



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária



# Avaliação do Ficol como crioprotetor de ovócitos imaturos com posterior descongelação, maturação e fecundação *in vitro*

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Joana Isabel Fidalgo Avelar Moreira

## Orientadores

Prof. Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade - ESA-IPCB

Prof. Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva - UAC- Açores

Agosto de 2014





Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Escola Superior  
Agrária



# **Avaliação do Ficol como crioprotetor de ovócitos imaturos com posterior descongelação, maturação e fecundação *in vitro***

Joana Isabel Fidalgo Avelar Moreira

## **Orientadores**

Prof. Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade - ESA-IPCB

Prof. Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva – UAC- Açores

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica, realizada sob a orientação científica do Professor coordenador Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Agosto de 2014**



***Aos meus pais***

## Agradecimentos

Uma vez chegada ao fim deste trabalho, gostaria de expressar o meu sincero agradecimento a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a minha formação académica, bem como para o meu crescimento como pessoa.

Ao prof. Doutor Joaquim Moreira da Silva por todo o apoio, disponibilidade e acolhimento, bem como agradecimento pela sua orientação deste trabalho.

Ao prof. Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade pela sua orientação e apoio ao longo deste trabalho, bem como em toda a minha formação académica na Escola Superior Agraria de Castelo Branco.

À Doutora Marwa Faheem pela excelente orientadora, por todos os conhecimentos partilhados, pela paciência, pelos esclarecimentos a qualquer altura e por todo o apoio e simpatia.

Aos meus colegas de trabalho, Sofia Silva, Hélder Nunes, Maria Mendonça e António Chaveiro, pela ajuda e boa disposição diária.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal da UAC.

Aos meus colegas de Mestrado, Cecília Oliveira, Cristina Santos, Mónica Santos, Marcelo Silva e Vítor Oliveira, por todo o apoio, amizade e incentivo ao longo de todo o mestrado.

À Eng<sup>a</sup> Sandra Duarte da Escola Superior Agraria de Castelo Branco, por toda a amizade, apoio, partilha de conhecimentos, motivação e incentivo.

À minha família, primos, tios e avós, um muito obrigado pelo apoio dado ao longo deste tempo.

Aos meus pais por todo o apoio, paciência e incentivo, não só nesta fase, bem como ao longo de toda a minha vida.

Ao Bruno, por toda a paciência, incentivo, apoio e amor em todos os momentos.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para que agora possa alcançar esta importante meta da minha vida.

A todos, o meu sincero e reconhecido agradecimento!!!

Este trabalho foi parcialmente suportado pelo Centro de Investigação Agrária dos Açores - CITA-A - Projeto: M3.1.7/F/007/2011

## Resumo

Os objetivos do presente trabalho foram a avaliação da capacidade de fecundação *in vitro* e posterior desenvolvimento até ao estado de mórula compacta/blastocisto após congelação/descongelação de ovócitos imaturos bovinos, recorrendo ao ficol como crioprotetor. Desta forma foram então utilizados um total de 134 ovários recolhidos no Matadouro dos quais foram puncionados 1245 cumulus complexos ovocitários (COCs) classificados com classe A e B sendo estes divididos em dois grupos de trabalho: Grupo 1 - Avaliação da toxicidade dos crioprotetores (n=691); Grupo 2 - Avaliação da vitrificação de ovócitos (n=554). Os ovócitos pertencentes ao Grupo 1 foram usados para a avaliação do Ficol como crioprotetor sendo os resultados avaliados pela taxa de desenvolvimento nuclear após a sua maturação. Após observar que o Ficol não é tóxico para os COCs, foi desenvolvida a segunda parte do trabalho (Grupo 2), onde após a descongelação, os ovócitos foram fecundados *in vitro* sendo avaliado o estado de desenvolvimento embrionário. No que concerne aos resultados da expansão das células do cumulus oophorus, observou-se uma menor taxa de expansão dos cumulus dos ovócitos submetidos ao meio de vitrificação contendo apenas DMSO ( $88,7 \pm 2,6$ ), quando comparados com os resultados do DMSO + Ficol ( $91,8 \pm 2,2$ ) ( $p < 0,05$ ). No grupo controlo a taxa de maturação avaliada por este critério foi de  $92,9 \pm 1,6$ , sendo também estatisticamente superior ao grupo onde foi apenas usado DMSO como crioprotetor ( $P < 0,05$ ). Na avaliação da taxa de maturação, recorrendo ao desenvolvimento nuclear, não foram registadas diferenças significativas na percentagem de ovócitos maturados, submetidos ao meio de vitrificação contendo DMSO (48,8%) quando comparados com os valores obtidos pelo grupo controlo (51,0%). A suplementação do meio de vitrificação com o Ficol não demonstrou nenhuma melhoria no desenvolvimento nuclear (44,1%) porém não se verificou que este crioprotetor tenha uma ação negativa no progresso de maturação nuclear.

Em relação a taxa de sobreviventes, observa-se então uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre o grupo do DMSO ( $94,5 \pm 1,4\%$ ) e o controlo (100%) ( $p < 0,05$ ) sendo menor no grupo do DMSO + Ficol ( $85,6 \pm 7,0$ ) ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos resultados referentes ao desenvolvimento embrionário no estado de 2 – 8 células, foram superiores no grupo controlo ( $67,9 \pm 5,1$ ), sendo DMSO 26.5 ( $\pm 1,8\%$ ) para o DMSO e 17.4 ( $\pm 1,1\%$ ) e DMSO + Ficol ( $p < 0,05$ ). Nos restantes estados de desenvolvimento embrionário as diferenças observadas entre o DMSO ( $21,5 \pm 2,1\%$ ) e o DMSO + Ficol ( $22,3 \pm 5,7\%$ ) não foram estatisticamente significativas, no entanto o grupo controlo ( $52,0 \pm 8,4\%$ ) obteve sempre percentagens superiores, sendo estas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Podemos então concluir que o Ficol ao não ser tóxico para os ovócitos imaturos de bovinos trata-se de um crioprotetor com ação benéfica na maturação nuclear para o processo de vitrificação, pois protege os ovócitos da elevada toxicidade do DMSO.

## **Palavras-chave**

Bovino; Criopreservação; Ficol; Ovócito; Toxicidade.

## Abstract

The main objectives of this study were to assess the ability of in vitro fertilization and subsequent development to the state of morula/blastocyst after freezing/thawing of immature oocytes bovine, using ficol as cryoprotectant. Thus a total of 134 ovaries collected at a local abattoir of which 1245 cumulus oocytes complex (COCs), classified as class A and B were divided into two groups: Group 1: - Evaluation of the toxicity of cryoprotectants (n=691) and Group 2 - Rating of development after in vitro fertilization after oocyte's vitrification (n=554). The oocytes in Group 1 were used to evaluate the toxicity of the cryoprotectant Ficol and the results were evaluated by the rate of nuclear maturation development. After noting that the Ficol is not toxic to COCs, the second part of the work (Group 2) was developed, where after thawing, the oocytes were fertilized in vitro and evaluated the state of development and maturation of embryos. Regarding the results of expanding *cumulus cells oophorus*, there was a lower rate of expansion of the cumulus of the oocytes undergoing vitrification medium containing DMSO alone ( $88.7 \pm 2.6$  %) compared with the results of + DMSO Ficol ( $91.8 \pm 2.2$  %) ( $p < 0.05$ ). In the control group the rate of maturation evaluated by this criterion was  $92.9 (\pm 1.6\%)$ , being also statistically superior as compared to the group which was only used as a cryoprotectant DMSO ( $P < 0.05$ ). COC's maturation rate, using the nuclear development, no significant differences were recorded in the percentage of matured oocytes subjected to vitrification medium containing DMSO (48.8 %) when compared with values obtained for the control group (51.0 %). The vitrification medium supplementation with Ficol showed no improvement in nuclear development (44.1%), besides this cryoprotectant has a negative action in the progress of nuclear maturation. Regarding the rate of survivors, it was observed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the group of DMSO ( $94.5 \pm 1.4$  %) and control (100 %) ( $p < 0.05$ ), being lower in the DMSO+Ficol group ( $85.6 \pm 7.0$ ) ( $p < 0.05$ ). Results for the embryonic development in the state 2-8 cells, were higher in the control group ( $67.9 \pm 5.1$  %), being  $26.5 (\pm 1.8$  %) for DMSO and  $17.4 (\pm 1.1$  %) for DMSO+Ficol ( $P < 0.05$ ). In the other stages of embryonic development the differences observed between the DMSO ( $21.5 \pm 2.1$  %) and DMSO + Ficol ( $22.3 \pm 5.7$  %) were not statistically significant, however the control group ( $52.0 \pm 8.4$  %) always got higher percentages of development ( $p < 0.05$ ).

We can then conclude that the Ficol is not toxic to the immature bovine oocytes, and can act as beneficial for the vitrification process, protecting oocytes from high toxicity of DMSO.

