidade de um oócito para fins reprodutivos depende de sua integridade total, utilizamos como critérios de viabilidade: -Oócitos viáveis = presença da fluorescência verde (metabolização da calceína) e ausência completa de fluorescência vermelha (homodímero de etídio) (Figura 8 A e B). - Oócitos inviáveis = presença concomitante das duas fluorescências em um mesmo oócito. No qual este oócito foi interpretado como oócito vivo, entretanto com viabilidade comprometida (perda de integridade da membrana), não sendo possível utilizá-lo para fins reprodutivos (Figura 8C e D).

Figura 8 A e B oócitos viáveis de acordo com os critérios de viabilidade adotados, emissão de fluorescência verde e ausência de fluorescência vermelha. Enquanto C e D mostram oócito inviável com emissão concomitante das duas fluorescências.

3.2.7. Fertilização *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* utilizou-se sêmen bovino de um touro da raça Nelore (CRV-Lagoa da Serra) congelado em palhetas de 0,25ml, onde estas foram descongeladas em banho-maria a 35 °C por 30 segundos. A seleção e capacitação dos espermatozóides foram realizadas através da migração ascendente (*swim up*), em meio SPTL TALP- HEPES (PARRISH et al., 1988) acrescido de 6mg/ml de BSA fração V (SIGMA). Os oócitos selecionados foram incubados com os espermatozóides capacitados na concentração de 2×10^6 espermatozóides/mL, em placa de cultivo com gotas de 50µl de meio de fecundação FERT TALP com 6mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 10mg/ml de heparina. Em seguida, foram incubados por 18 horas em estufa de cultivo a 38,5° C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade.

Após 18 horas de fecundação *in vitro*, os supostos zigotos foram submetidos ao desnudamento parcial (duas a três camadas de células da granulosa) em meio CR2aa (PARRISH et al., 1988) e depois foram transferidos para placa de cultivo em gotas de 50 µl de meio CR2aa suplementado com 5% SFB e 1mg/ml de BSA, sob óleo mineral. Os zigotos foram cultivados durante nove dias em estufa de cultivo celular com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.2.7.1. Avaliação do Cultivo embrionário

Foram realizadas avaliações durante todo o cultivo embrionário, sendo que este teve duração de nove dias. No terceiro (D3) e no sexto dia (D6) de cultivo o meio de cultivo embrionário (CR2aa) foi renovado. No terceiro dia, ou seja, 72 horas pós inseminação (hpi) (RAANANI;SHPILBERG; BEN-BASSAT, 2007) os supostos embriões foram avaliados e assim calculada a taxa de clivagem, onde foram considerados clivados zigotos com 2 células, 4 células, ≥ 8 células. (Figura 9).

Figura 9. (A e B) Pool de embriões em D3, observa-se zigotos clivados com 4 e ≥ 8 células

No oitavo dia (D8) de cultivo (168-192 hpi) foi calculada a taxa de produção embrionária de acordo com o número de blastocistos desenvolvidos (Figura 10).

Figura 10. (A e B) D8 de cultivo embrionário, observa-se a produção de blastocistos (setas).

No nono dia (D9) de cultivo (224 hpi) foi calculada a taxa de blastocistos eclodidos (hatching), com base no número de blastocistos desenvolvidos no oitavo dia (Figura 11).

Figura 11. (A e B) D9 de cultivo embrionário, observa-se blastocistos eclodidos (setas).

3.2.8. Ativação Partenogenética

A partenogênese é definida como a produção de um embrião, com ou sem eventual desenvolvimento de um indivíduo, a partir de um gameta feminino na ausência da contribuição do gameta masculino (BEATTY, 1957). Na tentativa de simular artificialmente a função do espermatozóide, agentes químicos ativadores são utilizados, como a Ionomicina e o 6-dimetilaminopurina (6DMAP).

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os oócitos foram incubados com hyaluronidase 0,03% em TCM-199 por 5 minutos e depois foram desnudados com auxílio de um micropipetador. Os oócitos foram ativados com meio TCM-199 com 25mM de HEPES suplementado com 0,5 mg/mL de BSA e 5µm de ionomicina (Sigma, St Louis, USA) por 5 minutos. Após a incubação os oócitos foram lavados em H-199 saturado com 30mg/ml de BSA, seguido de cultivo em meio CR2aa suplementado com 1mg/mL de BSA, 2% SFB e 2nm de 6-DMAP por 3 horas. Após o procedimento de ativação, os oócitos foram lavados e cultivados *in vitro* em gotas de 50µl de meio CR2aa (livre de 6-DMAP) com monocamada de células, sob óleo mineral a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂.

3.2.8.1. Avaliação do Cultivo embrionário

Foram realizadas avaliações durante todo o cultivo embrionário, sendo que este teve duração de nove dias, considerando o primeiro dia de cultivo (D1) o dia da ativação. No terceiro dia (D3) os supostos embriões foram avaliados, onde foram considerados clivados zigotos com 2 células, 4 células, ≥ 8 células e assim calculada a taxa de clivagem (Figura 12). No oitavo dia (D8) de cultivo foi calculada a taxa de produção embrionária de acordo com o número de blastocistos desenvolvidos (Figura 13). No nono dia (D9) foi calculada a taxa de eclosão (hatching) com base no número de blastocistos desenvolvidos no oitavo dia (Figura 14).

Figura 12. (A e B) Pool de embriões em D3, observa-se zigotos clivados com 4 e ≥ 8 células

Figura 13. (A e B) D8 de cultivo embrionário, observa-se a produção de blastocistos (setas).

Figura 14. (A e B) D9 de cultivo embrionário, observa-se blastocistos eclodidos (setas).

3.3. Análise estatística

A análise das variáveis foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Na análise das variáveis foram utilizadas tabelas de contingência, aplicando-se os testes Qui-quadrado (e Exato de Fischer. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

Experimento 1: Análise da maturação nuclear, integridade da zona pelúcida e viabilidade oocitária.

a) Grupo CRIO -MIV

Foram realizadas três repetições com o grupo CRIO-MIV, onde os oócitos imaturos foram submetidos à vitrificação, desvitrificação e maturação *in vitro*. Após cada procedimento de MIV os oócitos foram avaliados quanto ao estadio de maturação nuclear, integridade da zona pelúcida e viabilidade celular.

Não foi possível analisar todos os parâmetros no mesmo oócito, seja pelo tempo de exposição do oócito à temperatura externa à incubadora, ou seja, pela inviabilidade após o emprego de certas técnicas, como a necessidade de fixação do oócito (p ex: técnica da orceína acética para estadio meiótico) e a utilização de marcadores (calceína e brometo de etídio na técnica do DEAD-LIVE). No total das três baterias, 71 oócitos imaturos (VG) foram vitrificados, desvitrificados e maturados *in vitro*, 40 oócitos foram avaliados em relação à integridade da ZP, 34 oócitos avaliados quanto a viabilidade e em 24 oócitos foram avaliados o estadio meiótico pela técnica da orceína acética. No grupo controle 173 oócitos foram maturados *in vitro*, onde 60 foram avaliados quanto a integridade da ZP, 49 oócitos avaliados a viabilidade e 43 avaliados o estadio meiótico.

b) Grupo MIV – CRIO

Foram realizadas três repetições com o grupo MIV-CRIO, onde os oócitos imaturos foram submetidos à maturação *in vitro*, vitrificação e desvitrificação, nesta ordem. Antes de vitrificar e após a desvitrificação, os oócitos foram avaliados quanto à integridade da zona pelúcida e viabilidade celular. O estádio de maturação não foi realizado já que os oócitos haviam sido maturados pré-vitrificação e uma vez que a maturação foi realizada em oócitos frescos como de rotina em nosso laboratório, sendo considerada a taxa de maturação histórica,

cerca de 80% de oócitos maturados (este controle é reavaliado mensalmente em nosso laboratório para fins de controle de qualidade do laboratório).

No total das repetições, no grupo MIV-CRIO 62 oócitos foram maturados *in vitro*, vitrificados e desvitrificados. Todos foram avaliados em relação à integridade da zona pelúcida, sendo que 46 foram analisados em relação à viabilidade celular. O grupo controle (oócitos não criopreservados) foi constituído de 120 oócitos maturados *in vitro*, onde 60 foram avaliados quanto à integridade da zona pelúcida e 53 em relação à viabilidade celular.

4.1. Avaliação da Taxa de Maturação Nuclear

No grupo CRIO-MIV o estadio meiótico foi analisado após 24 horas de maturação *in vitro* dos oócitos que foram vitrificados e desvitrificados em estadio de vesícula germinativa (imaturos). No grupo controle obtivemos taxa de 67% de maturação (n= 29/43) e no grupo CRIO-MIV 50% (n=12/24), verificamos que não houve diferença entre os grupos (p=0,23) (Figura 15). No grupo MIV- CRIO esta avaliação não foi realizada.

Figura 15. Comparação entre os estadios meióticos (VG ou MII) dos grupos controle e CRIO-MIV.

Legenda: VG= Vesícula Germinativa ; MI= Metáfase I; MII = Metáfase II; Sem ID = Sem Identificação. (p=0,23).

4.2. Avaliação da Integridade da Zona Pelúcida

Em relação à zona pelúcida verificamos que a totalidade dos oócitos nos três grupos (CRIO-MIV, MIV-CRIO e controle) apresentou leitura de ZP positiva em 100% dos oócitos analisados (Tabela 1), independente da evolução posterior do oócitos quando submetidos a testes funcionais (fertilização *in vitro* e ativação partenogenética).

Tabela 1. Avaliação da integridade da zona pelúcida nos grupos CRIO-MIV, MIV-CRIO. e controle.

	Zona Pelúcida			
	Positiva		Negativa	
	<i>N</i>	%	<i>n</i>	%
Controle	122	100	0	0
CRIO-MIV	40	100	0	0
MIV-CRIO <i>pré</i> *	60	100	0	0
MIV-CRIO <i>pós</i> *	60	100	0	0

* A análise de ZP neste grupo foi realizada em dois momentos, pré e pós vitrificação dos oócitos maturados.

4.3. Viabilidade oocitária

Para cada grupo experimental foi realizado um controle para leitura comparativa das amostras, visto que a execução do DEAD-LIVE depende de muitos fatores externos que podem variar de um experimento para outro (tempo de exposição à calceína e brometo, tempo entre a aplicação da solução e a leitura). Embora os grupos sejam controlados separadamente ao compararmos a taxa de viabilidade entre os grupos controle entre si verificamos que não houve diferença (Ctr CRIO-MIV vs Ctr MIV-CRIO; $p=0,58$).

Ao analisarmos a intensidade de fluorescência emitida por cada oócito, no grupo CRIO-MIV, encontramos uma taxa de 56% de viabilidade oocitária e no grupo controle taxa de 77%, não havendo diferença entre eles ($p=0,055$) (Figura 16).

Figura 16. Análise da Viabilidade oocitária do grupo CRIO-MIV pela técnica do DEAD-LIVE.

(*) $p=0,055$

Ao analisarmos a intensidade de fluorescência emitida por cada oócito, comparando os oócitos que foram maturados *in vitro*, vitrificados e desvitrificados (Grupo MIV-CRIO) (n=41) e controle (n=38), verificamos que houve redução da viabilidade dos oócitos maduros após a vitrificação ($p<0,0001$), com taxas de 27% e 84% de viabilidade oocitária, respectivamente. (Figura 17).

Figura 17. Análise da Viabilidade oocitária do grupo MIV-CRIO pela técnica DEAD-LIVE.

(*) $p<0,0001$

E finalmente, em relação a comparação entre os grupos MIV-CRIO e CRIO-MIV houve diferença estatística entre eles ($p=0,017$) (Figura 18), sendo que o grupo CRIO-MIV apresentou melhores taxas de viabilidade pós criopreservação.

Figura 18. Análise da Viabilidade oocitária entre os grupos controles, MIV-CRIO e CRIO-MIV.

Legenda: (a) $p<0,0001$; (b) $p=0,017$.

Experimento 2: Avaliação do desenvolvimento embrionário

Para avaliar o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem, produção e eclosão de blastocistos), foram realizadas cinco repetições da técnica de fertilização *in vitro*, onde a totalidade de oócitos de cada grupo (controle = 211 oócitos, CRIO-MIV = 39 oócitos e MIV-CRIO = 46 oócitos) foram submetidos à FIV. Para a técnica de ativação partenogenética, foram realizadas sete repetições, onde a totalidade de oócitos de cada grupo (controle = 205 oócitos, CRIO-MIV = 50 oócitos e MIV-CRIO = 63 oócitos) foram submetidos à AT.

4.4. Fertilização *in vitro* e cultivo embrionário

A) Avaliação da taxa de clivagem

No grupo controle obtivemos taxa de clivagem (80%) estatisticamente significativamente em relação aos grupos CRIO-MIV (28%; $p < 0,0001$) e MIV-CRIO (26%; $p < 0,0001$) (Tabela 2) (Figuras 19 A,B e C). Porém, na comparação entre os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO não houve diferença estatística ($p = 1,0$).

B) Avaliação da produção de blastocistos

No grupo controle obtivemos 26% de produção de blastocistos, enquanto nos grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO verificamos ausência de formação de blastocistos (Tabela 2) (Figura 19 D, E e F).

C) Avaliação da taxa de eclosão de blastocistos

No grupo controle obtivemos taxa de 41% de eclosão de blastocistos, enquanto nos grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO não houve desenvolvimento embrionário no D8, portanto, não houve eclosão no D9 (Tabela 2). (Figura 19 G, H e I).

4.5. Ativação Partenogenética e cultivo embrionário

A) Avaliação da taxa de clivagem

No grupo controle obtivemos taxa de clivagem de 58% estatisticamente significativa em comparação aos grupos CRIO-MIV (28%; $p=0,0002$) e MIV-CRIO (22%; $p<0,0001$) (Tabela 2). Porém, entre os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO não houve diferença estatística ($p=0,59$) (Figura 20 A, B e C).

B) Avaliação da taxa de produção de blastocistos

No grupo controle obtivemos 24% de produção de blastocistos, 2% no grupo CRIO-MIV e 0% no grupo MIV-CRIO, portanto, com prejuízo significativo nos dois grupos de vitrificação ($p<0,0001$) em ambas as comparações (Tabela 2) (Figura 20 D,E). Entre os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO não se obteve diferença ($p=0,65$).