## Keywords

Bovine; Cryopreservation; Ficol; Oocytes; Toxicity

# Índice

Resumo.....	VI
Abstract.....	VIII
Índice de figuras.....	XI
Lista de Quadros.....	XII
Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	XIII
1- Introdução.....	1
2 – Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 – Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	3
2.2 – Criopreservação.....	4
2.2.1 – Métodos de criopreservação.....	5
2.2.1.1 – Congelação lenta.....	5
2.3 – Fertilização <i>in vitro</i> .....	7
2.4 – Recolha de ovócitos.....	9
2.5 – Maturação dos ovócitos.....	11
2.5.1 – Critérios de avaliação da maturação dos ovócitos.....	15
2.6 – Estrutura dos embriões.....	17
2.6.1 – Critérios da avaliação dos embriões.....	18
3- Materiais e Métodos.....	21
3.1 – Delineamento experimental.....	21
3.2 – Composição e elaboração dos meios.....	25
3.2.1 – Meios de maturação dos ovócitos.....	25
3.2.2 – Meios de vitrificação dos ovócitos.....	25
3.2.3 – Meio de fertilização dos ovócitos.....	25
3.2.4 - Meios de desenvolvimento / cultura dos embriões.....	27
3.2.5 – Coloração dos ovócitos.....	27
3.3 – Maturação dos COCs.....	27
3.3.1 – Recolha dos ovários.....	27
3.3.2 – Recolha dos COCs.....	27
3.3.3 – Triagem e lavagem dos COCs.....	28
3.3.4 – Maturação <i>in vitro</i> .....	28
3.3.4.1 – Avaliação da maturação celular.....	28
3.3.4.2 – Avaliação da maturação nuclear.....	28

3.4 – Vitrificação dos ovócitos imaturos.....	29
3.5 – Fertilização <i>in vitro</i> .....	29
3.6- Cultura <i>in vitro</i> de embriões.....	30
3.7- Análise e tratamento de dados.....	31
4 – Resultados e Discussão .....	32
5 – Considerações finais.....	35
6 – Bibliografia.....	36

## Índice de figuras

Figura 1: Recolha de ovócitos em ovário de dadora morta.....	10
Figura 2: Recolha de ovócitos em ovário de dadora viva.....	11
Figura 3: Ovócito, constituído pelo <i>Cumulus oophorus</i> , corona radiata e zona pelúcida. ....	13
Figura 4: Diferentes fases da maturação nuclear. ....	14
Figura 5: Embrião fecundado <i>in vitro</i> .....	17
Figura 6: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo controlo. ....	21
Figura 7: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo DMSO.....	22
Figura 8: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo DMSO+Ficol. ....	22
Figura 9: Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo controlo. .	23
Figura 10: Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo DMSO.....	24
Figura 11: Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo DMSO+Ficol.....	24

## Lista de Quadros

Quadro 1: Classificação dos COC.....	16
Quadro 2: Classificação dos ovócitos.....	16
Quadro 3: Classificação dos embriões.....	18
Quadro 4: Classificação dos embriões.....	19
Quadro 5: Composição dos meios TALP de base para a IVF.....	26
Quadro 6: Composição dos meios TALP intermédios para a IVF.....	26
Quadro 7: Taxa de desenvolvimento nuclear, após maturação .....	32
Quadro 8: Taxa de ovócitos sobreviventes.....	33
Quadro 9: Desenvolvimento <i>in vitro</i> após criopreservação e maturação dos ovócitos.....	34

## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ATP – Adenosina Trifosfato

IAMA - Instituto da Alimentação e Mercados Agrícolas

BSA – Soro albumina bovino

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

CALS – College of Agriculture and Life Sciences

CIV – Cultura de embriões *in vitro*

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

COC – complexo-oocito-cumulus

DMSO – Dimetilsulfóxido

E<sub>2</sub> – Estrogénio

EFS – Etilenoglicol, ficol e sacarose

EG – Etilenoglicol

FCS – Soro fetal bovino

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormona folículo estimulante

GnRH – Hormona libertadora de Gonadotrofina

HEPES – N- [2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

INRA – Institut National de la Recherche Agronomique

KCL – Cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato Monopotássico

LH – Hormona Luteinizante

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – Cloreto de Magnésio Hexahidratado

MIV – Maturação *in vitro*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

OPU – Ovum Pick-up

PAG's – Proteínas associadas à gestação

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PIV – Produção de embriões *in vitro*

TCM -199 – MédiuM 199 Cell Culture Tested

ZP – Zona pelúcida

## 1- Introdução

As novas tecnologias da reprodução têm nos mais recentes anos gerado grande interesse entre a comunidade científica bem como a nível dos produtores de animais. O principal objetivo das estratégias reprodutivas é diminuir o intervalo entre gerações através do aproveitamento dos gâmetas dos animais geneticamente superiores. Este aproveitamento tem sido realizado nos gâmetas masculinos, através de técnicas de criopreservação e sexagem de sémen, o qual é essencialmente usado para a realização de inseminação artificial. Em comparação, apenas uma pequena percentagem dos gâmetas femininos está a ser utilizado nos processos tradicionais de reprodução. No entanto com o avanço da melhoria das técnicas de produção de embriões a partir da fecundação *in vitro* o papel dos gâmetas femininos poderá inverter-se, uma vez que, em condições laboratoriais *in vitro* já é possível, a maturação, fecundação e cultura dos embriões até ao estado de morula/blastocisto, por um período de aproximadamente uma semana.

Todos os métodos de reprodução *in vitro* são dependentes do desenvolvimento ovocitário *in vivo* de folículos primordiais a folículos antrais, os quais estão presentes num pequeno número no ovário. Contudo as fêmeas apresentam centenas ou milhares de ovócitos no estado pré-antral que poderiam ser utilizados, proporcionando um melhor aproveitamento do seu potencial genético (Sato *et al.*, 1990). A maturação desses ovócitos é a fase mais importante do sistema de produção de embriões *in vitro*. Após a aspiração do líquido folicular, o ovócito encontra-se incluído num complexo celular, denominado de complexo *cumulus-oophurus* (COCs).

No entanto, além da escassez de técnicas eficientes de produção *in vitro* desses folículos, torna-se necessário a existência de protocolos para a preservação desses mesmos gâmetas uma vez que a manipulação imediata de um grande número torna-se inexecutável. A preservação de material biológico em azoto líquido (-196°C) pode acontecer por vários anos, sendo esta uma alternativa para preservar o material genético de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. A conservação do material genético oferece grandes facilidades, tais como a sua permuta entre instituições em todo o mundo, a sua comercialização e ainda um maior controlo sanitário (Figueiredo *et al.*, 1993).

A criopreservação, definida pela manutenção de tecidos em temperaturas de -196°C, promove a interrupção de todas as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares, mantendo por tempo indeterminado o tecido criopreservado (Bakhach, 2009). O principal objetivo da criotecnologia é diminuir os danos sobre as células nas etapas de criopreservação (Kuleshova *et al.*, 2002). Os crioprotetores promovem a estabilização das proteínas intracelulares, reduzem a formação de cristais no interior das células e diminuem o impacto causado pelos electrolitos no meio intra e extracelular. Os crioprotetores são divididos em três

grupos, os intracelulares ou permeáveis de baixo peso molecular (ex: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (ETG), propanodiol (PROH), glicerol (GLI), metanol e butanodiol, o grupo dos extracelulares ou impermeáveis de baixo peso molecular (Galactose, glicose, sacarose e trealose), sendo o último grupo constituído por elementos extracelulares ou impermeáveis de elevado peso molecular (polivinilpirrolidona, albumina sérica bovina e o ficol) (Gosden *et al.*, 2002; Shaw; Jones, 2003). No entanto é importante que se tenha em consideração a toxicidade e a associação entre os crioprotetores, além da técnica e do tipo de material a ser conservado (Stachecki; Cohen, 2004)

Desta forma os objetivos do presente trabalho foram a avaliação da capacidade de fecundação *in vitro* e posterior desenvolvimento até ao estado de mórula compacta/blastocisto após congelação/descongelação de ovócitos imaturos, recorrendo ao ficol como crioprotetor.

## 2 - Revisão Bibliográfica

### 2.1 - Produção *in vitro* de embriões bovinos

Atualmente, na indústria de transferência de embriões bovinos, a produção de embriões *in vitro* (PIV) apresenta-se como uma alternativa aos meios convencionais de obtenção de embriões para transferência, utilizando majoritariamente ovócitos imaturos colhidos por Ovum Pick-up (OPU) de vacas dadoras (Antunes *et al.*,2008). Estão agora disponíveis diversos métodos para a maturação e fertilização de ovócitos bovinos *in vitro* e métodos de cultura, embora ainda imperfeitos, permitem cultivar os embriões até que estes atinjam o estado próprio para a transferência ou para criopreservação (Antunes *et al.*,2008). Apesar da aplicação à escala mundial, com diversos objetivos consoante as espécies animais a que se destinam, a PIV de embriões bovinos requer técnicas exigentes e um laboratório muito específico totalmente equipado para assegurar a produção de embriões de elevada qualidade. Uns dos objetivos, numa perspetiva comercial são os programas de melhoramento de efetivos.

Os embriões podem começar a ser produzidos cada vez mais cedo e em maior número, dependendo então do ganho genético da intensidade de seleção e da diminuição do intervalo entre gerações. Normalmente os ovócitos são recolhidos a partir dos folículos de ovários de vacas dadoras vivas, por aspiração usando uma sonda ultrassónica guiada através da parede vaginal. Esta técnica não acarreta nenhuma consequência negativa para a estrutura ovárica nem para a subsequente função ovárica. Apesar da OPU continuar a ser o método escolhido por excelência para a recolha de ovócitos bovinos, o elevado custo constitui uma forte barreira para os programas de investigação. Os ovócitos recolhidos de ovários de matadouro, são uma fonte barata e amplamente disponível de ovócitos para a pesquisa em produção de embriões (Antunes *et al.*,2008).

Os métodos para a seleção de complexo-oócitos-cumulo (COCs) baseiam-se geralmente em critérios morfológicos tais como o número de camadas de *cumulus-oophorus* e a homogeneidade do ooplasma. Os COCs com um *cumulus* completo e compacto e com um ooplasma uniforme têm maior probabilidade de dar origem a embriões de elevada qualidade (Antunes *et al.*,2008).

A produção de embriões *in vitro* envolve três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultura de embriões *in vitro* (CIV).

No sistema de maturação é utilizado um meio de TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal de vaca e gonadotrofinas (FSH, LH), em 5% de CO<sub>2</sub> no ar, com 100% de humidade relativa a 38,5°C. Após uma incubação de 24h, o ovócito bovino está maturo, expele o primeiro corpo polar e está pronto para ser fertilizado. Em condições ótimas de MIV, cerca de 90% dos ovócitos atingem a metáfase II, estado no qual ocorre a fertilização na maior parte dos mamíferos (Antunes *et al.*, 2008).