C) Avaliação da taxa de eclosão de blastocistos

No grupo controle obtivemos-se taxa de 18% de eclosão de blastocistos, no grupo CRIO-MIV houve a eclosão de apenas um blastocisto ($p=0,04$), e no grupo MIV-CRIO não houve eclosão de blastocisto ($p=0,003$) (Tabela 2). (Figura 20 F,G,H e I).

Tabela 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário dos oócitos submetidos à fertilização *in vitro* e ativação partenogenética nos grupos controle, CRIO-MIV e MIV-CRIO.

		CONTROLE		CRIO-MIV		MIV-CRIO	
		n	%	n	%	n	%
FIV	Clivagem	169 ^{a,b}	80	11 ^a	28	12 ^b	26
	Produção	54 ^{c,d}	26	0 ^c	0	0 ^d	0
	Eclosão*	22	41	0	0	0	0
AT	Clivagem	118 ^{e,f}	58	14 ^e	28	14 ^f	22
	Produção	50 ^{g,h}	24	1 ^g	2	0 ^h	0
	Eclosão*	9 ^{i,j}	18	1 ⁱ	100	0 ^j	0

Legenda. a:p<0,0001; b: p<0,0001; c:p<0,0001; d:p=0,0004; e:p=0,0002; f:p<0,0001; g:p<0,0001; h:p<0,0001; i:p=0,04; j:p=0,003. * A taxa de eclosão é calculada a partir do numero de blastocistos formados no D8.

Figura 19.FIV D3 de cultivo embrionário: (A) Grupo Controle (B) Grupo CRIO-MIV (C) Grupo MIV- CRIO. D8 de cultivo embrionário: (D) Grupo Controle (E) Grupo CRIO-MIV (F) Grupo MIV-CRIO. D9 de cultivo embrionário: (G) Grupo Controle (H) Grupo CRIO-MIV (I) MIV- CRIO.

Figura 20. AT D3 de cultivo embrionário: (A) Grupo Controle (B) Grupo CRIO-MIV (C) Grupo MIV- CRIO. D8 de cultivo embrionário: (D) Grupo Controle (E) Grupo CRIO-MIV. D9 de cultivo embrionário: (F) Grupo Controle (G) Grupo CRIO-MIV blastocisto hatching (H) Grupo CRIO-MIV blastocisto eclodido (I) MIV- CRIO.

5. Discussão

Os resultados do presente estudo indicam que a vitrificação de oócitos bovinos em estadio de VG, utilizando o método Cryotop, não compromete o processo de maturação nuclear. Uma vez que os oócitos após a vitrificação e maturação *in vitro* foram capazes de progredir do estágio de VG, para os estádios de MI, AI, TI culminando com o término da primeira divisão meiótica e depois até MII. Vale ressaltar que para a progressão da meiose ocorrer corretamente, vários mecanismos estão envolvidos, os quais se mostraram inalterados após a criopreservação. Dentre eles as atividades das proteínas citoplasmáticas do complexo MPF (fator promotor da maturação), envolvidas na regulação da condensação dos cromossomos, no rompimento do envelope nuclear, na reorganização dos microtúbulos e organelas citoplasmáticas (KIM et al., 2000; KANO et al., 2000; KRISCHEK; MEINECKE, 2002; LEFEBVRE et al., 2002) e pelas proteínas da família da MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) essencial em eventos pós-rompimento da VG (KANO et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2002).

Dados semelhantes foram obtidos por Son and cols (1996) em seu estudo com oócitos humanos imaturos (VG) onde demonstraram que a criopreservação não influencia na capacidade de maturação nuclear dos oócitos imaturos, estes autores obtiveram taxa de 59.3% de maturação ao estadio de MII após congelamento e descongelamento (SON et al., 1996).

Um fator importante que possa ter contribuído para a manutenção da capacidade de maturação nuclear dos oócitos imaturos pós vitrificação é a configuração cromossômica desse oócito. Visto que, alguns autores (GALLICANO, MCGAUGHEY, CAPCO, 2004; BATTAGLIA et al., 1996; KIM et al 2010) sugerem que o estadio de VG pode ser mais resistente ao processo de criopreservação devido a presença de uma membrana nuclear que envolve e protege a cromatina e a ausência do fuso meiótico. Portanto, é importante ressaltar que além da configuração cromossômica do oócito em VG possivelmente ter contribuído para a manutenção da capacidade de maturação nuclear após a vitrificação, o método de

vitrificação por si só, ao utilizar altas concentrações de crioprotetores previne a formação de cristais de gelo, que são os responsáveis por esses efeitos deletérios a nível nuclear no oócito na criopreservação.

Considerando ser de extrema importância a aquisição, manutenção e expressão do potencial máximo do oócito para comandar as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário, o processo de maturação nuclear e citoplasmática constitui uma fase imprescindível e crítica, pois é através desta fase que o oócito consegue se tornar capacitado (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Portanto, outro fator importante é a influência da presença ou ausência das células do cumulus no oócito no momento da criopreservação, onde o sucesso da criopreservação em oócitos imaturos depende da habilidade de preservar a integridade estrutural e funcional do oócito e das células do cumulus que o envolve, porque o dano do congelamento está associado, dentre outros fatores, com a destruição da comunicação intracelular entre as células do cumulus e o oócito (HOCHI et al., 1998). Vale ressaltar que essa comunicação ocorre através das gaps junctions (GAP), e sua manutenção é necessária para que ocorra a maturação *in vitro* do oócito pelo fornecimento de nutrientes, assim como suporte durante a FIV (BUCCIONE;SCHROEDER; EPPIG, 1990; CHIAN;NIWA; SIRARD, 1994; KA et al., 1997).

Alguns autores (FABBRI et al., 1998; OTOI et al., 1998) mostram que o procedimento de desnudamento parcial dos oócitos, ou seja, remoção parcial das células do cumulus *oophorus* antes da vitrificação, facilita a passagem dos crioprotetores e também a avaliação morfológica do oócito, especialmente o citoplasma (CHUNG et al., 2000). Outros estudos afirmam que a presença dessas células pode atuar como uma barreira protetora para preservar o possível dano causado pelos CPAs, pois observaram redução no efeito tóxico do crioprotetor em oócitos de camundongos (JOHNSON,1989), humanos (FABBRI et al., 1998) e bovinos (IM et al., 1997). Entretanto, Vajta (2000) relatou que as camadas de células do

cumulus oophorus poderiam reduzir a velocidade de passagem dos crioprotetores, acarretando uma inadequada desidratação e reidratação. Além disso, é difícil realizar uniformemente a remoção parcial dessas células em um grupo de oócitos, o que pode resultar em penetração desigual do crioprotetor (VAJTA et al.,2000).

No nosso estudo, para viabilizar o protocolo de vitrificação e na tentativa de preservar a comunicação entre o oócito e as células do cumulus, os oócitos imaturos foram vitrificados parcialmente desnudos (2-3 camadas de células da granulosa). Após a desvitrificação, os oócitos foram submetidos à MIV em sistema de cocultivo com cinco COCs (complexo *cumulus oophorus*) imaturos grau I, como suporte ao processo de maturação para os oócitos desvitrificados. Contudo, não pode ser excluída a possibilidade de interrupção da comunicação intercelular parcial ou total entre as células do cumulus e o oócito durante o processo de vitrificação.

Luna and cols (2001) demonstraram que oócitos bovinos imaturos vitrificados são mais sensíveis que qualquer outro estadio nuclear, provavelmente devido a interrupção da comunicação entre o oócito e as células do cumulus (LUNA;FERRARI; RUMPF, 2001). Nesse sentido, Prentice and cols (2011) vitrificaram COCs (aproximadamente com três camadas de células ao redor do oócito) através de dois métodos diferentes de vitrificação (cryotop e palheta de 0,25ml) e obtiveram taxa menor de MIV no grupo dos oócitos vitrificados, em relação ao grupo controle (16% vs 61%, respectivamente), sendo que a melhor taxa de maturação dentre os vitrificados ocorreu no grupo cryotop (23% vs 9%). Comparado a estes resultados, neste estudo obtivemos uma taxa de 50% de MII utilizando o mesmo método de vitrificação, quase o dobro daquele descrito por Prentice. Contudo, Kim and cols (2007) demonstraram que a taxa de maturação de oócitos imaturos bovinos vitrificados foi menor em relação aos oócitos frescos, apesar de uma taxa normal de recuperação morfológica. Estes autores sugeriram que o dano causado pela vitrificação ao

oócito foi devido à destruição da comunicação entre as células do cumulus e o oócito (via gap junction) (KIM et al., 2007).

Quando analisamos a viabilidade dos oócitos em diferentes estádios de maturação nuclear (VG vs MII) pós vitrificação, notamos maior comprometimento da viabilidade oocitária em oócitos em estadio maduro (MII). Os resultados demonstram que pela técnica do DEAD-LIVE, há uma diferença de aproximadamente 30% na viabilidade entre os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO após o descongelamento (56% vs 27%, respectivamente). Contudo, não há outros estudos na literatura utilizando essa técnica com a mesma finalidade em oócitos bovinos criopreservados, apenas em tecido ovariano humano criopreservado (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; MARTINEZ-MADRID et al., 2004; YEOMAN et al., 2005; MALTARIS et al., 2006b).

A viabilidade preservada no grupo CRIO-MIV, nos mostra que a vitrificação de oócitos no estadio de VG e posterior MIV não acarreta danos ao metabolismo celular oocitário (pois estes foram capazes de metabolizar a calceína) e à integridade da membrana plasmática (inferido pela não penetração do brometo de etídio). Contudo, este fato pode ser atribuído a fatores já discutidos anteriormente, mas que são de extrema importância, como a proteção conferida pela membrana nuclear ao material genético no oócito imaturo no momento da criopreservação, a presença parcial das células do cumulus e a integridade da membrana plasmática.

Porém no grupo MIV-CRIO a viabilidade oocitária se mostrou comprometida, nos revelando pela técnica de DEAD-LIVE que a vitrificação de oócitos em MII pode ter comprometido, pelo menos parcialmente, o metabolismo oocitário e promovido a rotura da membrana plasmática. Visto que a calceína utiliza o cálcio como co-fator no processo de metabolização, a MIV seguida da vitrificação pode ter comprometido o armazenamento de cálcio no REs (LOWTHER et al., 2009), onde poderíamos justificar em parte a perda da

capacidade do oócito em MII em metabolizar a calceína, traduzida por redução da sua viabilidade.

Em relação à integridade da membrana plasmática, uma importante propriedade criobiológica que afeta a viabilidade oocitária após a vitrificação é a permeabilidade desta à água e aos CPAs, assim como o excessivo edema osmótico que pode levar a rotura e lise da membrana e conseqüente morte oocitária (KUWAYAMA et al., 2007). Jin et al (2011) mostram que a membrana plasmática de oócitos bovinos tem alta permeabilidade, o que facilita o movimento dos CPAs no congelamento e descongelamento, prevenindo em parte os danos causados pela formação de gelo intracelular, toxicidade dos CPAs e o excessivo edema osmótico.

Observamos que nos casos em que há indícios de rotura de membrana, a metabolização da calceína parece estar inversamente correlacionada à penetração de brometo na célula, sugerindo uma perda progressiva da viabilidade, em que apesar de comprometida por sua lesão de membrana a célula ainda consegue manter seu metabolismo ativo por um período; conforme o dano progride sua viabilidade se compromete progressivamente até culminar em morte celular.

Para investigar a integridade da zona pelúcida frente ao processo de vitrificação utilizamos um método investigativo não invasivo de microscopia de polarização Polscope - OCTAX Polar AIDE, que não interfere na viabilidade do oócito. Neste estudo, obtivemos visualização da zona pelúcida com birefringência positiva em 100% dos oócitos analisados, não servindo de parâmetro de diferenciação entre oócitos com integridade preservada de ZP e nem como fator preditor da preservação da competência de desenvolvimento embrionário. Estudos sugerem uma correlação entre birefringência positiva da zona pelúcida de oócitos humanos e gravidez, onde a alta birefringência da camada interna da ZP foi associada a altas taxas de concepção em comparação com oócitos que apresentavam baixa retardância da

camada interna (SHEN et al., 2005; MONTAG et al., 2008). Corroborando estes dados, porém na espécie bovina, Ebner et al (2010) afirmam que os oócitos nos quais não foi possível detectar automaticamente a birefringência da ZP, apresentaram redução do potencial embrionário, provavelmente devido a alterações na estrutura da ZP (EBNER et al., 2010).

Contrariamente, em nosso estudo apesar de verificar alta birrefringência em todos os oócitos, os resultados reprodutivos foram bastante ruins. Porém, estes dados estão em concordância com os de Koester and cols (2011) que verificaram que oócitos e zigotos bovinos apresentavam uma correlação negativa entre o desenvolvimento competente de oócito/zigoto e a birefringência positiva da ZP, ou seja, alta birrefringência da zona pelúcida em bovinos está relacionada à baixa qualidade oocitária e se relaciona negativamente com os resultados reprodutivos (KOESTER et al., 2011).

De acordo com essas interpretações da leitura de ZP pelo OCTAX Polar AIDE, outro fator que pode ter influenciado nos resultados da birefringência da ZP foi o tempo de estabilização dos oócitos após a desvitrificação nos grupos de estudo (CRIO-MIV e MIV-CRIO) e após desnudamento nos controles. Para isso, mais estudos serão necessários sobre as propriedades da zona pelúcida, como a agregação de técnicas de imunohistoquímica ou de biologia molecular de avaliações específicas de zona para que possamos realmente concluir pela presença ou ausência de dano sobre a zona pelúcida durante os processos de vitrificação e desvitrificação de oócitos. Acreditamos que nosso resultado em relação à avaliação de zona pelúcida realizada através desta técnica não seja, em bovinos, eficiente para identificar alterações menores na zona.

A alternativa para se avaliar a viabilidade dos oócitos que foram submetidos ao processo de vitrificação, extrapolando o comprometimento (enrijecimento) da ZP e da membrana oocitária, seria a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), onde são eliminados nesse caso, o processo de ligação do espermatozóide à zona pelúcida e a

penetração posterior da zona pelúcida e da membrana citoplasmática (KRZYSZOWSKA et al., 2002). Em humanos a ICSI é clinicamente bem estabelecida, empregada e indicada para superar diversos tipos de infertilidade masculina (PALERMO et al., 1995; POPE et al., 1998), com oócitos frescos e vitrificados, com resultados satisfatórios com formação de blastocistos e altas taxas de gestação (KUWAYAMA et al., 2005). Porém, a eficiência da ICSI em bovinos é muito limitada (EMUTA; HORIUCHI, 2001) e ainda não é bem estabelecida devido à necessidade de ativações adicionais do oócito antes ou após o procedimento de ICSI (SUTTNER et al., 2000).