## 2.2 - Criopreservação

A criopreservação consiste na conservação de material biológico a temperatura ultrabaixa, geralmente em azoto líquido (- 196°C).

A criobiologia tem revolucionado os estudos em reprodução animal com a possibilidade de preservar gametas e embriões. Nas últimas décadas, a criopreservação tem sido vastamente utilizada na reprodução de animais domésticos como um procedimento para conservar o material genético oriundo das biotécnicas de reprodução, permitindo, assim, a formação de bancos de recursos genéticos. Em princípio, os bancos de recursos genéticos oferecem uma série de benefícios em programas onde o objetivo geral é preservar a diversidade genética. Para animais de alto valor zootécnico, a conservação do material genético oferecia grandes facilidades, tais como a sua permuta entre instituições em todo o mundo, a sua comercialização e ainda um maior controlo sanitário. Este recurso pode ser utilizado ainda em animais selvagens, a fim de evitar a extinção de espécies ameaçadas, além de oferecer a vantagem de favorecer trocas de germoplasma entre as populações de animais criados em cativeiro e no seu habitat de origem, aumentando desta forma, a sua diversidade.

Desde a introdução do glicerol como agente crioprotetor permeável (Polge *et al.*, 1949), e a subsequente descoberta e utilização do dimetilsulfóxido (DMSO) por Lovelock e Bishop (1959), estudos relacionados com a criopreservação de folículos pré-antrais tem sido realizados (Parkes e Smith, 1953; Green *et al.*, 1956; Deanesly, 1957).

Vários trabalhos foram realizados utilizando o glicerol como agente crioprotetor de gâmetas femininos inclusos no tecido ovárico de ratas (Parkes e Smith, 1953; Green *et al.*, 1956; Deanesly, 1957). Apesar da eficiência do glicerol, os pesquisadores mostraram também que a congelação e posterior descongelação de ovários causava a destruição de mais de 90 % dos ovócitos (Parkes e Smith, 1953; Green *et al.*, 1956). Por outro lado, um grande número de ovócitos provenientes de folículos primordiais sobreviveram e tornaram-se maduros após o transplante para fêmeas onde foram retirados os ovários. (Deanesly, 1957).

Atualmente vários agentes crioprotetores como o dimetilsulfóxido (DMSO) (Carroll *et al.*, 1990), propanodiol (PROH)(Kubota *et al.*, 1998) ou o etilenoglicol (EG)(Oktay *et al.*, 1997) têm sido amplamente utilizados para a criopreservação de ovócitos por terem sido apresentados resultados promissores devido a um melhor conhecimento acerca do processo de criopreservação, agentes crioprotetores utilizados e constituição celular.

Nos últimos 20 anos, os protocolos de criopreservação de embriões e espermatozóides têm sido otimizados até se tornar um processo rotineiro nos laboratórios de reprodução de todo o mundo. No entanto, quanto aos gâmetas femininos, essa técnica ainda continua a ser executada com limitado sucesso.

A capacidade do material biológico de sobreviver ao processo de criopreservação depende da sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação e velocidade de redução da temperatura. Desta forma, antes de se desenvolver um protocolo eficiente de criopreservação, é necessário conhecer todos os mecanismos envolvidos em cada etapa da congelação celular.

## **2.2.1 - Métodos de criopreservação**

### **2.2.1.1 - Congelação lenta**

Na congelação lenta, a queda na temperatura ocorre gradualmente através de uma curva dependente da estrutura a ser criopreservada, na tentativa de promover um delicado equilíbrio entre os diferentes elementos celulares (Loutradi *et al.*, 2008).

A congelação convencional é um método de criopreservação que usa uma baixa concentração de crioprotetores e uma taxa de congelação lenta. O maior problema é a formação de cristais de gelo no interior das células resultando em danos na membrana citoplasmática (Boediono, 1995). Por outro lado, a necessidade de uma taxa de congelação baixa, implica o uso de máquina de congelação programável de custo elevado. A técnica de vitrificação foi desenvolvida para resolver estes problemas.

Os ovócitos são expostos de modo gradual a temperaturas cada vez mais baixas, através do uso de um aparelho programável para baixar automaticamente a temperatura de refrigeração (Chen, Yang, 2009).

No entanto o resfriamento lento pode causar danos celulares, como a formação de cristais de gelo no interior das células (Vajta, 2000). Isto porque são usadas menores concentrações de crioprotetores os quais não eliminam a formação de gelo intracelular e possíveis lesões na célula (Seki e Mazur, 2008; Vajta e Kuwayama, 2006). Além disso, para a realização da técnica é necessário pessoal qualificado, equipamentos caros e mais tempo para a sua aplicação (CAO *et al.*, 2009; Chen; Yang, 2009; Vajta e Kuwayama, 2006).

### **2.2.1.2 - Vitrificação**

Vitrificação é um método de criopreservação de tecidos e/ou células sem a formação de cristais de gelo. Este fenómeno faz com que o líquido se solidifique por elevação extrema da sua viscosidade durante o arrefecimento sem que ocorra formação de cristais. A temperatura do líquido desce rapidamente, produzindo-se um amorfo ou vítreo (Luyet, 1957). No caso de soluções aquosas este fenómeno produz-se se o meio for muito concentrado em crioprotetores.

Na procura de metodologias que proporcionem a sobrevivência dos oócitos, grande número de investigações foram direcionadas para métodos alternativos de

criopreservação, especialmente o congelamento ultra rápido e a vitrificação, que possibilitam uma passagem rápida pela zona crítica de temperatura. O método de vitrificação é um processo termodinâmico no qual o aumento da viscosidade determina que os fluidos crioprotetores, adquiram propriedades mecânicas de um sólido amorfo semelhante ao vidro, porém mantendo as propriedades do líquido, prevenindo a formação de cristais de gelo. O sucesso da vitrificação está relacionado com a concentração, o tempo de exposição e o volume, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular, sem no entanto produzir lesões osmóticas ou tóxicas. Rall e Fahy, (1985), quando vitrificaram com êxito embriões de rato doméstico (*Mus musculus*) necessitaram de elevadas concentrações de crioprotetores, necessárias para proteger as células dos danos da criopreservação.

Rusiyantono *et al.*, (2000) verificou que o uso de 30% de etilenoglicol como crioprotetor origina melhor resultado que 30% de glicerina, na vitrificação de embriões de cabra. Saha *et al.*, (1996) utilizando 40% de etilenoglicol, 11.3% de tralose e 20% polivinilpirrolidone obteve melhores resultados, quer em número de blastocistos bovinos desenvolvidos, quer em número de blastocistos expandidos.

Vajta *et al.*, (1997) demonstraram que a vitrificação em palhetas estiradas abertas (Open Pulled Straws - OPS) permite a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*, possivelmente por aumentar a velocidade de congelamento durante a criopreservação. A metodologia da vitrificação em palhetas estiradas (OPS) foi adequada para a utilização como método de criopreservação de ovócitos bovinos e embriões. Os ovócitos ou os embriões são colocados no fim de palhetas as quais são colocados diretamente em azoto líquido sem serem seladas, obtendo resultados entre 7 e 13% de blastocistos.

Este método de criopreservação é bastante valioso, porque é simples, rápido e económico, eficaz e relativamente fácil de aplicar em condições de campo. A vitrificação oferece boas condições para a criopreservação de células de forma mais simplificada, porque dispensa o equipamento de controlo das taxas de congelação (congelador programável) e evita a formação de gelo, que poderia ser prejudicial. Segundo Yang e seus colaboradores (1992), a sobrevivência dos ovócitos é influenciada pelo tipo de crioprotetores utilizados e pelos procedimentos de exposição. O problema da vitrificação é a toxicidade causada pela alta concentração dos crioprotetores no meio (Fahy *et al.*, 1984).

As soluções de vitrificação deverão ter três características:

- Devem conter uma grande concentração de vários crioprotetores;
- Devem conter um componente salino fisiológico;
- Um dos componentes deverá ser uma macromolécula que permitirá a vitrificação da solução.

Kasai e colaboradores (1990) usaram uma nova solução de vitrificação: etilenoglicol, Ficoll e sacarose (EFS), para vitrificarem com sucesso mórulas de ratos. Cada um destes componentes tem uma baixa toxicidade e pertencem a diferentes categorias de crioprotetores. O Ficoll é uma macromolécula que tende a estimular a estabilidade da formação de cristais (Fahy *et al.*, 1984), pelo contrário a sacarose tende a reduzir o efeito da toxicidade de permeabilidade do agente promovendo a desidratação dos embriões por osmose (Kasai *et al.*, 1990). A sacarose e outros carboidratos preservam a integridade funcional e estrutural das membranas pela baixa atividade da água (Massip *et al.*, 1987).

As taxas de sobrevivência a diferentes crioprotetores por desenvolvimento *in vitro* mostraram que o etilenoglicol é o menos tóxico, seguido do glicerol, DMSO, propilenoglicol e a acetamida que é muito tóxica (0% de sobrevivência) (Kasai, 1994).

### 2.3 - Fertilização *in vitro*

Em 1960, o cientista Neal First apresentava trabalhos de investigação que estavam direcionados para a morfologia e criopreservação do sêmen, sendo posteriormente continuados com estudos de fertilidade, fisiologia e capacitação do sêmen: processo através do qual o espermatozóide adquire capacidade fecundante de forma a conseguir fertilizar o óvulo. Contudo, as tecnologias da época, não o permitiam testar se, sendo o sêmen tratado de várias maneiras, este conseguiria penetrar o ovócito de bovino. Obter ovócitos que estivessem prontos a ser fertilizados era muito dispendioso; o procedimento requeria cirurgia ou o abate da fêmea dadora.

Em fins da década de 70, Lorraine Leibfried, descobriu uma maneira de estudar os ovócitos em laboratório, a sair do folículo, onde normalmente maturam e se preparam para a fecundação. Foi então criada uma técnica que permitiu a cultura e maturação de ovócitos *in vitro* e os preparava para a fecundação *in vitro* (FIV). Estes protocolos tornaram possível a reutilização de ovócitos dos ovários recolhidos nos matadouros e garantir à indústria da FIV, um económico e ilimitado suplemento de gâmetas femininos, formando uma empresa de fornecimento de ovócitos de bovino e de embriões produzidos *in vitro* a investigadores, produtores e empresas de biotecnologia especializadas em clonagem e transferência de genes.

Faltava então trabalhar na parte masculina da questão, ou seja, criar um método eficaz para a FIV de gâmetas femininos. Em 1983, foi otimizada a interação entre o espermatozóide e o óvulo, usando sêmen retirado do epidídimo de touros abatidos no matadouro e ovócitos maturados *in vitro* obtidos em matadouro, Parrish (1988), descobriu que o mais ativo componente para capacitação do ejaculado de touro era a heparina. Descobriu também que a glucose, um meio bastante utilizado como fonte de energia, evitava a capacitação. O modelo de capacitação de Parrish, então formulado com a heparina, permitiu o desenvolvimento do sistema de FIV, utilizando sêmen

congelado, que dinamizou o processo para aplicações comerciais em gado e, promoveu uma virtual e ilimitada escolha do material genético paternal. Os protocolos de Parrish: a heparina, como indutora da capacitação, os meios sem glucose utilizados em sémen de bovino e o percoll para separar os espermatozóides viáveis dos não viáveis após a descongelação do sémen, são ainda hoje utilizados na maior parte dos laboratórios que, por este mundo fora praticam a FIV em bovinos (Wardle, 1998).

Os protocolos de FIV, juntamente com os modelos de maturação de ovócitos produziram em 1986, o primeiro bezerro através da FIV de ovócitos maturados *in vitro*. Demonstrou-se então que ovócitos imaturos, colocados em cultura em condições que imitavam o desenvolvimento intrafolicular dos ovócitos pré-ovulatórios e os respetivos embriões, produzidos *in vitro* eram capazes de iniciar e manter uma gestação até ao fim.

Após tais descobertas, as atenções foram então viradas para os sistemas de cultura de embriões. Até aqui, havia sido utilizada uma incubadora biológica – ovelha – para fazer crescer os ovócitos fecundados, de uma célula até ao estado de blastocisto – estágio de desenvolvimento em que os embriões podem ser transferidos, não cirurgicamente, para o útero de mãe hospedeira, ou para congelar para posterior transferência. Havia que eliminar a transferência de e para a incubadora biológica. Em 1980, foi criado por Will Eyestone, um sistema de cultura em que os embriões de bovinos eram cultivados em células do epitélio, retiradas da parede dos ovidutos das vacas. Este foi o primeiro método capaz de suportar o desenvolvimento de um embrião bovino, desde uma célula, até ao estágio de blastocisto. Em 1993 foi criado por Charles Rosenkranz, um meio de cultura alternativo – sintético. Este meio, sendo simples, tem uma mistura equilibrada de sais, contendo uma fonte de energia capaz de sustentar o desenvolvimento embrionário desde uma célula a blastocisto. Hoje em dia 75% das FIV's usam, tanto este meio sintético, como o protocolo de co-cultura de Eyestone (Cooney, 1998).

Numa só década, os cientistas desenvolveram e aperfeiçoaram as tecnologias necessárias para lançar a indústria de FIV bovina e desenvolveram as técnicas de cultura necessárias à clonagem de embriões bovinos. As tecnologias de FIV são especialmente importantes para as companhias que tentam expandir o número de descendência derivada de progenitores de elite.

As tecnologias de FIV, proporcionam também maneira de produzir carne (entenda-se como raças de carne), sem necessidade de fêmeas reprodutoras, ou seja, os embriões são produzidos *in vitro* podem ser sexados e transferidos para novilhas. Os maiores custos para a produção de carne – a manutenção de uma manada de vacas reprodutoras – podem ser largamente evitados, implantando embriões femininos em vacas de engorda.

Hoje em dia, as empresas que produzem em massa, embriões *in vitro* a partir de ovócitos recolhidos em matadouro, estão espalhadas por todo o mundo.

## **Objetivos da FIV**

A utilização de embriões, junto com a inseminação artificial e os programas de melhoramento genético, têm vindo a difundir-se de forma crescente nos últimos 20 anos. Contudo, esta tecnologia que tem um enorme potencial de melhoramento genético, não tem tido difusão massiva que lhe é devida em função das suas potencialidades. As limitações têm sido tanto os elevados custos, como a enorme variabilidade de resposta dos animais destinados a produzir tais embriões. Isto parece marcar os limites económicos e biológicos a esta tecnologia que ainda não os conseguiu superar e que tem limitado o seu desenvolvimento nestes 20 anos.

O objetivo primordial da FIV é pôr à disposição do sistema produtivo, todas as possibilidades de utilização dos embriões produzidos mediante este inovador sistema de produção. As possibilidades são:

- Produção de gémeos
- Recuperação de animais de elevado valor genético
- Produção de embriões a partir de animais vivos
- Produção de embriões sexados.

Além destes objetivos, a técnica de FIV tem também objetivos de carácter experimental e de investigação. É através desta técnica que se fazem estudos sobre a qualidade do sémen, do efeito de fatores tanto externos como internos à vaca, na produção de ovócitos e fecundidade dos mesmos, função de hormonas.

## **2.4 - Recolha de ovócitos**

A recolha dos ovócitos é o primeiro passo para a produção de embriões *in vitro*.

Os ovócitos podem ser recolhidos através de métodos cirúrgicos ou não cirúrgicos.

Ovócitos de dadoras com um mês de idade são apropriados para a fertilização *in vitro*, mas produzem um número significativamente mais baixo de blastocistos do que ovócitos provenientes de dadoras adultas (Levesque e Sirande, 1994; Revel *et al.*, 1995). Dadoras pré-pubescentes produzem um grande número de ovócitos por ovário (Thonon *et al.*, 1993) e animais com idade inferior a três anos produzem ovócitos com maior capacidade de desenvolvimento do que vacas mais velhas (Mermillod *et al.*, 1992). A fase do ciclo sexual, bem como dadores gestantes, aparentemente não afeta a qualidade dos ovócitos nem o número de folículos presentes (Tan e Lu, 1990; Vajta *et al.*, 1992). No entanto a genética, a raça, a idade, a condição corporal podem influenciar o número de folículos e a qualidade dos ovócitos (Domingues, 1995).

A recolha pode ser realizada a partir de ovários recolhidos no matadouro de vacas mortas, dadoras mortas ou de animais vivos, dadoras vivas.

## **Dadoras Mortas**

Os ovócitos são obtidos de ovários de qualquer fêmea no matadouro, os quais constituem o material ideal para a aplicação de técnicas de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* (Guerin *et al.*, 1996).

Os ovócitos podem ficar numa solução salina tépida durante algumas horas depois do abate, sem que isso afete a qualidade dos ovócitos (Guerin *et al.*, 1996). Os ovários são transportados para o laboratório sendo o conteúdo dos folículos aspirado (Figura 1). Os ovócitos que provêm de folículos com tamanho superior a 6 mm têm mais capacidade de se desenvolverem em embriões transferíveis depois da fertilização (Barnes *et al.*, 1993; Lonergan *et al.*, 1994), que os ovócitos vindos de pequenos folículos, os quais são mais frequentemente usados no período precoce da fecundação *in vitro* (Staigmiller, 1988), ou seja, na maturação.



**Figura 1:** Recolha de ovócitos em ovário de dadora morta. (1)

## **Dadoras Vivas**

Neste caso, as dadoras deverão ser animais de alto valor genético dentro de programas de seleção intensiva ou vitelas inférteis, vacas que não respondem ao tratamento de superovulação (Lazzari e Galli, 1996), bem como outro tipo de vacas, e podendo fazer-se a recolha dos ovócitos de forma repetitiva (Guerin *et al.*, 1996), uma a duas vezes por semana obtendo-se uma média de um embrião por sessão (Hasler *et al.*, 1995).

As primeiras recolhas de ovócitos *in vivo* foram realizadas por laparoscopia (Sirard e Lambert, 1985). No princípio dos anos 90 surgiu a técnica de punção transvaginal guiada por um ecógrafo (Kruio *et al.*, 1995).

A punção transvaginal (Figura 2) é uma técnica relativamente simples de aplicação mas que necessita de um ecógrafo de boa definição, equipado com uma sonda adaptada para a punção. As sondas utilizadas são de modo geral sondas vaginais previstas para a recolha de ovócitos na mulher, adaptadas para usar na vaca.

A sonda é inserida dentro de um revestimento de prolongação e equipada de agulhas muito longas (30cm). A fêmea é submetida a uma anestesia epidural. A sonda é introduzida na vagina e o ovário é seguro por via retal. O ovário é encostado na face da sonda, sendo os folículos visíveis no monitor e puncionados pela agulha que atravessa a parede vaginal, sendo seguidamente aspirado o conteúdo folicular (Guerin *et al.*, 1996).

Esta técnica não necessita de preparação hormonal da dadora, permitindo também a repetição de recolhas com frequência elevada, podendo vir a ser concorrencial em relação à técnica de produção de embriões por superovulação, inseminação e recolha (Guerin *et al.*, 1996).