Embora os oócitos vitrificados imaturos tenham completado normalmente a maturação meiótica e a viabilidade destes se mostrou melhor preservada em relação aos oócitos em MII, o desenvolvimento embrionário dos oócitos criopreservados, independente do estadio meiótico foi totalmente comprometido, não havendo formação de blastocistos nos grupos CRIO-MIV ou MIV-CRIO por nenhuma das técnicas de ativação oocitárias.

Várias pesquisas são realizadas no intuito de identificar as possíveis causas e apontar o dano específico sofrido por esses oócitos criopreservados devido ao baixo desenvolvimento embrionário. Portanto, neste estudo não conseguimos afirmar o dano específico, porém sabemos que várias estruturas e/ou funções podem ter sido comprometidas, de acordo com dados da literatura. De uma maneira geral, independente do estadio meiótico, os oócitos podem ter sofrido inadequada maturação citoplasmática e nuclear, despolimerização do fuso meiótico (oócitos em MII) associado com desorganização dos microfilamentos e cromossomos (AMAN; PARKS, 1994; ROJAS et al., 2004; SUCCU et al., 2007); exocitose prematura dos grânulos corticais, levando ao enrijecimento da ZP, prejudicando a FIV (FUKU; XIA; DOWNEY, 1995; HYTTEL; VAJTA; CALLESEN, 2000; MAVRIDES; MORROLL, 2005); fraturas na membrana plasmática (ARAV et al., 1996); suporte

inadequado das células do cumulus na MIV e FIV (IMOEDENMHE, SIGUE, 1992; CHIAN; NIWA; SIRARD, 1994).

Considerando que o processo de maturação é uma fase que inclui os eventos necessários que permitem ao oócito adquirir a capacidade para prosseguir no desenvolvimento embrionário, qualquer influência negativa da vitrificação nesse processo é de extrema relevância. Portanto, se ocorrer inadequada maturação citoplasmática, processos como síntese de proteínas (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), migração e reorganização de organelas (STOJKOVIC et al., 2001) serão prejudicados. Sabe-se que há uma intensa correlação entre o potencial de desenvolvimento dos oócitos e embriões com a função mitocondrial e conseqüentemente o índice de ATP (STOJKOVIC et al., 2001). Portanto, a inabilidade das mitocôndrias de aumentar e/ou acumular ATP está relacionada ao desenvolvimento anormal ou ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (STEUERWALD et al., 2000), onde os blastômeros embrionários necessitam receber uma quantidade suficiente de mitocôndrias para produção de ATP, caso contrário podem tornar-se disfuncionais e fragmentados (CUMMINS, 2004). Além do que, há estudos correlacionando a influência da criopreservação na redução do potencial de membrana mitocondrial com a competência do oócito no desenvolvimento embrionário (VAN BLERKOM et al., 2002; TARAZONA et al., 2006;).

Manipalviratn and cols (2011) demonstraram que a vitrificação em oócitos bovinos reduz significativamente o teor de ATP, enquanto ZHAO and cols (2011) mostram que a vitrificação altera a função mitocondrial (o potencial de membrana mitocondrial) e provoca o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, eles propõem uma alternativa a fim de proteger a função mitocondrial em oócitos vitrificados, no qual consiste em um pré tratamento desses oócitos com ciclosporina (inibidor específico da permeabilidade mitocondrial) para aumentar o potencial de desenvolvimento *in vitro* desses oócitos

(MANIPALVIRATN et al.,2011; ZHAO et al.,2011). Há relatos de que o potencial de membrana mitocondrial em oócitos imaturos é menor do que o observado em oócitos maduros (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Contudo, a interferência na concentração e/ou atividade mitocondrial também pode constituir um dos mecanismos de injúria produzido pela criopreservação.

Para assegurar uma ideal maturação citoplasmática e o desenvolvimento inicial embrionário, o estoque de transcritos e proteínas no citoplasma oocitário é de extrema importância (MEIRELLES et al.,2004). Assim, de acordo com os nossos resultados de clivagem, as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário não foi comprometida pela vitrificação, por mais que avaliações específicas não tenham sido realizadas.

Por outro lado, nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário (oito células em bovino), ocorre a transição materno zigótica (MZT) que é a ativação do genoma embrionário e síntese de novas proteínas, onde o embrião passa a comandar o desenvolvimento embrionário subsequente (MEIRELLES et al.,2004). Portanto, podemos inferir que possa ter ocorrido interferência na MZT pela criopreservação, no qual não obtivemos blastocistos provenientes de oócitos criopreservado.

Por mais que a vitrificação não tenha comprometido a maturação nuclear dos oócitos em VG alguns estudos demonstram que a exposição do oócito imaturo aos crioprotetores interfere na configuração dos cromossomos, além da distribuição dos microfilamentos depois da MIV, afetando assim de forma considerável o desenvolvimento embrionário (AMAN; PARKS, 1994;MCWILLIAMS;GIBBONS; LEIBO, 1995; ROJAS et al., 2004). Já o oócito em estadio de MII por apresentar cromossomos distribuídos pela placa metafásica e fuso meiótico no qual são alvos dos efeitos deletérios do processo de criopreservação, são aptos a anomalia meiótica e conseqüente baixo desenvolvimento embrionário (BRUNET et al., 2003).

A baixa taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário encontrados neste estudo pode ser atribuído ao comprometimento da FIV, devido ao bloqueio à penetração dos espermatozóides na ZP (clivagem menor que 30% nos grupos vitrificados), baseado no fato de que a criopreservação pode causar exocitose prematura dos grânulos corticais e conseqüente enrijecimento da ZP dos oócitos. Porém, na tentativa de transpor a influência da capacidade de fertilização dos espermatozóides, a ativação partenogenética foi realizada. Mesmo assim verificamos que mesmo procedendo à ativação partenogenética dos oócitos vitrificados, seja do grupo CRIO-MIV seja do grupo MIV-CRIO, não houve melhora nas taxas de clivagem e formação embrionária em relação aos oócitos FIV, indicando que mesmo que ocorra comprometimento da zona pelúcida existe também outro comprometimento que ultrapassa esta estrutura e compromete a capacidade reprodutiva do oócito com grande impacto. Portanto, características individuais do oócito, como espessura da ZP e criotolerância, podem ter sido responsáveis pela clivagem de poucos oócitos submetidos à FIV e AT. Uma alternativa a esse enrijecimento da ZP, como já comentado, seria a ICSI.

Na MIV e no CIV embrionário, as células do cumulus são importantes, por oferecer suporte nutricional e importantes trocas bioquímicas com o oócito. De acordo com nossos resultados, os oócitos vitrificados em MII com ausência das células do cumulus e em VG com células do cumulus parcial apresentaram baixa taxa de clivagem e total comprometimento da competência de desenvolvimento. Corroborando nossos dados, Zhou and cols (2010) em estudos preliminares reportam que a taxa de clivagem de oócitos bovino desnudos (VG e MII) foi baixa e não houve desenvolvimento embrionário a blastocisto quando comparados ao grupo de oócitos envoltos com células do cumulus, estes mesmos autores verificaram que as taxas de sobrevivência, clivagem e formação de blastocistos nos oócitos imaturos (VG) vitrificados com presença total das células do cumulus foram significativamente mais altas do que naqueles vitrificados com cumulus parcial; no entanto no grupo de oócitos em MII,

nenhuma diferença foi encontrada. Além disso, oócitos em VG vitrificados com cumulus total exibiram maior competência de desenvolvimento do que os oócitos em MII (ZHOU et al.,2010).

Martins and cols (2005) chamam a atenção para o baixo desenvolvimento embrionário e relatam que as taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados em estadio imaturo são consideradas insatisfatórias, por serem menores que 10% (MARTINS et al., 2005). Portanto, diversos trabalhos relatam que a taxa de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados em diferentes estádios de maturação é extremamente baixa em relação a oócitos não criopreservados, o que vem de encontro com nossos dados, como Galbinski e cols (2003) que obtiveram ausência de fertilização e desenvolvimento embrionário dos oócitos vitrificados com DMSO 6M em palhetas de 0,25mL. Demonstraram assim, que a técnica de vitrificação em oócitos maturados *in vitro* por 18-22 horas (MII), possui efeito deletério sobre a capacidade fertilizadora dos oócitos (GALBINSKI; BOS-MIKICH; FERRARI;2003).

Kim and cols (2007) encontraram taxa de clivagem e formação de blastocistos inferiores no grupo de oócitos vitrificados pelo método Microdrop (55,7% e 2,3%) em comparação ao grupo controle (84,4% e 34,7%) (KIM et al.,2007). Vahida and cols (2009) obtiveram taxas menores de clivagem (39,1% vs 58,5%) e formação de blastocistos (5,1% vs 22,9%) no grupo de oócitos submetidos à MIV e posteriormente vitrificados pelo método nylon mesh (VAHIDA et al.,2009). Prentice and cols (2011) obtiveram menores taxas de clivagem (93% vs 42%) e formação de blastocisto no grupo de oócitos vitrificados pelo métodos cryotop (42% e 0.4%) em comparação ao grupo de oócitos não-vitrificados (93% e 31%) (PRENTICE et al.,2011). Sendo assim, sugere-se que independente do protocolo e do sistema de armazenamento adotado, o processo de vitrificação prejudica e muito a qualidade do oócito.

Em contrapartida, Men and cols (2002) encontraram similar taxa de clivagem entre oócitos imaturos (GVBD) e maduros (MII) vitrificados pelo método OPS (53,56% e 58,01%, respectivamente) e maior proporção de formação de blastocistos (D8) no grupo MII (8,37%); em relação ao GVBD (1,06%). Assim, oócitos em diferentes estádios de maturação reagiram de forma diferente à criopreservação, onde os oócitos em MII apresentaram maior competência de desenvolvimento em relação aqueles vitrificados em GVBD (MEN;MONSON; RUTLEDGE, 2002).

Contudo, não há esclarecimento sobre a principal estrutura ou função prejudicada e responsável pelo baixo desenvolvimento embrionário de oócitos criopreservados. Mas, as estruturas e/ou funções podem ser danificadas total ou parcialmente, sendo que a criotolerância de cada oócito é o que determina esse fato, possivelmente influenciada pelo ambiente *in vitro* (como a MIV). Sendo assim, ainda não há consenso sobre o melhor estágio meiótico oocitário ou o mais resistente para criopreservar, podendo ser atribuído aos diversos protocolos e adaptações, realizados por diferentes grupos de pesquisa. Embora avanços consistentes na criopreservação de oócitos humanos em estágio de MII (maturados *in vivo*) tenham ocorrido na última década (COBO et al.,2008;CHIAN et al.,2009b), a associação entre a MIV e criopreservação de oócitos, independente da espécie estudada, ainda não constitui uma ferramenta passível de aplicação na prática clínica na RA humana e estudos subsequentes serão necessários para investigar as alterações decorrentes da associação dos dois procedimentos (MIV e criopreservação) e propor novas estratégias para otimizar os protocolos atualmente disponíveis para fins de preservação de fertilidade.

6. Conclusão

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- O procedimento de vitrificação de oócitos bovinos com o método Cryotop promove grande prejuízo à competência reprodutiva do oócito, independente do estadio de maturação nuclear (VG ou MII), e o dano parece estar relacionado tanto a estruturas externas (baixa taxa de clivagem) quanto internas, uma vez que a ativação partenogenética não melhorou o desenvolvimento embrionário.
- A vitrificação não influencia a capacidade de maturação nuclear do oócito e nem a viabilidade quando realizada em estadio imaturo (VG), mas compromete a viabilidade dos oócitos maduros (MII).
- A avaliação da integridade da zona pelúcida pela técnica de microscopia de polarização (OCTAX polarAIDE) não se mostrou eficaz na identificação de alterações na zona pelúcida de oócitos bovinos vitrificados.
- Não foi possível, através deste estudo, apontar qual o melhor estadio meiótico para vitrificar oócitos bovinos.

Mais estudos, que possibilitem a identificação das estruturas lesadas pelo procedimento de vitrificação permitirão adaptações mais específicas nos protocolos de congelamento para melhorar os resultados reprodutivos obtidos com estes oócitos.

7. Referências Bibliográficas

ADONA P.R., et al. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Anim Reprod Sci**, v.108, p.49-56, 2008.

ALLAN, J. Re: Case report: Pregnancy from intracytoplasmic injection of a frozen-thawed oocyte. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v.44, n.6, Dec, p.588. 2004.

AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.50, n.1, Jan, p.103-10. 1994.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta: American Cancer Society; 2011.

ANTINORI, M. et al. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reprod Biomed Online**, v.14, n.1, Jan, p.72-9. 2007.

ASIMAKOPOULOS, B. KOTANIDIS, L. NIKOLETTOS, N. 2011. In vitro maturation and fertilization of vitrified immature human oocytes, subsequent vitrification of produced embryos, and embryo transfer after thawing. **Fertil Steril**. 2011 May; v 95, n.6, p.2123..2011.

ARAV, A. et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, Dec, p.589-99. 1996.

BATTAGLIA D.E., et al. Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte. **Mol Hum Reprod** v.2; p.845–51. 1996.

BERNARD, A. et al. Fertilization and embryonic development of human oocytes after cooling. **Hum Reprod**, v.7, n.10, Nov, p.1447-50. 1992.

BEATTY, R.A. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. Cambridge. Cambridge University Press, 1957.

BIELANSKI, A. et al. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40, n.2, Mar, p.110-6. 2000.

BINES, J.; OLESKE, D.M.; COBLEIGH, M.A. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. **J Clin Oncol**, v.14, n.5, May, p.1718-29. 1996.

BIRNEY, E. et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**, v.447, n.7146, Jun 14, p.799-816. 2007.

BLUMENFELD, Z. et al. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. **Lupus**, v.9, n.6, p.401-5. 2000.

BORINI, A. et al. Clinical outcome of oocyte cryopreservation after slow cooling with a protocol utilizing a high sucrose concentration. **Hum Reprod**, v.21, n.2, Feb, p.512-7. 2006.

BREVINI, T.A. et al. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.98, n.1-2, Mar, p.23-38. 2007.

BRUNET, S. et al. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. **Reproduction**, v.126, n.4, Oct, p.443-50. 2003.

BOGLIOLO L, et al. Vitrification of immature and in vitro matured horse oocytes. **Reprod Fertil Dev**; v.18, p.149 –50.2006.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v.43, n.4, Oct, p.543-7. 1990.

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Mol Hum Reprod**, v.9, n.12, Dec, p.749-56. 2003.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **J Reprod Fertil**, v.110, n.1, May, p.11-9. 1997.

CHA, K.Y.; CHIAN, R.C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Hum Reprod Update**, v.4, n.2, Mar-Apr, p.103-20. 1998.

CHEN C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*. v.1(8486), p.884-6. 1986.

CHEN, S.U. et al. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. **Fertil Steril**, v.74, n.4, Oct, p.804-8. 2000.

CHIAN, R.C. et al. Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. **Fertil Steril**, v.91, n.2, Feb, p.372-6. 2009a.

CHIAN, R.C. et al. Obstetric outcomes following vitrification of in vitro and in vivo matured oocytes. **Fertil Steril**, v.91, n.6, Jun, p.2391-8. 2009b.

CHIAN, R.C. et al. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **J Reprod Dev**, v.50, n.6, Dec, p.685-96. 2004.

CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1499-508. 1994.

CHIAN, R.C.; TAN, S.L. Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Reprod Biomed Online**, v.5, n.2, Sep-Oct, p.125-32. 2002.

CHUNG, H.M. et al. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. **Fertil Steril**, v.73(3), p.545-51. 2000.

COBO, A. et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. **Clin Transl Oncol**, v.10, n.5, May, p.268-73. 2008.

CONTI, M. et al. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. **Mol Cell Endocrinol**, v.145, n.1-2, Oct 25, p.9-14. 1998.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.115 Suppl 1, Jul 1, p.S23-9. 2004.

CORTVRINDT RG, SMITZ JE. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human cortical biopsy samples. **Fertil Steril** 2001; 75(3): 588-93.

DAVIS, V.J. Female gamete preservation. **Cancer**, v.107, n.7 Suppl, Oct 1, p.1690-4. 2006.

DE LA FUENTE R, EPPIG JJ. Transcriptional Activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Dev Biol**, v.229, p.224-236, 2001.

DE SOUSA P.A. ,et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, p.115-128, 1998.

DINNYES, A. et al. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, v.63, n.2, Aug, p.513-8. 2000.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 285-302, 2002.

DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**, v.12, n.5, Sep-Oct, p.519-35. 2006.

EBNER, T. et al. Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. **Fertil Steril**, v.94, n.3, Aug, p.913-20. 2010.

EMUTA,C.; HORIUCHI,T. Effects of Timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by Intracitoplasmic Sperm Injection (ICSI) on cleavage and Subsequente Embryonic Development in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v.47, n.6,2001.

EPPIG J, O'BRIEN M, WIGGLEWORTH K. Mammalian oocyte growth and development *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v.44, p.260-273, 1996.

FABBRI,R.et al,Oocyte cryopreservation. **Hum Reprod**.v.13 1998.

FABBRI R, et al. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. Mar;v.16; p.411-6. 2001.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim Reprod Sci**, v.78, n.3-4, Oct 15, p.203-16. 2003.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, n.2, Apr, p.139-56. 1995.

GALBINSKI, S., BOS-MIKICH, A.; FERRARI,A.N. Viability and *in vitro* Fertilization of Bovine Oocytes after Vitrification. **RGO**, v.25,n.8,p.553-559, 2003.

GALLICANO G.I., et al.Ontogeny of the cytoskeleton during mammalian oogenesis. **Microsc Res Tech**;v. 27; p.134-44, 1994.

GASPARRINI, B. et al. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. **Anim Reprod Sci**, v.98, n.3-4, Apr, p.335-42. 2007.

GANDOLFI BTAL, GANDOLFI F. The maternal legacy to the embryo: 59 cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

GONZALEZ, C. et al. Combined strategy for fertility preservation in an oncologic patient: vitrification of in vitro matured oocytes and ovarian tissue freezing. **J Assist Reprod Genet**, Sep 2. 2011.

GOOK, D.A. et al. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. **Hum Reprod**, v.9, n.4, Apr, p.684-91. 1994.

GOTTARDI,F.P., MINGOTI,G.Z., Bovine oocyte maturation and influence on subsequent embryonic developmental competence. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, 2009

GU, Y.F. et al. A comparative analysis of the zona pellucida birefringence of fresh and frozen-thawed human embryos. **Reproduction**, v.139, n.1, Jan, p.121-7. 2010.

HOCHI, S. et al. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v.42, n.3, p.483-8. 1994.

HOCHI, S. et al. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.4, Mar, p.787-96. 1998.

HUANG, J.Y. et al. Retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: a case report on a new strategy of fertility preservation in women with borderline ovarian malignancy. **Gynecol Oncol**, v.105, n.2, May, p.542-4. 2007.

HUANG, J.Y. et al. Retrieval of immature oocytes from unstimulated ovaries followed by in vitro maturation and vitrification: A novel strategy of fertility preservation for breast cancer patients. **Am J Surg**, v.200, n.1, Jul, p.177-83. 2010.

HYTTEL P, et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. **Mol Reprod Dev**, v.56, n.1, May, p.80-8. 2000.

IM, K.S.,et al.Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**. v.47,n.4,p.881-91. 1997

IMOEDEMHE, D.G., SIGUE, A.B. Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol, **J. Assist. Reprod. Genet**. v.9;p. 323–327.1992.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2011: incidência de câncer no Brasil /Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

JOHNSON,M.H. The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethyl sulfoxide: an optimal protocol. *J In Vitro Fert Embryo Transf.*v.6(3):168-75. 1989.

KA, H.H. et al. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. **Biol Reprod**, v.57, n.6, Dec, p.1478-83. 1997.

KANO F. et al..MEK and Cdc2 kinase are sequentially required for Golgi disassembly in MDCK cells by the mitotic Xenopus extracts. **J Cell Biol.** v.17;p:357-68,2000.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.9, n.2, Aug, p.164-70. 2004.

KATAYAMA, K.P. et al. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. **Fertil Steril**, v.80, n.1, Jul, p.223-4. 2003.

KAZEM, R. et al. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Hum Reprod**, v.10, n.10, Oct, p.2650-4. 1995.

KEEFE, D. et al. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. **Hum Reprod**, v.12, n.6, Jun, p.1250-2. 1997.

KIM, D.H. et al. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. **J Reprod Dev**, v.53, n.4, Aug, p.843-51. 2007.

KIM N.H.,et al. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. **Hum Reprod**;v.13, p.2217–22. 2010.

KOESTER, M. et al. Evaluation of bovine zona pellucida characteristics in polarized light as a prognostic marker for embryonic developmental potential. **Reproduction**, v.141, n.6, Jun, p.779-87. 2011.

KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes,Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, n.2, Feb, p.292-302. 2000.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v.67, n.1, Jan 1, p.73-80. 2007.

KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, n.3, Sep, p.300-8. 2005.

KUWAYAMA M, KATO O. Successful vitrification of human oocytes. **Fertil Steril**,v.74,p.127. 2000.

KRZYSZOWSKA, M. et al. Development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): effect of gamete donors, sperm chromatin structure and activation treatment. **Czech J. Anim. Sci.**,v. 47, n.(3),p. 85–91, 2002.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertil Steril**, v.72, n.6, Dec, p.1073-1078. 1999.

LEE, S.J. et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol**, v.24, n.18, Jun 20, p.2917-31. 2006.

LEFEBVRE C, et al. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. **J Cell Biol**. v.13. p.:603-13,2002.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, v.69, n.1, Jan 1, p.37-47. 2008.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction**, v.124, n.4, Oct, p.483-9. 2002.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.J. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation. **Methods Mol Biol**, v.254, p.345-64. 2004.

LIN, Y.H.; HWANG, J.L. In vitro maturation of human oocytes. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.45, n.2, Jun, p.95-9. 2006.

LIU, Y. et al. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. **Cryo Letters**, v.29, n.4, Jul-Aug, p.315-20. 2008.

LONERGAN, P. et al. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Mol Reprod Dev**, v.57, n.2, Oct, p.204-9. 2000.

LONERGAN, P, et al. Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest *in vitro* using roscovitine or butyrolactone. **Mol Reprod Dev**, v.64, p.369-378, 2003.

LOWTHER, K.M. et al. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.81, n.1, Jul, p.147-54. 2009.

LUCENA, E. et al. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. **Fertil Steril**, v.85, n.1, Jan, p.108-11. 2006.

LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Anim Reprod Sci**, v.68, n.1-2, Oct 31, p.23-8. 2001.

MAGISTRINI, M.; SZOLLOSI, D. Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. **Eur J Cell Biol**, v.22, n.2, Oct, p.699-707. 1980.

MAGNUSSON, V. et al. Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Anim Reprod Sci**, v.106, n.3-4, Jul, p.265-73. 2008.

MALTARIS, T. et al. Comparison of two freezing protocols in an open freezing system for cryopreservation of rat ovarian tissue. **J Obstet Gynaecol Res**, v.32, n.3, Jun, p.273-9. 2006a.

MALTARIS, T. et al. Simple prediction of the survival of follicles in cryopreserved human ovarian tissue. **J Reprod Dev**, v.52, n.4, Aug, p.577-82. 2006b.

MANDELBAUM, J. Embryo and oocyte cryopreservation. **Hum Reprod**, v.15 Suppl 4, Dec, p.43-7. 2000.

MANIPALVIRAT, S. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. **Fertility and Sterility**. v. 95, n. 5, April, 2011.

MARHHOM, E.; COHEN, I. Fertility preservation options for women with malignancies. **Obstet Gynecol Surv**, v.62, n.1, Jan, p.58-72. 2007.

MARTINEZ-MADRID. B., et al. Ficoll density gradient method for recovery of isolated human ovarian primordial follicles. **Fertil Steril**. 2004; 82:1648-53.

MARTINO,A.,SONGSASEN, N.,LEIBO,SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol Reprod.** May; v.54, p.1059-69,1996.

MARTINS, R. D. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. **Anim. Reprod.**, v.2, n.2, p.128-134, 2005.

MATSUMOTO, H. et al. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v.42, n.2, Mar, p.139-44. 2001.

MAVRIDES, A.; MORROLL, D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.118, n.1, Jan 10, p.66-70. 2005.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v.55, n.4, Mar 1, p.911-22. 2001.

MCWILLIAMS, R.B.; GIBBONS, W.E.; LEIBO, S.P. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. **Hum Reprod**, v.10, n.5, May, p.1163-71. 1995.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v.36, n.3-4, Aug, p.183-8. 2001.

MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v.57, n.3, Feb, p.1095-103. 2002.

MEIRELLES F.V,et al.Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.13-20, 2004.

MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.8, n.2, Apr, p.173-83. 1971.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A. The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Braz J Med Biol Res**, v.28, n.2, Feb, p.213-7. 1995.

MINGOTI, G.Z. et al. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Zygote**,v.17, n.4, Nov, p.321-8. 2009.

MONTAG, M. et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. **Reprod Biomed Online**, v.16, n.2, Feb, p.239-44. 2008.

MOOS, J. et al. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. **Hum Reprod**, v.10, n.9, Sep, p.2467-71. 1995.

NOTRICA, J. et al. Healthy girl born after cryopreservation of gametes and ICSI in a patient with seminoma. **Reprod Biomed Online**, v.9, n.6, Dec, p.620-2. 2004.

OLDENBOURG, R. A new view on polarization microscopy. **Nature**, v.381, n.6585, Jun 27, p.811-2. 1996.

OLDENBOURG, R.; MEI, G. New polarized light microscope with precision universal compensator. **J Microsc**, v.180, n.Pt 2, Nov, p.140-7. 1995.

OTOI,T. et al. Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. **Cryobiology** v.37, p.77–85,1998.

PALERMO, G.D. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. **Fertil Steril**,v.63, n.6, Jun, p.1231-40. 1995.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.54, n.5, Sep 15, p.651-8. 2000.

PARK, Y.S. et al. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, v.64, n.1, Jul 1, p.123-34. 2005.

PARRISH, J.J. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol Reprod**, v.38, n.5, Jun, p.1171-80. 1988.

PAYNTER, S.J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Hum Reprod Update**, v.6, n.5, Sep-Oct, p.449-56. 2000.

PELLETIER, C.; KEEFE, D.L.; TRIMARCHI, J.R. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. **Fertil Steril**, v.81 Suppl 1, Mar, p.850-6. 2004.

PINCUS G, ENZMANN EV. The Comparative Behavior Of Mammalian Eggs In Vivo And In Vitro: I. The Activation Of Ovarian Eggs. *J Exp Med*. Oct 31;62(5):665-75. 1935.

POLLAK, L. et al. Low dose methylphenidate improves freezing in advanced Parkinson's disease during off-state. **J Neural Transm Suppl**, n.72, p.145-8. 2007.

POPE, C.E. et al. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.53, n.1-4, Oct, p.221-36. 1998.

PORCU, E. et al. Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. **Fertil Steril**, v.68, n.4, Oct, p.724-6. 1997.

PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. **Fertil Steril**. Oct; v. 82; n.4;p.993.2004.

PRENTICE, J.R. et al. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v.75, n.4, Mar 1, p.602-9. 2011.

RAANANI, P.; SHPILBERG, O.; BEN-BASSAT, I. Extramedullary disease and targeted therapies for hematological malignancies--is the association real? **Ann Oncol**, v.18, n.1, Jan, p.7-12. 2007.

REVEL, A.; LAUFER, N. Protecting female fertility from cancer therapy. **Mol Cell Endocrinol**, v.187, n.1-2, Feb 22, p.83-91. 2002.

RODRIGUES, A.P. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Anim Reprod Sci**, v.84, n.1-2, Aug, p.211-27. 2004a.

RODRIGUES, A.P. et al. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, n.6, Apr 15, p.1009-24. 2004b.

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reprod Fertil Dev**, v.16, n.1-2, p.55-67. 2004.

ROJAS, C. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v.49, n.3, Dec, p.211-20. 2004.

RUFFING, N.A. et al. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology**, v.30, n.6, Dec, p.562-80. 1993.

SHALOM-PAZ, E. Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo Vittrification. **Reprod Biomed Online**. Oct;v. 21(4):p.566-71.,2010.

SHEN, Y. et al. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. **Hum Reprod**, v.20, n.6, Jun, p.1596-606. 2005.