Figura 2: Recolha de ovócitos em ovário de dadora viva. (2)

## 2.5 - Maturação dos ovócitos

Durante a vida fetal, uma reserva de folículos primordiais é estabelecida no ovário bovino. Cada um destes folículos consiste num ovócito, o qual se detém na prófase I da meiose constituído por uma única camada de células da granulosa (Fortune, 1994). Em muitas espécies mamíferas, algumas horas antes da rutura do folículo observa-se a continuação da meiose do ovócito, desde a prófase da primeira divisão meiótica até à metáfase da segunda divisão. Este complexo processo biológico, o qual transforma o ovócito primário num ovulo fertilizável, é conhecido por maturação do ovócito (McGaughey, 1983; Thibault *et al.*, 1987; Tornell *et al.*, 1991). O promotor que dá início às meioses *in vivo* é a LH, sendo esta a gonadotrofina mais importante para induzir a maturação dos ovócitos e posterior ovulação.

Pincus e Enzman (1935) foram os primeiros a fazer estudos da maturação *in vitro* de ovócitos de mamíferos, observando meioses contínuas espontâneas em ovócitos de coelha.

No caso dos bovinos em cada ovulação apenas um folículo é dominante. A ovulação está sujeita a diferentes acontecimentos, que dependem de sinais, tais como o aumento da FSH e do estradiol durante o desenvolvimento folicular, da LH imediatamente antes da ovulação e diminuindo a progesterona, a qual é segregada pelas células luteinizantes da granulosa depois de a LH surgir. Outros fatores envolvidos são péptidos, fatores de crescimento tipo insulina-I (IGF-I) os quais exercem efeitos no crescimento e maturação do ovócito (Van e de Kruif, 1996).

A principal função do IGF-I parece ser a de ampliar as ações de outras hormonas e, na presença de gonadotrofinas ou no líquido folicular do folículo pré-ovulatório, os efeitos de diferenciação do IGF-I são ampliados. Os folículos dominantes adquirem autonomia criando mecanismos para ampliar os sinais da LH e FSH. O IGF-I em altas concentrações parece ser capaz de: (Pinto de Andrade, 1995).

- Aumentar a diferenciação e a proliferação das células da granulosa;
- Estimular a biossíntese da progesterona e da oxitocina;
- Induzir a formação de recetores para a LH nas células da granulosa.

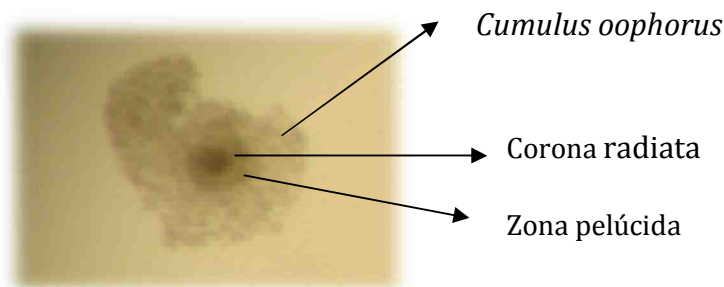
*In vivo* apenas um ovócito maduro por ciclo é selecionado de uma dadora adulta cíclica de um folículo dominante, necessitando de dois ciclos sexuais até chegar a folículo dominante. *In vitro* a seleção dos ovócitos é feita de todo o tipo de dadoras (bezerras, novilhas, adultas acíclicas, adultas cíclicas e de dadoras gestantes), de folículos primordiais a folículos dominantes ou não dominantes, sendo a maturação feita em 24 horas e obtendo-se uma população heterogénea de ovócitos (Van Soom e de Kruif, A. 1996).

*In vivo* o pico de LH é o sinal para o crescimento completo do ovócito o qual reside no folículo dominante, para completar a primeira divisão meiótica. O ovócito não possui nenhuns recetores para a LH, a indução da maturação deve ser feita por meio das células do *cumulus oophorus* (Van Soom e de Kruif, A. 1996).

Estudos feitos por Peynot *et al.*, (1996), demonstraram que ovócitos imaturos de bovinos foram individualmente maturados, fecundados e desenvolvidos *in vitro*, não apresentaram diferenças significativas nas taxas de fertilização, clivagem e mesmo de blastocistos obtidos, quando comparados com ovócitos que coletivamente foram maturados, fecundados e desenvolvidos nas mesmas condições.

Os ovócitos morfológicamente perfeitos e com maior número de células à sua volta (*cumulus*) são os que têm maior capacidade de se desenvolverem depois de serem recolhidos de dadoras bovinas vivas (Palma *et al.*, 1996), aplicando-se este mesmo princípio aos ovócitos recolhidos de dadoras mortas.

Um ovócito (Figura 3) é rodeado por uma camada de *cumulus*, composta por três subcamadas, que são:



**Figura 3:** Ovócito, constituído pelo *Cumulus oophorus*, corona radiata e zona pelúcida.

O COC (*cumulus-oocyte-complex*), é composto pelo oócito rodeado com as camadas de *cumulus*, sendo o ooplasma o conteúdo citoplasmático do ovócito.

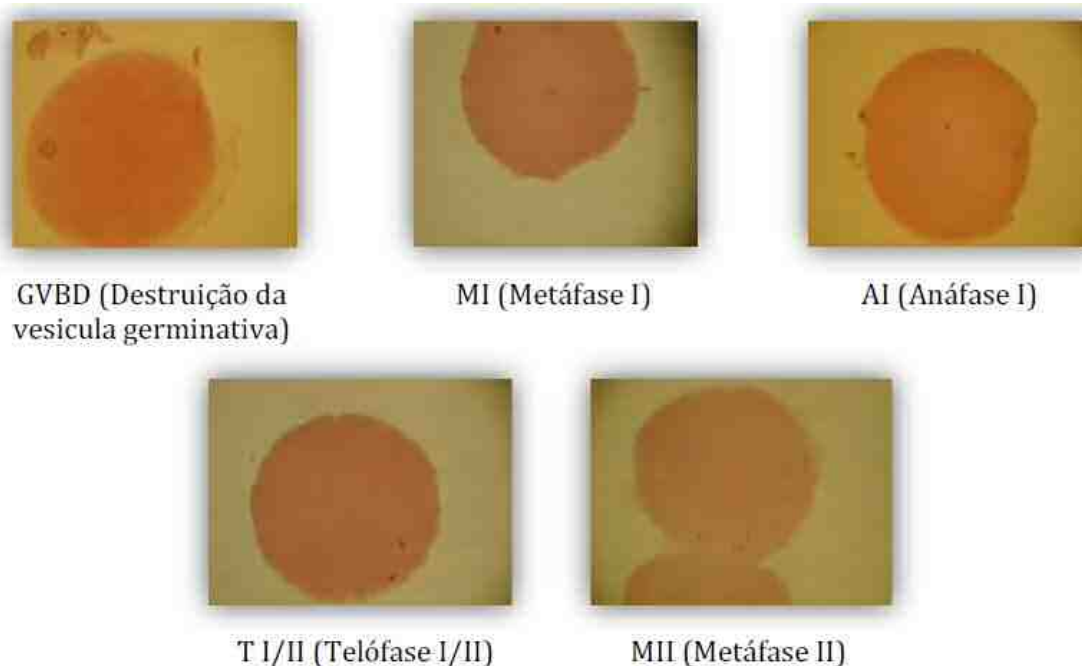
A importância do COC intacto, foi reconhecida desde a primeira fertilização *in vitro* em bovinos (Leibfried e First, 1979) devido às células do *cumulus* serem necessárias para o transporte de nutrientes e de impulsos para dentro e fora dos ovócitos (Moor e Seemark, 1986), funcionando como ligação entre o ovócito e o meio que o rodeia.

A LH é um dos fatores chave envolvidos na maturação dos ovócitos, tendo provavelmente um efeito mediador através das células do *cumulus*, a qual pode atuar para incrementar disponibilidade de ATP para as necessidades energéticas dos ovócitos (Brackett e Zuelke, 1993).

A presença de um intacto complexo de células que rodeiam o ovócito imaturo, bem como uma aparente homogeneidade do seu ooplasma é um dos melhores indicadores para o sucesso da sua maturação e do desenvolvimento embrionário (Leibfried e First, 1979; Brackett e Zuelke, 1993).

Os ovócitos apresentam-se como grandes células de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Durante as fases de crescimento, os ovócitos sofrem toda uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e membranares as quais terminam com a formação de um ovócito maduro apto a ser fecundado (Ectors, 1995).

Durante a maturação nuclear o núcleo migra do centro para a periferia, a membrana nuclear desaparece e depois da formação do fuso a membrana citoplasmática diferencia-se da zona pelúcida (zp) (figura 4). A metáfase, a anáfase e a telófase da primeira divisão meiótica sucedem-se rapidamente para se obter a emissão do primeiro glóbulo polar. Seguidamente, junto à membrana plasmática os cromossomas organizam-se em metáfase para a segunda divisão da meiose (Ectors, 1995).



**Figura 4:** Diferentes fases da maturação nuclear.

Uma maturação citoplasmática adequada está relacionada com a habilidade do ovócito para formar pronúcleos masculinos depois da penetração pelo espermatozóide e com capacidade para se desenvolver num estado embrionário avançado (Van e de Kruif, 1996).

O meio mais eficiente e extensamente usado para a maturação *in vitro* é o TCM 199 (Meio de Cultura de Tecidos) com bicarbonato ou HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) e suplementado com diversos soros sanguíneos (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1989; Brackett e Zuelke, 1993). Um simples soro sanguíneo livre no meio de maturação, suplementado com glutamina e glucose suportam o desenvolvimento dos ovócitos de bovino *in vitro* com a mesma capacidade que o meio TCM 199 (Rose-Hellekant e Bavister, 1995).

A adição de hormonas como a FSH, LH e estradiol no meio de maturação *in vitro* providencia um efeito benéfico na fertilização e desenvolvimento embrionário (Brackett *et al.*, 1989; Younis *et al.*, 1989; Zuelke e Brackett, 1990).

De todos os soros usados na maturação *in vitro* de ovócitos o melhor é o soro de vaca em cio visto que pelo seu uso têm-se obtido melhores resultados (Younis *et al.*, 1989).

O desenvolvimento normal do futuro embrião está dependente de uma normal maturação citoplasmática, devendo o embrião encontrar todos os elementos necessários às primeiras etapas do seu desenvolvimento no citoplasma ovocitário (Ectors, 1995).