SILVA, A. C. J.S. R. Preservação de fertilidade. *Revista Brasileira de Ginecol e Obs* 2006; 28: 6.

SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. **Biol Reprod**, v.43, n.5, Nov, p.777-83. 1990.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, n.2, Jan 15, p.483-97. 1998.

SMITH, G.D. et al. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vittrification. **Fertil Steril**, v.94, n.6, Nov, p.2088-95. 2010.

SON, W.Y.,et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. **Fertil Steril**,v.66, n(6),p.995-9. 1996.

SONMEZER, M., OKTAY, K. Assisted reproduction and fertility preservation techniques in cancer patients; v.15,p.514-522. 2008.

SRIPUNYA, N. et al. A comparison of cryotop and solid surface vittrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Dev**, v.56, n.1, Feb, p.176-81. 2010.

STACHECKI, J.J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. **Biol Reprod**, v.59, n.2, Aug, p.395-400. 1998.

STEHLIK, E. et al. Vittrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. **Reprod Biomed Online**, v.11, n.1, Jul, p.53-7. 2005.

STEUERWALD, N. et al. Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.5, May, p.448-53. 2000.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v.64, n.3, Mar, p.904-9. 2001.

SUCCU S, et al . Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.1337– 44. 2007.

SUN, Q.Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. **Microsc Res Tech**, v.61, n.4, Jul 1, p.342-8. 2003.

SUN, Y. et al. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. **IEEE Trans Nanobioscience**, v.2, n.4, Dec, p.279-86. 2003.

SUN, Y.P. et al. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. **Int J Gynaecol Obstet**, v.89, n.3, Jun, p.258-62. 2005.

SUNG, D.Y. et al. Identification of an arsenic tolerant double mutant with a thiol-mediated component and increased arsenic tolerance in phyA mutants. **Plant J**, v.49, n.6, Mar, p.1064-75. 2007.

SUTTNER, R. et al. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. **Theriogenology**, v.54, n.6, Oct p.935-48. 2000.

SUZUKI, T. et al. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro. **Cryobiology**, v.33, n.5, Oct, p.515-24. 1996.

TAO, T.; DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, v.25, n.7, Jul, p.287-96. 2008.

TARAZONA, A.M. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reprod Domest Anim**, v.41, n.1, Feb, p.5-11. 2006.

TSUBAMOTO, H. et al. Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. **Protein Expr Purif**, v.17, n.1, Oct, p.8-15. 1999.

TUCKER, M.J. et al. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. **Fertil Steril**, v.70, n.3, Sep, p.578-9. 1998.

VAHIDA, M.A. Vittrification of bovine oocytes: implications of follicular size and sire on the rates of embryonic development. **J Assist Reprod Genet**.2009.

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, n.1, Sep, p.53-8. 1998.

VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim Reprod Sci**;60:357– 64. 2000.

VAN DEN HURK R, ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*.v.63,p.1717-51. 200

VAN BLERKOM, J. et al. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. **Hum Reprod**, v.17, n.2, Feb, p.393-406. 2002.

VEECK L,et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. **Fertil Steril** v.39,p.594–602.1983,

WASSARMAN, P. et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. **J Exp Zool**, v.285, n.3, Oct 15, p.251-8. 1999.

WU, B. et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Mol Reprod Dev**, v.45, n.4, Dec, p.560-5. 1996.

YANG D, et al. Live birth after the transfer of human embryos developed from cryopreserved oocytes harvested before cancer treatment. **Fertil Steril**. 2007 Jun;v. 87; p.1469.2007.

YEOMAN RR, WOLF DP, LEE DM. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freenzng. *Fertil steril* 2005; 83 S1: 1248-54.

YOUNG, E. et al. Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report. **Fertil Steril**, v.70, n.2, Aug, p.360-1. 1998.

ZHAO,X. M. et al Effect of cyclosporine pretreatment on mitochondrial function in vitrified bovine mature oocytes. **Fertility and Sterility** v. 95, n.8, June 30, 2011.

ZHOU, X.L. et al. Ovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology** v.6.p.1 66–7, 2010.

“A vitrificação de oócitos bovinos prejudica sua capacidade reprodutiva, independente do estadio de maturação”

Vitrification of bovine oocytes impairs their reproductive capacity independently of maturation stage. .

Daiane Lopes Bulgarelli ¹; Alessandra Aparecida Vireque, PhD¹; Marcelo Picinin Bernuci ¹PhD; Caroline Palmier Pitangui¹, Maria Cristina Picinato¹, Marcos Felipe Silva-de-Sá ²MD PhD, Ana Carolina Japur de Sá Rosa-e-Silva MD PhD³

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo – USP 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

¹ Pós-graduando(a) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

². Professor Titular do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

³ Professor Doutor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

*Correspondência: daialbulga@gmail.com

RESUMO

Até o momento a literatura não determinou qual o melhor estadio de maturação (imaturo ou maduro) para que o oócito mantenha sua competência para o desenvolvimento reprodutivo após a criopreservação. O objetivo deste estudo foi determinar em qual estadio meiótico (imaturo -VG (vesícula germinativa) ou maduro- MII (metáfase II)) o oócito é menos susceptível ao dano na criopreservação, utilizando modelo experimental bovino. Foram utilizados ovários de vacas abatidas em matadouro, após a aspiração dos folículos, os oócitos imaturos (VG) foram selecionados para a maturação *in vitro* e vitrificação, e foram divididos em três grupos: 1) oócitos maturados *in vitro* e não submetidos à vitrificação (CONTROLE); 2) oócitos vitrificados imaturos (VG), descongelados e submetidos à maturação *in vitro* (CRIO-MIV); 3) oócitos maturados *in vitro* (MII), vitrificados e descongelados (MIV-CRIO). Os oócitos foram avaliados quanto a: a) maturação nuclear pela técnica de orceína acética; b) integridade da zona pelúcida (ZP) através de microscopia de polarização; c) viabilidade oocitária pela técnica de DEAD-LIVE; d) desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem, produção e eclosão de blastocistos) através da fertilização *in vitro* (FIV) e ativação partenogenética (AT). Não houve diferença na capacidade de maturação nuclear entre os oócitos frescos e descongelados no grupo CRIO-MIV ($p=0,23$). Em relação à zona pelúcida a totalidade dos oócitos (100%) nos três grupos apresentou leitura de zona pelúcida positiva, não havendo correlação com evolução embrionária posterior. Na análise de viabilidade celular pelo DEAD-LIVE verificou-se que houve redução da viabilidade do grupo MIV-CRIO (27%) quando comparado com controle (84%) ($p<0,0001$). Na análise do potencial de desenvolvimento embrionário o grupo controle apresentou melhores taxas de clivagem após FIV (80%) e AT (58%), do que os grupos CRIO-MIV (28%; $p<0,0001$; 28%; $p=0,0002$, respectivamente) e MIV-CRIO (26%; $p<0,0001$; 22%, $p<0,0001$, respectivamente). As taxas de formação de blastocisto e eclosão após FIV nos grupos CRIO-MIV, MIV-CRIO e após AT no grupo MIV-CRIO foram nulas. Houve a produção e eclosão de apenas um blastocisto no grupo CRIO-MIV após AT. No modelo experimental utilizado, o procedimento de vitrificação comprometeu parcialmente a viabilidade dos oócitos medida pela técnica de DEAD- LIVE e completamente o desenvolvimento embrionário subsequente, independente do estadio de maturação meiótica (VG ou MII) durante a criopreservação. No entanto, oócitos vitrificados em estadio de VG e submetidos à MIV foram meioticamente competentes e progrediram até o estadio de MII, sugerindo que o dano não compromete a capacidade de maturação nuclear do oócito. Este estudo não conseguiu determinar qual o melhor estadio meiótico oocitário para criopreservação, já que os dois estadios meióticos (VG e MII) se mostraram igualmente prejudicados pela criopreservação em relação à capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: vitrificação; oócito bovino; maturação *in vitro*; maturação nuclear; zona pelúcida; viabilidade; desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

Until the present literature has not achieved a consensus regarding the best maturation stage for oocyte to maintain their reproductive capacity after cryopreservation. The aim of this study was to determine, using an experimental bovine model, in which stage of development (VG stage, immature, or MII stage, post-maturation *in vitro*) the oocyte is less susceptible to damage during cryopreservation. Immature oocytes (VG) from the ovaries of slaughtered cows were selected for *in vitro* maturation or vitrification and divided into three groups. The first group (CONTROL) consisted of immature oocytes, matured *in vitro* without vitrification; the second group (CRYO-IVM) consisted of vitrified immature oocytes thawed and submitted to *in vitro* maturation; and the third group (IVM-CRYO) consisted of matured *in vitro* oocytes submitted to vitrification and thawing. The oocytes were evaluated for: nuclear maturation by acetic orcein staining; integrity of the zona pellucida using a polarized microscope; cell viability by the Dead-Live technique; and embryo development (cleavage, production and hatching rate) by *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation. There was no difference in capacity of nuclear maturation between fresh and thawed oocytes ($p=0.23$). Regarding the zona pellucida (ZP), all oocytes (100%) of all three groups (control, CRYO-IVM and IVM-CRYO) presented a positive ZP reading, with no correlation with later embryo evolution. DEAD-LIVE analysis of cell viability revealed reduction of viability in the IVM-CRYO group (27%) compared to control (84%) ($p<0.0001$) and to the CRYO-IVM group (56%) ($p=0.017$), with no difference between the last two groups ($p=0.055$). Analysis of the potential for embryo development by means of *in vitro* fertilization showed that the control group presented better cleavage and blastocyst formation rates than the CRYO-IVM ($p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) and the IVM-CRYO ($p<0.0001$ and $p=0.0004$, respectively) groups. Analyzing the potential for embryo development the control group presented better cleavage by means of *in vitro* fertilization (80%) and parthenogenetic activation (58%) than the CRYO-IVM (28%; $p<0,0001$; 28%; $p=0,0002$, respectively) and the IVM-CRYO groups (26%; $p<0,0001$; 22%, $p<0,0001$, respectively) Analysis of blastocyst formation rates and hatching after FIV and AT in CRYO-IVM and IVM-CRYO groups were null. Vitrification of bovine oocytes causes great impairment of their reproductive capacity regardless of the stage of maturation at the time of freezing. However the vitrified immature oocytes submitted to IVM maintained their capacity of nuclear maturation, as they achieved MII stage. This study was not able to determine which stage was better in reducing crio damage, as both stages (VG and MII) presented equally impaired by the process.

Key-words: vitrification; bovine oocyte; *in vitro* maturation; nuclear maturation; zona pellucida; viability; embryonic development.

1.INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas atingem uma grande proporção de mulheres em idade reprodutiva (GONZALEZ et al., 2011) e o tratamento consiste em terapias que são gonadotóxicas e dependendo da idade da paciente e da intensidade do tratamento administrado, pode levar a falência ovariana prematura (BINES; OLESKE; COBLEIGH, 1996; BLUMENFELD et al., 2000). Dentre as estratégias atualmente propostas para fins de preservar a fertilidade dessas pacientes está a criopreservação de oócitos imaturos, maduros e de tecido ovariano (LEE et al., 2006). Havendo a necessidade de hiperestimulação controlada para criopreservação de oócitos, recentemente alguns autores propuseram a punção dos oócitos ainda imaturos e aplicação de técnicas de maturação *in vitro*. (SUNG et al., 2003) associados à criopreservação destes gametas, com intuito de minimizar o tempo de indução e reduzir os custos da COH e a exposição aos altos níveis estrogênicos (CHA; CHIAN, 1998; DONNEZ et al., 2006; LIN; HWANG, 2006; REVEL; LAUFER, 2002; TUCKER et al., 1998).

O estadio meiótico no qual o oócito se encontra no momento da criopreservação, seja, ele imaturo em estadio de vesícula germinativa (bloqueado em prófase da primeira divisão meiótica) ou em estadio maduro (metáfase II) pode sofrer danos devido ao processo de criopreservação, como desorganização e rompimento do fuso meiótico, enrijecimento da zona pelúcida, desestabilização no citoesqueleto celular e rupturas na membrana celular, onde todos esses danos interferem na competência oocitária, sobrevivência e subsequente desenvolvimento embrionário (HOCHI et al., 1998; LUNA; FERRARI; RUMPF, 2001; MEN; MONSON; RUTLEDGE, 2002). Já os oócitos maduros estão bloqueados na metáfase da segunda divisão meiótica (MII) com 23 cromossomos ligados na região equatorial do fuso meiótico. Durante o congelamento celular, cristais de gelo formados podem romper e despolarizar estes fusos, levando a anormalidade cromossômica, como aneuploidias. Pode causar exocitose prematura dos grânulos corticais e conseqüente enrijecimento da zona pelúcida (GOOK et al., 1994; REVEL; LAUFER, 2002).

Em bovinos, Hochi e cols (1998) concluíram que o melhor estadio oocitário para vitrificar são oócitos maturados por 12 horas e que os oócitos em MII são mais tolerantes ao processo de criopreservação (MEN, MONSON; RUTLEDGE, 2002). Neste mesmo sentido, Luna e cols (2001) relataram que as maiores taxas de blastocistos bovinos são obtidas de oócitos criopreservados no estadio de MII. Em contrapartida os oócitos no estadio imaturo de VG, não apresentam risco de enrijecimento da zona pelúcida, dano ao citoesqueleto e altas

taxas de anormalidades cromossômicas (TAO, 2008). Isso se deve a ausência do fuso meiótico e a presença de uma membrana nuclear que protege a cromatina, garantindo assim a ausência de anormalidades cromossômicas durante as divisões celulares e maior taxa de sobrevivência ao processo de criopreservação e maturação *in vitro* (CHA; CHIAN, 1998; TUCKER et al., 1998; DONNEZ et al, 2006; KIM, 2007). Porém, os oócitos imaturos são mais sensíveis ao processo de criopreservação devido à baixa estabilidade da membrana e a formação do citoesqueleto celular. Esta sensibilidade também é atribuída ao dano ou interrupção das projeções das células do cumulus, o qual controla a comunicação intercelular entre as células do cumulus e o oócito durante a maturação (MAGNUSSON et al., 2008; TAO, 2008). Relatos revelam que a maturação, fertilização e desenvolvimento foram significativamente comprometidos quando oócitos humanos foram criopreservados em estágio imaturo (SON et al., 1996; PARK et al., 1997). Apesar disso, Donnez and cols (2006) relataram um nascimento proveniente de oócito imaturo (VG) criopreservado com subsequente MIV (DONNEZ et al, 2006). Chian et al (2009), descrevem taxas de nascimento de 20% a partir de oócitos coletados imaturos, vitrificados e maturados *in vitro*, portanto em comparação à taxa de nascimento de oócitos coletados de ciclo estimulado e vitrificados são menores (39.5%).