### 2.5.1 - Critérios de avaliação da maturação dos ovócitos

A morfologia ideal, descrita microscopicamente para um ovócito maturado, refere um ooplasma uniformemente granulado, um pequeno espaço pré-vitelino e as células do *cumulus oophorus* totalmente expandidas, sem sinais de degenerescência (Schellander *et al.*,1990).

Antes de alcançar esta morfologia, o ovócito sofre uma sequência de estados, tanto a nível do núcleo, como a nível citoplasmático, descritos por Hytell *et al.*, (1997).

O conhecimento das alterações das células do *cumulus oophorus* é também importante para a compreensão dos mecanismos de maturação.

Segundo Palma *et al.*, (1996) Ovócitos morfologicamente perfeitos e com grande número de células do *cumulus* à sua volta, são os que têm maior capacidade de se desenvolver, depois de serem recolhidos em dadoras vivas, aplicando-se este mesmo princípio aos ovócitos recolhidos de dadoras mortas.

Os sistemas de classificação dos ovócitos são de considerável importância no processo de produção de embriões *in vitro*, como base de seleção para a sua passagem à fase de maturação. Dada a importância das células do *cumulus oophorus* nos processos de maturação e fertilização, a classificação baseia-se na visualização morfológica, não só da homogeneidade e transparência do ovócito, como da compactação e transparência das referidas células.

A classificação dos ovócitos tem em conta critérios estruturais, morfológicos e de viabilidade, como exemplo a cor, escurece à medida que diminui a qualidade; o tamanho, o diâmetro exterior da zona pelúcida que aumenta com o aumento do nível de atresia (Wit *et al.*, 2000), a integridade da zona pelúcida; o grau de expansão do *cumulus*; a homogeneidade do ooplasma.

Vários sistemas de classificação têm sido propostos pelos diversos autores, que dividem os complexos *cumulus oophorus* em várias classes, susceptíveis ou não de serem selecionados.

De acordo com De Loos *et al* (1989), os COC podem ser classificados em quatro classes (Quadro 1) por ordem decrescente de qualidade.

**Quadro 1:** Classificação dos COC segundo De Loos *et al.*, (1989).

<b>Classe - I</b>	<b>Classe - II</b>	<b>Classe - III</b>	<b>Classe - IV</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revestimento do <i>cumulus</i> compacta em várias camadas</li> <li>- Ooplasma homogéneo</li> <li>- COC claro e transparente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revestimento do <i>cumulus</i> compacta em várias camadas</li> <li>- Ooplasma homogéneo, mas com aspeto grosseiro e mais escuro na periferia do ovócito</li> <li>- COC ligeiramente mais escuro e menos transparente do que o de classe-I</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revestimento do <i>cumulus</i> é menos compacto que dos anteriores</li> <li>- Ooplasma irregular com aglomerados mais escuros</li> <li>- COC mais escuro do que as classes anteriores</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Revestimento do <i>cumulus</i> expandido</li> <li>- Células do <i>cumulus</i> dispersas em aglomerados escuros numa matriz gelatinosa</li> <li>- Ooplasma irregular com aglomerados mais escuros</li> <li>- COC escuro e irregular</li> </ul>

Outro exemplo de classificação foi sugerido por Wurth *et al.*, (1992), onde classifica os ovócitos em 4 classes, (Quadro 2).

**Quadro 2:** Classificação dos ovócitos segundo Wurth *et al.*, (1992).

<b>COC - A</b>	<b>COC - B</b>	<b>COC - C</b>	<b>COC - D</b>
Ovócito com <i>cumulus</i> brilhante e expandido	Ovócito com <i>cumulus</i> expandido mas com menos células e mais escuras que o anterior	Ovócito com <i>cumulus</i> exageradamente expandido com células degeneradas, formando aglomerados mais escuros	Ovócito desnudado, com zona pelúcida exposta

## 2.6 - Estrutura dos embriões

Um embrião é constituído por uma zona pelúcida que consiste na parede celular que protege o embrião de patologias desde ainda a sua fase de ovócito pré-ovulatório até à sua eclosão. Aquando da fecundação é à zona pelúcida que o espermatozoide se une (Betteridge, 1995). Esta zona pelúcida é composta por glicoproteínas que têm como papel fundamental serem recetoras para os espermatozoides na altura da fecundação (Betteridge, 1995). Apesar da função de proteção a zona pelúcida possui uma certa permeabilidade a moléculas de baixo peso molecular assim como nutrientes e alguns compostos farmacologicamente ativos, sendo impermeáveis a macromoléculas como as enzimas, anticorpos e outras proteínas (Austin e Lovelock, 1958). No desenvolvimento embrionário, as células embrionárias passam de um estado totipotente enquanto o embrião se encontra no estado de mórula, a um estado de pluripotente aquando da passagem a jovem blastocisto, blastocisto e blastocisto expandido/eclodido. Nesta fase de desenvolvimento embrionário, o blastocélio faz também parte da estrutura do embrião e consiste na cavidade do embrião formada no interior do trofoblasto, enquanto o botão embrionário consiste num aglomerado de células as quais dão origem ao indivíduo. Posteriormente, o trofoblasto dá origem aos anexos embrionários. Estas células produzem proteínas de reconhecimento materno da gestação (PAG's - Proteínas Associadas à Gestação), o que faz com que uma fêmea gestante não entre em cio, porque estas proteínas bloqueiam a atividade do hipotálamo, para que este não produza GnRH (Moreira da Silva, 2001).



**Figura 5:** Embrião fecundado *in vitro*.

### 2.6.1 - Critérios da avaliação dos embriões

Os embriões podem ser classificados de duas formas, quanto à estrutura que apresentam ou quanto a sua qualidade e diferentes classificações surgem de diferentes autores.

Quanto à sua estrutura, Mahmoudzadeh (1994) sugere a seguinte classificação (Quadro 3):

**Quadro 3:** Caracterização da fase de desenvolvimento dos embriões segundo Mahmoudzadeh, (1994).

<b>Embrião de 2 a 8 células</b>	A primeira clivagem (2 células) tem lugar 24h depois da ovulação. Dois a três dias após a fecundação, o embrião atinge o estado de 8 células.
<b>Mórula precoce</b>	Forma-se 3 a 5 dias após a fecundação, existindo na sua massa celular 16 a 32 blastómeros.
<b>Mórula compacta</b>	Esta pode ser encontrada 4 a 6 dias depois da fecundação, contendo a massa celular cerca de 32 a 64 blastómeros. A presença de um grande número de blastómeros no mesmo volume de embrião faz com que este se compacte.
<b>Jovem blastocisto</b>	Os blastómeros segregam um fluido o qual forma uma cavidade ou blastocelo. Isto é visível cerca do dia 6 a 7 depois da fecundação. O embrião ocupa cerca de 70 a 80% do espaço perivitelínico.
<b>Blastocisto</b>	O blastocisto é formado aos 6 a 8 dias depois da fecundação. O blastocelo expande-se e os blastómeros são puxados para um lado do embrião, formando uma massa celular interna. A colocação externa das células à volta do embrião é chamada trofoblasto. O embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelínico.
<b>Blastocisto expandido</b>	A expansão do blastocisto ocorre dos 7 a 9 dias depois da fecundação. O diâmetro médio do embrião aumenta e a zona pelúcida fica mais fina. Por vezes o blastocelo contrai-se como consequência de fluidos prejudiciais mas a zona pelúcida continua fina.
<b>Blastocisto eclodido</b>	Este forma-se dos 8 a 10 dias após a fecundação. Por causa da sobre expansão do embrião, a zona pelúcida rompe-se e o embrião fica rodeado só pela camada trofoblástica. O blastocisto eclodido permanece esférico até ao 12º dia quando começa o alongamento.

A qualificação dos embriões é essencialmente uma distinção objetiva das diferenças morfológicas entre embriões. Há que reconhecer que a avaliação dos embriões é uma tributação subjetiva no sistema biológico e não uma ciência exata.

Devido a isto, existem varias classificações de embriões, de diversos autores como Eldson *et al.* (1978), para embriões *in vivo* recolhidos entre o 5º e o 9º dia e também uma classificação segundo Lindner e Wrigt (1983).

Em 1980, o INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) propôs uma serie de elementos de apreciação do aspeto morfológico do embrião:

- Zona pelúcida: esférica e espessa.
- Blastocisto: forma geral, regularidade, opacidade e estrutura visível (trofoblasto, massa celular interna e blastocelo).
- Células: aspeto dos contornos celulares, variação do tamanho entre células, células separadas no espaço perivitelíneo e integridade das células (presença de vacúolos, dispersão do material celular e granulações na periferia).

O *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões* (1998), apresenta a seguinte classificação (Quadro 4):

**Quadro 4:** Caracterização da fase de desenvolvimento dos embriões segundo o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, (1998).

<b>Excelente ou Bom</b>	A massa do embrião é esférica e simétrica, com blastómeros individualizados de tamanho, cor e densidade uniforme. O embrião está coerente com a sua fase de desenvolvimento. As irregularidades devem ser insignificantes e, pelo menos, 85% do material celular do embrião deve estar intacto. Esta classificação deve ser baseada na percentagem de células embrionárias representadas pelo material projetado no espaço perivitelíneo. A zona pelúcida deve ser uniforme, não devendo possuir concavidades ou partes achatadas que possam fazer com que o embrião adira à placa de Petri ou à palhinha.
<b>Médio</b>	Irregularidades moderadas na globalidade da massa celular, cor ou densidade de cada blastómero. Pelo menos 50% do material celular deve apresentar uma massa embrionária intacta e viável.
<b>Medíocre</b>	Grandes irregularidades na forma da massa embrionária, no tamanho, cor ou densidade de cada blastómero. Pelo menos, 25% do material celular deve apresentar uma massa embrionária intacta e viável.
<b>Morto ou Degenerado</b>	Embriões degenerados (não viáveis).