Sendo assim, a criopreservação de oócitos se depara com um novo questionamento em relação à realização deste procedimento: “a realização da MIV prévia à criopreservação apresenta melhores resultados do que a criopreservação dos oócitos ainda imaturos seguidos de MIV somente após o descongelamento?” A literatura ainda não é conclusiva em relação à associação destes procedimentos. Se de fato os resultados forem similares o congelamento de oócitos ainda imaturos facilita a operacionalização clínica no manejo destas pacientes, além de reduzir custos visto que somente oócitos que sobreviverem ao processo de congelamento-descongelamento serão expostos à MIV.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra e Desenho do estudo:

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em abatedouro local, com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CETEA). O desenho do estudo ocorreu conforme fluxograma (Figura 1).

2.1.2. Coleta de ovários

Imediatamente após o abate e evisceração, os ovários foram removidos e transportados ao laboratório em solução fisiológica a 35-37 °C e depois foram lavados e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração dos folículos ovarianos. Foram selecionados folículos apresentando entre dois e oito mm de diâmetro, boa vascularização e coloração do fluido folicular. Foram selecionados sob estereomicroscópio COCs com citoplasma uniforme, células do cumulus compactas e uniformes (Grau I e II) e sem vacúolos. Esses COCs selecionados foram transferidos para uma nova placa de Petri contendo meio TALP-HEPES.

2.2 Métodos

2.2.1. Maturação *in vitro* dos oócitos

Os COCS selecionados foram maturados *in vitro* em meio de maturação padrão TCM-199 (Tissue Culture Medium) com sais Earle, HEPES e L-glutamina (Invitrogen, Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY), suplementado com 0,2 mM de piruvato, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 0,5 µg/ml de FSH, 5,0 µg/ml de LH e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB); em microgotas de 70 µl, na densidade de 20 COCs/ microgota, em placas de Petri 35mm, cobertas com óleo mineral (SIGMA) a 38,5 °C, 95% de umidade, 5% de CO₂ em ar. Os oócitos permaneceram por um período de 20 ou 24 horas em meio de maturação *in vitro* (dependendo da técnica posterior a ser empregada).

2.2.2 Avaliação da Maturação Nuclear

Os oócitos foram primeiramente desnudados (remoção das células do *cumulus oophorus*) com solução de hyaluronidase (SIGMA) 0,03% em TCM-HEPES com auxílio de um micropipetador. Posteriormente, os oócitos foram lavados e transferidos para uma lâmina de vidro, que foram deixadas em metanol/ácido acético por 24 horas. Depois, as lâminas foram coradas com aceto-orceína e assim os oócitos foram avaliados em relação ao estágio de maturação nuclear meiótico.

2.2.3 Vitrificação

Para a técnica de criopreservação foram selecionados oócitos com ausência de pigmentações e retração citoplasmática, ausência de vacúolos e com zona pelúcida intacta. Oócitos foram vitrificados e desvitrificados de acordo com a metodologia do kit comercial de vitrificação e desvitrificação Cryotop Vittrification (marca Cryotech). Foram vitrificados em meio básico M-199 e HEPES suplementado com Soro Sintético Substituto (SSS) com etilenoglicol (EG), sacarose e dimetilsulfóxido (DMSO). Para a desvitrificação, foi utilizado meio básico M-199 com HEPES (suplementado com SSS) e sacarose. Após o procedimento de desvitrificação os oócitos foram deixados em repouso por 2 horas para estabilização em meio livre de gonadotrofinas, em estufa de cultivo a 38,5° C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade.

2.2.4 Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos oócitos após maturação *in vitro* e vitrificação foi estimada pela técnica Dead-Live, que permite diferenciar células vivas e mortas, marcadas respectivamente, pela calceína e pelo homodímero de etídio, visualizadas ao microscópio de fluorescência. Realizamos a análise qualitativa das imagens obtidas por microscopia de fluorescência, considerando-se apenas a presença ou ausência da mesma.

2.2.5. Fertilização *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* utilizou-se sêmen bovino de um touro da raça Nelore (CRV-Lagoa da Serra) congelado em palhetas de 0,25ml, onde estas foram descongeladas em banho-maria a 35 °C por 30 segundos. A seleção e capacitação dos espermatozóides foram realizadas através da migração ascendente (*swim up*), em meio SPTL TALP- HEPES acrescido de 6mg/ml de BSA fração V (SIGMA). Os oócitos selecionados foram incubados com os espermatozóides capacitados na concentração de 2×10^6 espermatozóides/mL, em placa de cultivo com gotas de 50µl de meio de fecundação FERT TALP com 6mg/mL de BSA livre de ácido graxos, 10mg/ml de heparina. Em seguida, foram incubados por 18 horas em estufa de cultivo com ar atmosférico e com saturação de umidade a 38,5° C. Foram transferidos para placa de cultivo com meio CR2aa suplementado com 5% SFB e 1mg/ml de BSA, sob óleo mineral. Os zigotos foram cultivados e avaliados durante nove dias, em estufa de cultivo celular com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

2.2.6 Ativação Partenogenética

Após 24 horas de maturação *in vitro*, os oócitos foram incubados com hyaluronidase 0,03% em TCM-199 por 5 min e depois foram desnudados com auxílio de um micropipetador. Os oócitos foram ativados com meio TCM-199 com 25mM de HEPES suplementado com 0,5 mg/mL de BSA e 5µm de ionomicina (Sigma, St Louis, USA) por 5 minutos. Após a incubação os oócitos foram lavados em H-199 saturado com 30mg/ml de BSA, seguido de cultivo em meio CR2aa suplementado com 1mg/mL de BSA, 2% SFB e 2nm de 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) por 3 horas. Após o procedimento de ativação, os oócitos foram lavados e cultivados *in vitro* em gotas de 50µl de meio CR2aa (livre de 6-DMAP) com monocamada de células, sob óleo mineral a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂.

2.2.7 Avaliação do Cultivo embrionário

Todos os cultivos embrionários (FIV e AT) foram acompanhados e avaliados, onde no terceiro dia de CIV foi avaliada a clivagem, no oitavo dia a produção de blastocistos e no nono dia a eclosão dos blastocistos.

2.3 Análise estatística

A análise das variáveis foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Na análise das variáveis foram utilizadas tabelas de contingência, aplicando-se os testes Qui-quadrado e Exato de Fischer. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A avaliação da maturação nuclear no grupo CRIO-MIV foi realizada após 24 horas de maturação *in vitro* dos oócitos que foram vitrificados e desvitrificados em estadio de vesícula germinativa, ou seja, imaturos. No grupo controle obteve-se uma taxa de 67% de maturação ($n = 29/43$) e no grupo CRIO-MIV 50% ($n = 12/24$), verificamos que não houve diferença entre os grupos ($p = 0,23$) (Figura 2).

Para a avaliação da viabilidade oocitária, para cada grupo experimental foi realizado um controle para leitura comparativa das amostras e ao compararmos a taxa de viabilidade entre os grupos controle entre si verificamos que não houve diferença (Ctr CRIO-MIV vs Ctr

MIV-CRIO; $p=0,58$). No grupo CRIO-MIV, encontramos uma taxa de 56% de viabilidade oocitária e no grupo controle taxa de 77%, portanto, não houve diferença entre eles ($p=0,055$). Entretanto, entre os grupos MIV-CRIO e controle, verificamos que houve redução da viabilidade dos oócitos maduros após a vitrificação ($p<0,0001$), com taxas de 27% e 84% de viabilidade oocitária, respectivamente. Em relação a comparação entre os grupos MIV-CRIO e CRIO-MIV houve diferença entre eles ($p=0,017$), sendo que o grupo CRIO-MIV apresentou melhores taxas de viabilidade pós criopreservação (Figura 3).

Na análise do potencial de desenvolvimento embrionário através da fertilização *in vitro*, observamos que o grupo controle apresentou melhores taxas de clivagem e de produção de blastocistos do que os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO, não havendo diferença entre estes últimos. O mesmo ocorreu quando a capacidade reprodutiva do oócito foi analisada por ativação partenogenética (Tabela 1).

As taxas de eclosão de blastocistos tiveram sua avaliação prejudicada já que a não houve produção de blastocistos nos grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO após a fertilização *in vitro* e, após a ativação partenogenética apenas um blastocisto foi formado no grupo CRIO-MIV, o qual evoluiu para eclosão com sucesso (Tabela 1).

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que a vitrificação de oócitos bovinos em estadio de VG, utilizando o método Cryotop, não compromete o processo de maturação nuclear. Uma vez que os oócitos após a vitrificação e maturação *in vitro* foram capazes de progredir do estágio de VG, para os estádios de MI, AI, TI culminando com o término da primeira divisão meiótica e depois até MII. Vale ressaltar que para a progressão da meiose ocorrer corretamente, vários mecanismos estão envolvidos, os quais se mostraram inalterados após a criopreservação. Dentre eles as atividades das proteínas citoplasmáticas do complexo MPF (fator promotor da maturação), envolvidas na regulação da condensação dos cromossomos, no rompimento do envelope nuclear, na reorganização dos microtúbulos e organelas citoplasmáticas (KIM et al., 2000; KANO et al., 2000; KRISCHEK; MEINECKE, 2002; LEFEBVRE et al., 2002) e pelas proteínas da família da MAPK (proteína cinase ativada por mitógenos) essencial em eventos pós-rompimento da VG (KANO et al., 2000; LEFEBVRE et al., 2002).

Dados semelhantes foram obtidos por Son and cols (1996) em seu estudo com oócitos humanos imaturos (VG) onde demonstraram que a criopreservação não influencia na

capacidade de maturação nuclear dos oócitos imaturos, estes autores obtiveram taxa de 59.3% de maturação ao estágio de MII após congelamento e descongelamento (SON et al., 1996).

Um fator importante que possa ter contribuído para a manutenção da capacidade de maturação nuclear dos oócitos imaturos pós vitrificação é a configuração cromossômica desse oócito. Visto que, alguns autores (GALLICANO, MCGAUGHEY, CAPCO, 2004; BATTAGLIA et al., 1996; KIM et al 2010) sugerem que o estágio de VG pode ser mais resistente ao processo de criopreservação devido a presença de uma membrana nuclear que envolve e protege a cromatina e a ausência do fuso meiótico. Portanto, é importante ressaltar que além da configuração cromossômica do oócito em VG possivelmente ter contribuído para a manutenção da capacidade de maturação nuclear após a vitrificação, o método de vitrificação por si só, ao utilizar altas concentrações de crioprotetores previne a formação de cristais de gelo, que são os responsáveis por esses efeitos deletérios a nível nuclear no oócito na criopreservação.

Considerando ser de extrema importância a aquisição, manutenção e expressão do potencial máximo do oócito para comandar as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário, o processo de maturação nuclear e citoplasmática constitui uma fase imprescindível e crítica, pois é através desta fase que o oócito consegue se tornar capacitado (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Portanto, outro fator importante é a influência da presença ou ausência das células do cumulus no oócito no momento da criopreservação, onde o sucesso da criopreservação em oócitos imaturos depende da habilidade de preservar a integridade estrutural e funcional do oócito e das células do cumulus que o envolve, porque o dano do congelamento está associado, dentre outros fatores, com a destruição da comunicação intracelular entre as células do cumulus e o oócito (HOCHI et al., 1998). Vale ressaltar que essa comunicação ocorre através das gaps junctions (GAP), e sua manutenção é necessária para que ocorra a maturação *in vitro* do oócito pelo fornecimento de nutrientes, assim como suporte durante a FIV (BUCCIONE; SCHROEDER; EPPIG, 1990; CHIAN; NIWA; SIRARD, 1994; KA et al., 1997).

Alguns autores (FABBRI et al., 1998; OTOI et al., 1998) mostram que o procedimento de desnudamento parcial dos oócitos, ou seja, remoção parcial das células do cumulus *oophorus* antes da vitrificação, facilita a passagem dos crioprotetores e também a avaliação morfológica do oócito, especialmente o citoplasma (CHUNG et al., 2000). Outros estudos afirmam que a presença dessas células pode atuar como uma barreira protetora para preservar o possível dano causado pelos CPAs, pois observaram redução no efeito tóxico do crioprotetor em oócitos de camundongos (JOHNSON, 1989), humanos (FABBRI et al., 1998)

e bovinos (IM et al., 1997). Entretanto, Vajta (2000) relatou que as camadas de células do *cumulus oophorus* poderiam reduzir a velocidade de passagem dos crioprotetores, acarretando uma inadequada desidratação e reidratação. Além disso, é difícil realizar uniformemente a remoção parcial dessas células em um grupo de oócitos, o que pode resultar em penetração desigual do crioprotetor (VAJTA et al., 2000).

No nosso estudo, para viabilizar o protocolo de vitrificação e na tentativa de preservar a comunicação entre o oócito e as células do cumulus, os oócitos imaturos foram vitrificados parcialmente desnudos (2-3 camadas de células da granulosa). Após a desvitrificação, os oócitos foram submetidos à MIV em sistema de cocultivo com cinco COCs (complexo *cumulus oophorus*) imaturos grau I, como suporte ao processo de maturação para os oócitos desvitrificados. Contudo, não pode ser excluída a possibilidade de interrupção da comunicação intercelular parcial ou total entre as células do cumulus e o oócito durante o processo de vitrificação.

Luna and cols (2001) demonstraram que oócitos bovinos imaturos vitrificados são mais sensíveis que qualquer outro estadio nuclear, provavelmente devido a interrupção da comunicação entre o oócito e as células do cumulus (LUNA; FERRARI; RUMPF, 2001). Nesse sentido, Prentice and cols (2011) vitrificaram COCs (aproximadamente com três camadas de células ao redor do oócito) através de dois métodos diferentes de vitrificação (cryotop e palheta de 0,25ml) e obtiveram taxa menor de MIV no grupo dos oócitos vitrificados, em relação ao grupo controle (16% vs 61%, respectivamente), sendo que a melhor taxa de maturação dentre os vitrificados ocorreu no grupo cryotop (23% vs 9%). Comparado a estes resultados, neste estudo obtivemos uma taxa de 50% de MII utilizando o mesmo método de vitrificação, quase o dobro daquele descrito por Prentice. Contudo, Kim and cols (2007) demonstraram que a taxa de maturação de oócitos imaturos bovinos vitrificados foi menor em relação aos oócitos frescos, apesar de uma taxa normal de recuperação morfológica. Estes autores sugeriram que o dano causado pela vitrificação ao oócito foi devido à destruição da comunicação entre as células do cumulus e o oócito (via gap junction) (KIM et al., 2007).