No entanto podem encontrar-se zigotos, onde a zona pelúcida contínua esférica, sendo a massa celular representada por uma única e grande célula.

Existe uma boa relação entre o aspeto morfológico dos embriões e o seu desenvolvimento após a transferência, no entanto este critério é subjetivo, pois por vezes embriões classificados como médios ou pobres desenvolvem-se normalmente enquanto embriões classificados como excelentes não dão nenhuma gestação depois de transferidos (Shea, 1981).

### 3- Materiais e Métodos

#### 3.1 - Delineamento experimental

Neste trabalho que consiste na avaliação da ação do crioprotetor Ficol na toxicidade e capacidade de desenvolvimento de COCs bovinos após a descongelção, foram utilizados um total de 134 ovários recolhidos em Matadouro IAMA (Instituto da Alimentação e Mercados Agrícolas) da Ilha Terceira. Destes, foram puncionados 1245 COCs, classificados como classe A e B de acordo com a classificação sugerida por Santos *et al.*, (2007), foram divididos em dois grupos:

Grupo 1 - Avaliação da toxicidade dos crioprotetores (691 COCs);

Grupo 2 - Avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV dos COCs (554 COCs)

No grupo 1, em que se avaliou a toxicidade dos crioprotetores usados na vitrificação, os 691 COCs foram divididos em três grupos denominados por grupo 1a) grupo de controlo em que os COCs não foram submetidos a qualquer tipo de criopreservação, deixando decorrer o seu processo rotineiro de maturação. Os COCs pertencentes aos outros dois grupos, grupo 1b) foram vitrificados, utilizando como crioprotetor DMSO e DMSO conjuntamente com o Ficol no grupo 1c). Nestes dois grupos antes da vitrificação os COCs foram sujeitos aos meios de equilíbrio.

Grupo 1a) - Controlo ou Fresco (n=213)

Grupo 1b) - Crioprotetor DMSO (n=258)

Grupo 1c) - Crioprotetor DMSO + Ficol (n=220)

No grupo 1a) representado esquematicamente na figura 6, os COCs não foram sujeitos a qualquer tipo de criopreservação, sendo colocados, após punção, no meio de lavagem e depois no meio de maturação por um período de 24 horas e observada a expansão das células do cumulus.

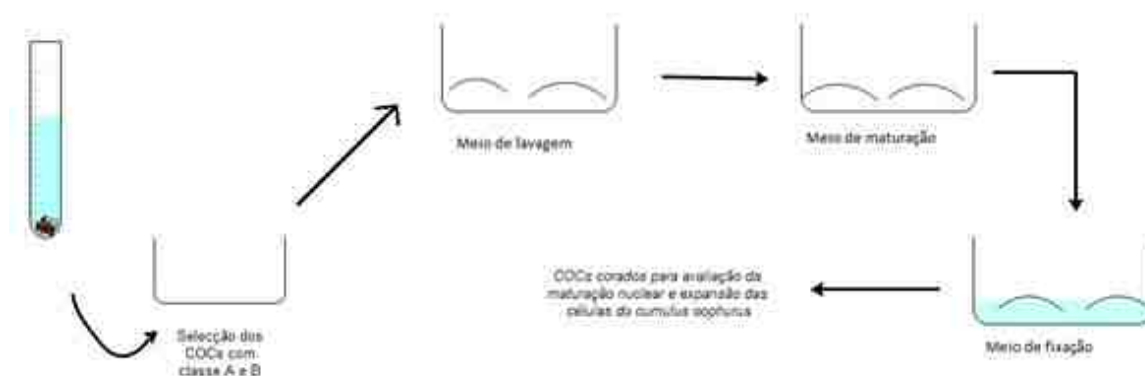


Figura 6: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo controlo.

Nos grupos 1b) representado esquematicamente na figura 7, imediatamente após a recolha e triagem, os COCs foram submetidos a um meio de equilíbrio, composto por TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado de 1 M de etilenoglicol (EG), 1 M de Dimetilsulfóxido (DMSO), 20% FCS, 10 µl/ml de Gentamicina, durante 5 minutos, passando depois para o meio de vitrificação, no grupo 1c) esquematizado na figura 8, foi adicionado ao meio de equilíbrio 7,5% de Ficol, passando depois para o meio de vitrificação.

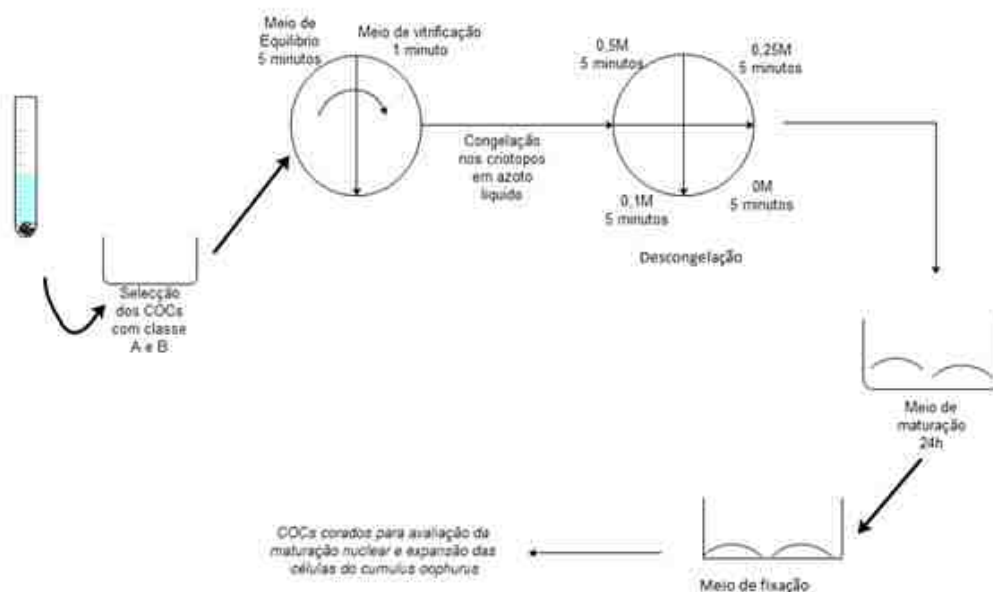


Figura 7: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo DMSO.

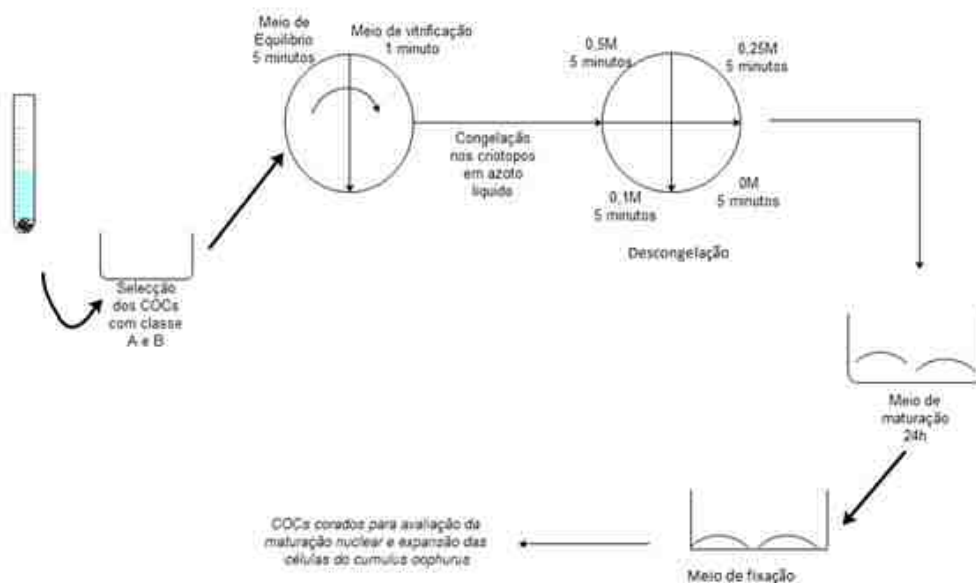


Figura 8: Representação esquemática do processo de avaliação da toxicidade no grupo DMSO+Ficol.

O meio de vitrificação dos COCs pertencentes ao grupo 1b) era constituído por TCM - 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado 7,2 M EG (etilenoglicol), 2 M DMSO (Dimetilsulfóxido), 0,5 M Sacarose, 20% FCS, 10 µl/ml de Gentamicina. O meio de vitrificação pertencente ao grupo 1c) era composto por TCM - 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado 2M EG (etilenoglicol), 2 M DMSO (Dimetilsulfóxido), 0,5 M Sacarose, 20% FCS, 10 µl/ml de Gentamicina e 15% de Ficol.

Os COCs estiveram neste meio cerca de 1 minuto, sendo colocados em criotopos, e mergulhados de imediato em azoto líquido. Aquando da descongelação os COCs foram sujeitos a diferentes concentrações de sacarose (0,5M, 0,25M, 0,1M e 0M) durante 5 minutos cada. Posteriormente foram colocados em meio de lavagem e depois em meio de maturação por um período de 24 horas, fixados e corados para avaliação da taxa de maturação nuclear e de expansão das células do *cumulus oophorus*.