Quando analisamos a viabilidade dos oócitos em diferentes estadios de maturação nuclear (VG vs MII) pós vitrificação, notamos maior comprometimento da viabilidade oocitária em oócitos em estadio maduro (MII). Os resultados demonstram que pela técnica do DEAD-LIVE, há uma diferença de aproximadamente 30% na viabilidade entre os grupos CRIO-MIV e MIV-CRIO após o descongelamento (56% vs 27%, respectivamente). Contudo, não há outros estudos na literatura utilizando essa técnica com a mesma finalidade em oócitos

bovinos criopreservados, apenas em tecido ovariano humano criopreservado (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; MARTINEZ-MADRID et al., 2004; YEOMAN et al., 2005; MALTARIS et al., 2006b).

A viabilidade preservada no grupo CRIO-MIV, nos mostra que a vitrificação de oócitos no estadio de VG e posterior MIV não acarreta danos ao metabolismo celular oocitário (pois estes foram capazes de metabolizar a calceína) e à integridade da membrana plasmática (inferido pela não penetração do brometo de etídio). Contudo, este fato pode ser atribuído a fatores já discutidos anteriormente, mas que são de extrema importância, como a proteção conferida pela membrana nuclear ao material genético no oócito imaturo no momento da criopreservação, a presença parcial das células do cumulus e a integridade da membrana plasmática.

Porém no grupo MIV-CRIO a viabilidade oocitária se mostrou comprometida, nos revelando pela técnica de DEAD-LIVE que a vitrificação de oócitos em MII pode ter comprometido, pelo menos parcialmente, o metabolismo oocitário e promovido a rotura da membrana plasmática. Visto que a calceína utiliza o cálcio como co-fator no processo de metabolização, a MIV seguida da vitrificação pode ter comprometido o armazenamento de cálcio no REs (LOWTHER et al., 2009), onde poderíamos justificar em parte a perda da capacidade do oócito em MII em metabolizar a calceína, traduzida por redução da sua viabilidade.

Em relação à integridade da membrana plasmática, uma importante propriedade criobiológica que afeta a viabilidade oocitária após a vitrificação é a permeabilidade desta à água e aos CPAs, assim como o excessivo edema osmótico que pode levar a rotura e lise da membrana e conseqüente morte oocitária (KUWAYAMA et al., 2007). Jin et al (2011) mostram que a membrana plasmática de oócitos bovinos tem alta permeabilidade, o que facilita o movimento dos CPAs no congelamento e descongelamento, prevenindo em parte os danos causados pela formação de gelo intracelular, toxicidade dos CPAs e o excessivo edema osmótico.

Observamos que nos casos em que há indícios de rotura de membrana, a metabolização da calceína parece estar inversamente correlacionada à penetração de brometo na célula, sugerindo uma perda progressiva da viabilidade, em que apesar de comprometida por sua lesão de membrana a célula ainda consegue manter seu metabolismo ativo por um período; conforme o dano progride sua viabilidade se compromete progressivamente até culminar em morte celular.

Para investigar a integridade da zona pelúcida frente ao processo de vitrificação utilizamos um método investigativo não invasivo de microscopia de polarização Polscope - OCTAX Polar AIDE, que não interfere na viabilidade do oócito. Neste estudo, obtivemos visualização da zona pelúcida com birefringência positiva em 100% dos oócitos analisados, não servindo de parâmetro de diferenciação entre oócitos com integridade preservada de ZP e nem como fator preditor da preservação da competência de desenvolvimento embrionário. Estudos sugerem uma correlação entre birefringência positiva da zona pelúcida de oócitos humanos e gravidez, onde a alta birefringência da camada interna da ZP foi associada a altas taxas de concepção em comparação com oócitos que apresentavam baixa retardância da camada interna (SHEN et al., 2005; MONTAG et al., 2008). Corroborando estes dados, porém na espécie bovina, Ebner et al (2010) afirmam que os oócitos nos quais não foi possível detectar automaticamente a birefringência da ZP, apresentaram redução do potencial embrionário, provavelmente devido a alterações na estrutura da ZP (EBNER et al., 2010).

Contrariamente, em nosso estudo apesar de verificar alta birefringência em todos os oócitos, os resultados reprodutivos foram bastante ruins. Porém, estes dados estão em concordância com os de Koester and cols (2011) que verificaram que oócitos e zigotos bovinos apresentavam uma correlação negativa entre o desenvolvimento competente de oócito/zigoto e a birefringência positiva da ZP, ou seja, alta birefringência da zona pelúcida em bovinos está relacionada à baixa qualidade oocitária e se relaciona negativamente com os resultados reprodutivos (KOESTER et al., 2011).

De acordo com essas interpretações da leitura de ZP pelo OCTAX Polar AIDE, outro fator que pode ter influenciado nos resultados da birefringência da ZP foi o tempo de estabilização dos oócitos após a desvitrificação nos grupos de estudo (CRIO-MIV e MIV-CRIO) e após desnudamento nos controles. Para isso, mais estudos serão necessários sobre as propriedades da zona pelúcida, como a agregação de técnicas de imunohistoquímica ou de biologia molecular de avaliações específicas de zona para que possamos realmente concluir pela presença ou ausência de dano sobre a zona pelúcida durante os processos de vitrificação e desvitrificação de oócitos. Acreditamos que nosso resultado em relação à avaliação de zona pelúcida realizada através desta técnica não seja, em bovinos, eficiente para identificar alterações menores na zona.

A alternativa para se avaliar a viabilidade dos oócitos que foram submetidos ao processo de vitrificação, extrapolando o comprometimento (enrijecimento) da ZP e da membrana oocitária, seria a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), onde são eliminados nesse caso, o processo de ligação do espermatozóide à zona pelúcida e a

penetração posterior da zona pelúcida e da membrana citoplasmática (KRZYSZOWSKA et al., 2002). Em humanos a ICSI é clinicamente bem estabelecida, empregada e indicada para superar diversos tipos de infertilidade masculina (PALERMO et al., 1995; POPE et al., 1998), com oócitos frescos e vitrificados, com resultados satisfatórios com formação de blastocistos e altas taxas de gestação (KUWAYAMA et al., 2005). Porém, a eficiência da ICSI em bovinos é muito limitada (EMUTA; HORIUCHI, 2001) e ainda não é bem estabelecida devido à necessidade de ativações adicionais do oócito antes ou após o procedimento de ICSI (SUTTNER et al., 2000).

Embora os oócitos vitrificados imaturos tenham completado normalmente a maturação meiótica e a viabilidade destes se mostrou melhor preservada em relação aos oócitos em MII, o desenvolvimento embrionário dos oócitos criopreservados, independente do estadio meiótico foi totalmente comprometido, não havendo formação de blastocistos nos grupos CRIO-MIV ou MIV-CRIO por nenhuma das técnicas de ativação oocitárias.

Várias pesquisas são realizadas no intuito de identificar as possíveis causas e apontar o dano específico sofrido por esses oócitos criopreservados devido ao baixo desenvolvimento embrionário. Portanto, neste estudo não conseguimos afirmar o dano específico, porém sabemos que várias estruturas e/ou funções podem ter sido comprometidas, de acordo com dados da literatura. De uma maneira geral, independente do estadio meiótico, os oócitos podem ter sofrido inadequada maturação citoplasmática e nuclear, despolimerização do fuso meiótico (oócitos em MII) associado com desorganização dos microfilamentos e cromossomos (AMAN; PARKS, 1994; ROJAS et al., 2004; SUCCU et al., 2007); exocitose prematura dos grânulos corticais, levando ao enrijecimento da ZP, prejudicando a FIV (FUKU; XIA; DOWNEY, 1995; HYTTEL; VAJTA; CALLESEN, 2000; MAVRIDES; MORROLL, 2005); fraturas na membrana plasmática (ARAV et al., 1996); suporte inadequado das células do cumulus na MIV e FIV (IMOEDENMHE, SIGUE, 1992; CHIAN; NIWA; SIRARD, 1994).

Considerando que o processo de maturação é uma fase que inclui os eventos necessários que permitem ao oócito adquirir a capacidade para prosseguir no desenvolvimento embrionário, qualquer influência negativa da vitrificação nesse processo é de extrema relevância. Portanto, se ocorrer inadequada maturação citoplasmática, processos como síntese de proteínas (SIRARD; RICHARD; MAYES, 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), migração e reorganização de organelas (STOJKOVIC et al., 2001) serão prejudicados. Sabe-se que há uma intensa correlação entre o potencial de desenvolvimento dos oócitos e embriões com a função mitocondrial e conseqüentemente o índice de ATP

(STOJKOVIC et al., 2001). Portanto, a inabilidade das mitocôndrias de aumentar e/ou acumular ATP está relacionada ao desenvolvimento anormal ou ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (STEUERWALD et al., 2000), onde os blastômeros embrionários necessitam receber uma quantidade suficiente de mitocôndrias para produção de ATP, caso contrário podem tornar-se disfuncionais e fragmentados (CUMMINS, 2004). Além do que, há estudos correlacionando a influência da criopreservação na redução do potencial de membrana mitocondrial com a competência do oócito no desenvolvimento embrionário (VAN BLERKOM et al., 2002; TARAZONA et al., 2006;).

Manipalviratn and cols (2011) demonstraram que a vitrificação em oócitos bovinos reduz significativamente o teor de ATP, enquanto ZHAO and cols (2011) mostram que a vitrificação altera a função mitocondrial (o potencial de membrana mitocondrial) e provoca o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, eles propõem uma alternativa a fim de proteger a função mitocondrial em oócitos vitrificados, no qual consiste em um pré tratamento desses oócitos com ciclosporina (inibidor específico da permeabilidade mitocondrial) para aumentar o potencial de desenvolvimento *in vitro* desses oócitos (MANIPALVIRATN et al., 2011; ZHAO et al., 2011). Há relatos de que o potencial de membrana mitocondrial em oócitos imaturos é menor do que o observado em oócitos maduros (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Contudo, a interferência na concentração e/ou atividade mitocondrial também pode constituir um dos mecanismos de injúria produzido pela criopreservação.

Para assegurar uma ideal maturação citoplasmática e o desenvolvimento inicial embrionário, o estoque de transcritos e proteínas no citoplasma oocitário é de extrema importância (MEIRELLES et al., 2004). Assim, de acordo com os nossos resultados de clivagem, as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário não foi comprometida pela vitrificação, por mais que avaliações específicas não tenham sido realizadas.

Por outro lado, nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário (oito células em bovino), ocorre a transição materno zigótica (MZT) que é a ativação do genoma embrionário e síntese de novas proteínas, onde o embrião passa a comandar o desenvolvimento embrionário subsequente (MEIRELLES et al., 2004). Portanto, podemos inferir que possa ter ocorrido interferência na MZT pela criopreservação, no qual não obtivemos blastocistos provenientes de oócitos criopreservado.

Por mais que a vitrificação não tenha comprometido a maturação nuclear dos oócitos em VG alguns estudos demonstram que a exposição do oócito imaturo aos crioprotetores interfere na configuração dos cromossomos, além da distribuição dos microfilamentos depois

da MIV, afetando assim de forma considerável o desenvolvimento embrionário (AMAN; PARKS, 1994; MCWILLIAMS; GIBBONS; LEIBO, 1995; ROJAS et al., 2004). Já o oócito em estadio de MII por apresentar cromossomos distribuídos pela placa metafásica e fuso meiótico no qual são alvos dos efeitos deletérios do processo de criopreservação, são aptos a anomalia meiótica e conseqüente baixo desenvolvimento embrionário (BRUNET et al., 2003).

A baixa taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário encontrados neste estudo pode ser atribuído ao comprometimento da FIV, devido ao bloqueio à penetração dos espermatozóides na ZP (clivagem menor que 30% nos grupos vitrificados), baseado no fato de que a criopreservação pode causar exocitose prematura dos grânulos corticais e conseqüente enrijecimento da ZP dos oócitos. Porém, na tentativa de transpor a influência da capacidade de fertilização dos espermatozóides, a ativação partenogenética foi realizada. Mesmo assim verificamos que mesmo procedendo à ativação partenogenética dos oócitos vitrificados, seja do grupo CRIO-MIV seja do grupo MIV-CRIO, não houve melhora nas taxas de clivagem e formação embrionária em relação aos oócitos FIV, indicando que mesmo que ocorra comprometimento da zona pelúcida existe também outro comprometimento que ultrapassa esta estrutura e compromete a capacidade reprodutiva do oócito com grande impacto. Portanto, características individuais do oócito, como espessura da ZP e criotolerância, podem ter sido responsáveis pela clivagem de poucos oócitos submetidos à FIV e AT. Uma alternativa a esse enrijecimento da ZP, como já comentado, seria a ICSI.

Na MIV e no CIV embrionário, as células do cumulus são importantes, por oferecer suporte nutricional e importantes trocas bioquímicas com o oócito. De acordo com nossos resultados, os oócitos vitrificados em MII com ausência das células do cumulus e em VG com células do cumulus parcial apresentaram baixa taxa de clivagem e total comprometimento da competência de desenvolvimento. Corroborando nossos dados, Zhou and cols (2010) em estudos preliminares reportam que a taxa de clivagem de oócitos bovino desnudos (VG e MII) foi baixa e não houve desenvolvimento embrionário a blastocisto quando comparados ao grupo de oócitos envoltos com células do cumulus, estes mesmos autores verificaram que as taxas de sobrevivência, clivagem e formação de blastocistos nos oócitos imaturos (VG) vitrificados com presença total das células do cumulus foram significativamente mais altas do que naqueles vitrificados com cumulus parcial; no entanto no grupo de oócitos em MII, nenhuma diferença foi encontrada. Além disso, oócitos em VG vitrificados com cumulus total exibiram maior competência de desenvolvimento do que os oócitos em MII (ZHOU et al., 2010).

Martins and cols (2005) chamam a atenção para o baixo desenvolvimento embrionário e relatam que as taxas de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados em estadio imaturo são consideradas insatisfatórias, por serem menores que 10% (MARTINS et al., 2005). Portanto, diversos trabalhos relatam que a taxa de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados em diferentes estadios de maturação é extremamente baixa em relação a oócitos não criopreservados, o que vem de encontro com nossos dados, como Galbinski e cols (2003) que obtiveram ausência de fertilização e desenvolvimento embrionário dos oócitos vitrificados com DMSO 6M em palhetas de 0,25mL. Demonstraram assim, que a técnica de vitrificação em oócitos maturados *in vitro* por 18-22 horas (MII), possui efeito deletério sobre a capacidade fertilizadora dos oócitos (GALBINSKI; BOS-MIKICH; FERRARI;2003).

Kim and cols (2007) encontraram taxa de clivagem e formação de blastocistos inferiores no grupo de oócitos vitrificados pelo método Microdrop (55,7% e 2,3%) em comparação ao grupo controle (84,4% e 34,7%) (KIM et al.,2007). Vahida and cols (2009) obtiveram taxas menores de clivagem (39,1% vs 58,5%) e formação de blastocistos (5,1% vs 22,9%) no grupo de oócitos submetidos à MIV e posteriormente vitrificados pelo método nylon mesh (VAHIDA et al.,2009). Prentice and cols (2011) obtiveram menores taxas de clivagem (93% vs 42%) e formação de blastocisto no grupo de oócitos vitrificados pelo métodos cryotop (42% e 0.4%) em comparação ao grupo de oócitos não-vitrificados (93% e 31%) (PRENTICE et al.,2011). Sendo assim, sugere-se que independente do protocolo e do sistema de armazenamento adotado, o processo de vitrificação prejudica e muito a qualidade do oócito.

Em contrapartida, Men and cols (2002) encontraram similar taxa de clivagem entre oócitos imaturos (GVBD) e maduros (MII) vitrificados pelo método OPS (53,56% e 58,01%, respectivamente) e maior proporção de formação de blastocistos (D8) no grupo MII (8,37%); em relação ao GVBD (1,06%). Assim, oócitos em diferentes estadios de maturação reagiram de forma diferente à criopreservação, onde os oócitos em MII apresentaram maior competência de desenvolvimento em relação aqueles vitrificados em GVBD (MEN;MONSON; RUTLEDGE, 2002).

Contudo, não há esclarecimento sobre a principal estrutura ou função prejudicada e responsável pelo baixo desenvolvimento embrionário de oócitos criopreservados. Mas, as estruturas e/ou funções podem ser danificadas total ou parcialmente, sendo que a criotolerância de cada oócito é o que determina esse fato, possivelmente influenciada pelo ambiente *in vitro* (como a MIV). Sendo assim, ainda não há consenso sobre o melhor estadio meiótico oocitário ou o mais resistente para criopreservar, podendo ser atribuído aos diversos

protocolos e adaptações, realizados por diferentes grupos de pesquisa. Embora avanços consistentes na criopreservação de oócitos humanos em estadio de MII (maturados *in vivo*) tenham ocorrido na última década (COBO et al.,2008;CHIAN et al.,2009b), a associação entre a MIV e criopreservação de oócitos, independente da espécie estudada, ainda não constitui uma ferramenta passível de aplicação na prática clínica na RA humana e estudos subseqüentes serão necessários para investigar as alterações decorrentes da associação dos dois procedimentos (MIV e criopreservação) e propor novas estratégias para otimizar os protocolos atualmente disponíveis para fins de preservação de fertilidade.

5. Agradecimentos:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de mestrado (processo nº 2009/04102-7) e de auxílio a projeto de pesquisa (nº de processo 2010/09368-2), sem os quais não teria sido possível a execução deste trabalho.

À Profa Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci, do Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução Feminina do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração na realização das leituras da técnica de DEAD-LIVE através da microscopia de fluorescência.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. **Biol Reprod**, v.50, n.1, Jan, p.103-10. 1994.
- ANTINORI, M. et al. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reprod Biomed Online**, v.14, n.1, Jan, p.72-9. 2007.
- ARAV, A. et al. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, Dec, p.589-99. 1996.
- BINES, J.; OLESKE, D.M.; COBLEIGH, M.A. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. **J Clin Oncol**, v.14, n.5, May, p.1718-29. 1996.
- BRUNET, S. et al. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. **Reproduction**, v.126, n.4, Oct, p.443-50. 2003.

- BLUMENFELD, Z. et al. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing gonadotoxicity in young women with systemic lupus erythematosus treated by chemotherapy. **Lupus**, v.9, n.6, p.401-5. 2000.
- BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J.J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biol Reprod**, v.43, n.4, Oct, p.543-7. 1990.
- CHA, K.Y.; CHIAN, R.C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Hum Reprod Update**, v.4, n.2, Mar-Apr, p.103-20. 1998.
- CHIAN, R.C.; NIWA, K.; SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1499-508. 1994.
- CIOTTI P. M. et al. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. **Fertil Steril**, v.1, 2008.
- COBO, A. et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. **Clin Transl Oncol**, v.10, n.5, May, p.268-73. 2008.
- CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.115 Suppl 1, Jul 1, p.S23-9. 2004.
- DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Hum Reprod Update**, v.12, n.5, Sep-Oct, p.519-35. 2006.
- EBNER, T. et al. Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. **Fertil Steril**, v.94, n.3, Aug, p.913-20. 2010.
- EMUTA, C.; HORIUCHI, T. Effects of Timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) on cleavage and Subsequent Embryonic Development in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v.47, n.6, 2001.
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, n.2, Apr, p.139-56. 1995.
- GALBINSKI, S.; BOS-MIKICH, A.; FERRARI, A.N. Viability and *in vitro* Fertilization of Bovine Oocytes after Vitrification. **RGO**, v.25, n.8, p.553-559, 2003.
- GONZALEZ, C. et al. Combined strategy for fertility preservation in an oncologic patient: vitrification of in vitro matured oocytes and ovarian tissue freezing. **J Assist Reprod Genet**, Sep 2. 2011.
- MINGOTI, G.Z. et al. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v.17, n.4, Nov, p.321-8. 2009.

- GOOK, D.A. et al. Fertilization of human oocytes following cryopreservation; normal karyotypes and absence of stray chromosomes. **Hum Reprod**, v.9, n.4, Apr, p.684-91. 1994.
- GU, Y.F. et al. A comparative analysis of the zona pellucida birefringence of fresh and frozen-thawed human embryos. **Reproduction**, v.139, n.1, Jan, p.121-7. 2010.
- HOCHI, S. et al. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.4, Mar, p.787-96. 1998.
- HYTTEL, P.; VAJTA, G.; CALLESEN, H. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. **Mol Reprod Dev**, v.56, n.1, May, p.80-8. 2000.
- KEEFE, D. et al. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. **Hum Reprod**, v.12, n.6, Jun, p.1250-2. 1997.
- KA, H.H. et al. Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. **Biol Reprod**, v.57, n.6, Dec, p.1478-83. 1997.
- KIM, D.H. et al. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. **J Reprod Dev** n.4, Aug, p.843-51. 2007., v.53, 2007.
- KUBELKA, M. et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, Without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v.62, n.2, Feb, p.292-302. 2000.
- KUWAYAMA, M. et al. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, v.11, n.3, Sep, p.300-8. 2005.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v.67, n.1, Jan 1, p.73-80. 2007.
- KRZYSZOWSKA, M. et al. Development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): effect of gamete donors, sperm chromatin structure and activation treatment. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 47, n.(3), p. 85–91, 2002.
- LEE, S.J. et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. **J Clin Oncol**, v.24, n.18, Jun 20, p.2917-31. 2006.
- LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, v.69, n.1, Jan 1, p.37-47. 2008.
- LIN, Y.H.; HWANG, J.L. In vitro maturation of human oocytes. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.45, n.2, Jun, p.95-9. 2006.

- LIU, Y. et al. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of in vitro matured pig oocytes. **Cryo Letters**, v.29, n.4, Jul-Aug, p.315-20. 2008.
- LOWTHER, K.M. et al. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.81, n.1, Jul, p.147-54. 2009.
- LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Anim Reprod Sci**, v.68, n.1-2, Oct 31, p.23-8. 2001.
- MAGISTRINI, M.; SZOLLOSI, D. Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. **Eur J Cell Biol**, v.22, n.2, Oct, p.699-707. 1980.
- MAVRIDES, A.; MORROLL, D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.118, n.1, Jan 10, p.66-70. 2005.
- MAGNUSSON, V. et al. Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Anim Reprod Sci**, v.106, n.3-4, Jul, p.265-73. 2008.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v.57, n.3, Feb, p.1095-103. 2002.
- MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.8, n.2, Apr, p.173-83. 1971.
- MCWILLIAMS, R.B.; GIBBONS, W.E.; LEIBO, S.P. Osmotic and physiological responses of mouse zygotes and human oocytes to mono- and disaccharides. **Hum Reprod**, v.10, n.5, May, p.1163-71. 1995.
- MINGOTI, G.Z. et al. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. **Zygote**, v.17, n.4, Nov, p.321-8. 2009.
- MOOS, J. et al. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. **Hum Reprod**, v.10, n.9, Sep, p.2467-71. 1995.
- MONTAG, M.; VAN DER VEN, H. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. **Reprod Biomed Online**, v.17, n.4, Oct, p.454-60. 2008.

- MONTAG, M. et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. **Reprod Biomed Online**, v.16, n.2, Feb, p.239-44. 2008.
- OLDENBOURG, R.; MEI, G. New polarized light microscope with precision universal compensator. **J Microsc**, v.180, n.Pt 2, Nov, p.140-7. 1995.
- OLDENBOURG, R. A new view on polarization microscopy. **Nature**, v.381, n.6585, Jun 27, p.811-2. 1996.
- PARK, Y.S. et al. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. **Theriogenology**, v.64, n.1, Jul 1, p.123-34. 2005.
- PRENTICE,J.R ET AL. Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes.**Theriogenology** v.75 ,p. 602–609, 2011.
- REVEL, A.; LAUFER, N. Protecting female fertility from cancer therapy. **Mol Cell Endocrinol**, v.187, n.1-2, Feb 22, p.83-91. 2002.
- PARK,S.et al.Chromossome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at germinal vesicle stage. *Fertil Steril*,v.68, p.920-926,1997.
- PALERMO, G.D. et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. **Fertil Steril**, v.63, n.6, Jun, p.1231-40. 1995.
- PELLETIER,C.; KEEFE, D. L.; TRIMARCHI, J. R.. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. **Fertil Steril**. v. 81,2004.
- POPE, C.E. et al. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Anim Reprod Sci**, v.53, n.1-4, Oct, p.221-36. 1998.
- ROJAS, C. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. **Cryobiology**, v.49, n.3, Dec, p.211-20. 2004.
- SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, n.2, Jan 15, p.483-97. 1998.
- STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v.64, n.3, Mar, p.904-9. 2001.

- SON, W.Y., et al. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the in vitro developmental capacity of human immature oocytes. **Fertil Steril**, v.66, n(6), p.995-9. 1996.
- STACHECKI, J.J.; COHEN, J.; WILLADSEN, S. Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation. **Biol Reprod**, v.59, n.2, Aug, p.395-400. 1998.
- STEUERWALD, N. et al. Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.5, May, p.448-53. 2000.
- SUN, Q.Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. **Microsc Res Tech**, v.61, n.4, Jul 1, p.342-8. 2003.
- SUTTNER, R. et al. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. **Theriogenology**, v.54, n.6, Oct 1, p.935-48. 2000.
- SUZUKI, T. et al. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method in vitro. **Cryobiology**, v.33, n.5, Oct, p.515-24. 1996.
- SHEN, Y. et al. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. **Hum Reprod**, v.20, n.6, Jun, p.1596-606. 2005.
- TAO, T.; DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **J Assist Reprod Genet**, v.25, n.7, Jul, p.287-96. 2008.
- TUCKER, M.J. et al. Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. **Fertil Steril**, v.70, n.3, Sep, p.578-9. 1998.
- TSUBAMOTO, H. et al. Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. **Protein Expr Purif**, v.17, n.1, Oct, p.8-15. 1999.
- TSAADON; A. et al. When a sperm meets an egg: Block to polyspermy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.252, p107-114, 2006.
- VAN BLERKOM, J. et al. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. **Hum Reprod**, v.17, n.2, Feb, p.393-406. 2002.
- WASSARMAN, P. et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. **J Exp Zool**, v.285, n.3, Oct 15, p.251-8. 1999.

Figura 1. Esquema dos grupos experimental.

Legenda. OPU= *Ovum Pick-Up*; CRIO = Criopreservação; MIV = Maturação *in vitro*; ZP= Zona Pelúcida; FIV= Fertilização *in vitro*; AT= Ativação Partenogenética; CIV= Cultivo embrionário *in vitro*.

Figura 2. Comparação entre os estádios meióticos (VG ou MII) dos grupos controle e CRIO-MIV.

Legenda: VG= vesícula germinativa (imaturo); MI= metáfase I; MII = metáfase II (BIRNEY et al.); Sem ID = sem identificação. ($p=0,23$).

Figura 3 Análise da Viabilidade oocitária entre os grupos controles. MIV-CRIO e CRIO-MIV

Legenda: (a) $p<0,0001$; (b) $p=0,017$.

Tabela 1. Avaliação do desenvolvimento embrionário dos oócitos submetidos à fertilização *in vitro* e Ativação Partenogenética nos grupos Controle, CRIO-MIV e MIV-CRIO.

		CONTROLE		CRIO-MIV		MIV-CRIO	
		n	%	n	%	n	%
FIV	Clivagem	169 ^{a,b}	80	11 ^a	28	12 ^b	26
	Produção	54 ^{c,d}	26	0 ^c	0	0 ^d	0
	Eclosão*	22	41	0	0	0	0
AT	Clivagem	118 ^{e,f}	58	14 ^e	28	14 ^f	22
	Produção	50 ^{g,h}	24	1 ^g	2	0 ^h	0
	Eclosão*	9 ^{i,j}	18	1 ⁱ	100	0 ^j	0

Legenda. a:p<0,0001; b: p<0,0001; c:p<0,0001; d:p=0,0004; e:p=0,0002; f:p<0,0001; g:p<0,0001; h:p<0,0001; i:p=0,04; j:p=0,003. * A taxa de eclosão é calculada a partir do numero de blastocistos formados no D8.