No grupo 2, imediatamente após a punção e triagem, os COCs foram separados em três grupos (2a, 2b e 2c):

Grupo 2a) - Controlo ou Fresco (n = 176)

Grupo 2b) - Crioprotetor DMSO (n = 168)

Grupo 2c) - Crioprotetor DMSO + Ficol (n = 210)

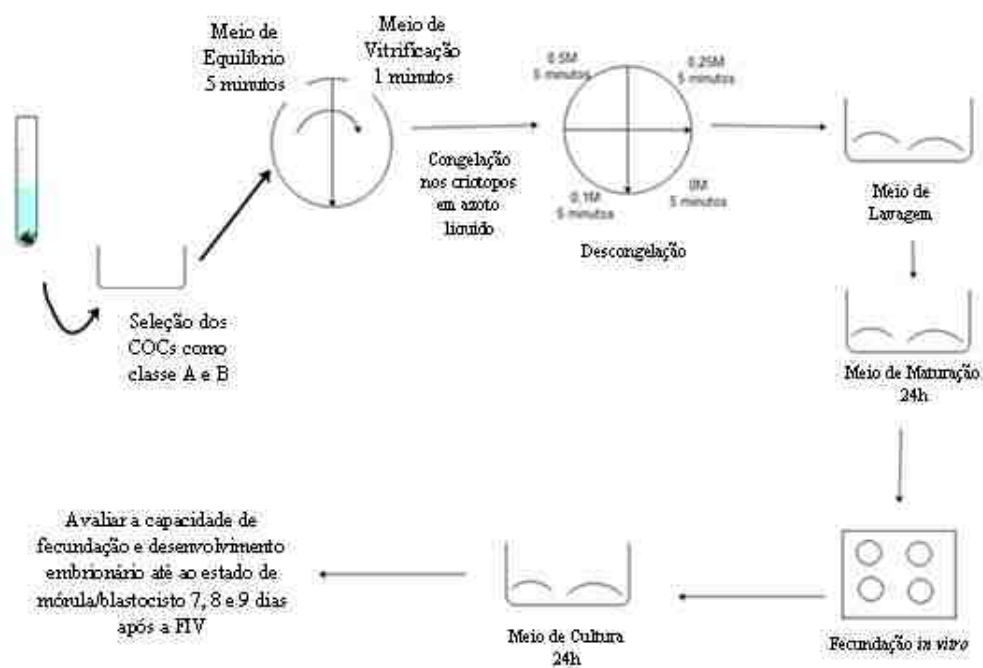
No grupo 2a), após a punção e triagem, os COCs foram colocados em meio de lavagem e depois em meio de maturação por um período de 24 horas, sendo posteriormente fecundados *in vitro*, e avaliada a sua capacidade de fecundação e de desenvolvimento até ao estado de mórula/blastocisto, 7, 8 e 9 dias após a FIV (Figura 9).



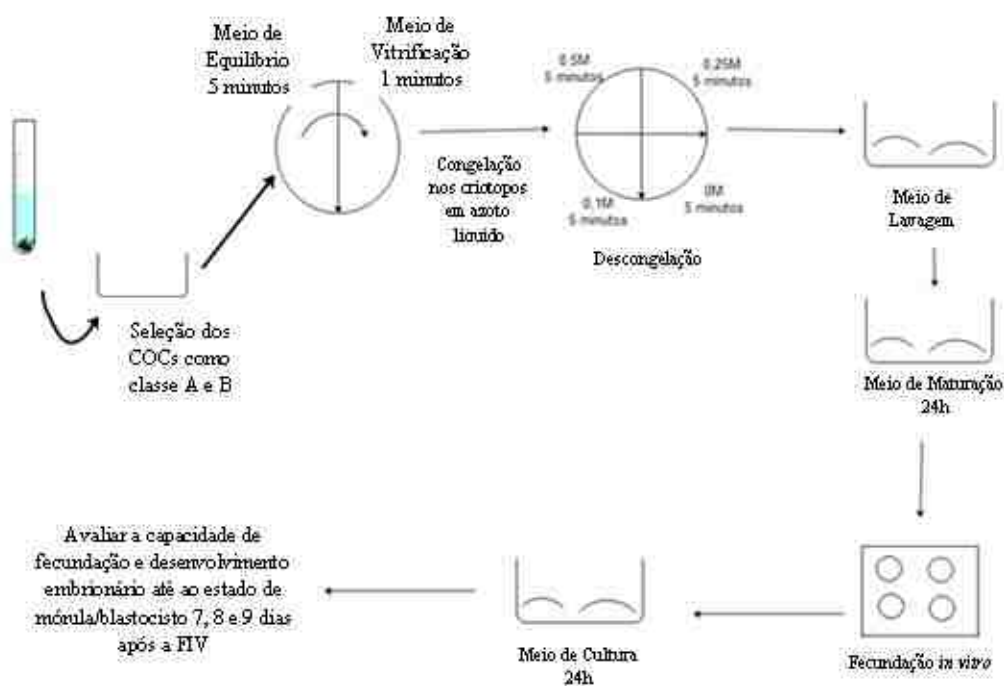
**Figura 9:** Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo controlo.

Nos grupos 2b) e 2c) os COCs foram colocados em meio de equilíbrio durante 5 minutos, passando para o meio de vitrificação durante 1 minuto, colocados em criotopos, e mergulhados de imediato em azoto líquido, tal como referido anteriormente. Na descongelação os COCs foram submetidos a quatro sequências de meios de descongelação com diferentes concentrações de sacarose (0,5M, 0,25M,

0,1M e 0M) durante 5 minutos cada. Depois foram colocados em meio de maturação por um período de 24 horas, fecundados *in vitro*, colocados em meio de cultura durante 24h e por fim avaliada a sua capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário até ao estado de mórula/blastocisto, 7, 8 e 9 dias após a FIV (Figura 10 e figura 11).



**Figura 10:** Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo DMSO.



**Figura 11:** Representação esquemática do processo de avaliação da capacidade de desenvolvimento embrionário após vitrificação e FIV no grupo DMSO+Ficol.

## **3.2 - Composição e elaboração dos meios**

A composição e elaboração dos meios de maturação, vitrificação, fertilização dos ovócitos bem como o meio de desenvolvimento/ cultura dos embriões foram com base nos protocolos referenciados por Faheem *et al.*,2011.

### **3.2.1 - Meios de vitrificação dos ovócitos**

Para esta fase do trabalho foram utilizados dois meios diferentes:

1 - Meio de equilíbrio constituído por TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado de 7,5% EG (etilenoglicol), 7,5% DMSO (Dimetilsulfóxido), 20% FCS, 10 µl/ml de Gentamicina e 7,5% de Ficol.

2 - Meio de vitrificação constituído por TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado de 15% EG (etilenoglicol), 15% DMSO (Dimetilsulfóxido), 0,5 M Sacarose, 20% FCS, 10 µl/ml de Gentamicina e 15% de Ficol.

Os meios foram filtrados com um filtro de 0.22 µm e conservados na incubadora no mínimo 2h antes da sua utilização (Faheem *et al.*,2011).

### **3.2.2 - Meios de maturação dos ovócitos**

Para a maturação dos ovócitos foram necessários dois meios diferentes:

1 - Meio de lavagem, constituído por TCM – 199 + Hepes (Sigma M 2520) onde foi adicionado 2% de FCS (soro fetal bovino), 0,3mg/ml Glutamina e 50 µg/ml Gentamicina.

2 - Meio de maturação, constituído por TCM – 199 + Hepes (Sigma M 2520) onde foi adicionado 10% de FCS (Soro fetal bovino) 0,02IU/ml de FSH, 1 µg/ml de E<sub>2</sub>, 0.15mg/ml Glutamina, 22 µg/ml Na-piruvato e 50 µg/ml Gentamicina.

Os meios foram filtrados com um filtro de 0.22 µm e conservados na incubadora no mínimo 2h antes da sua utilização (Faheem *et al.*,2011).

### **3.2.3 - Meio de fertilização dos ovócitos**

Na fertilização dos ovócitos foram usados três meios. Estes meios são designados de TALP (Faheem *et al.*,2011), porque derivam do meio de Tiroide adicionado de Albumina, Lactato e Piruvato. O meio IVF-TALP foi utilizado na fecundação dos ovócitos propriamente ditos, enquanto o SP-TALP (esperma-TALP) foi utilizado na lavagem dos espermatozoides e por último o H-TALP (meio com Hepes) na lavagem dos ovócitos antes da fecundação.

Inicialmente são preparados os meios TALP de base para a IVF, preparando um stock que tem validade de 3 semanas, quando armazenados a 4°C. Estes meios TALP de base são constituídos por:

**Quadro 5:** Composição dos meios TALP de base para a IVF.

	<b>SP-TL</b>	<b>HEPES-TL</b>	<b>IVF-TL</b>
Água (ml)	40.5 ml	30	40.157
NaCl (ml)	2.220 ml	1.700 ml	2.5 ml
KCl (ml)	1.0 ml	677 µl	1.0 ml
NaHCO <sub>3</sub> (ml)	5.110 ml	270 µl	5.0 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)	511 µl	340 µl	500 µl
Ca cloreto (ml)	511 µl	340 µl	500 µl
Mg cloreto (ml)	562 µl	170 µl	250 µl
HEPES (ml)	511 µl	340 µl	-----
Na-lactato	188 µl	63 µl	93 µl
pH	7,4	7,3	7,4
Osmolaridade	295-305	275-285	290-300

Por último serão preparados os meios TALP intermediários para a IVF, constituídos por:

**Quadro 6:** Composição dos meios TALP intermédios para a IVF.

	<b>SP-TALP</b>	<b>HEPES-TALP</b>	<b>IVF-TALP</b>
TL (ml)	10 ml	5 ml	10 ml
BSA, Fator V (g)	0.063 g	0.015 g	-----
BSA, EFAF (g)	-----	-----	0.06 g
Na-piruvato (µl)	53 µl	5 µl	10 µl
Gentamicina (µl)	10 µl	5 µl	10 µl
Heparina (µl)	-----	-----	50 µl

Os meios foram filtrados com um filtro de 0.22 µm e conservados na incubadora no mínimo 2 h antes da sua utilização.

### 3.2.4 - Meios de desenvolvimento / cultura dos embriões

O meio de cultura para o desenvolvimento dos embriões foi constituído por TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado de 100 µl/ml de aminoácidos não essenciais (100x) (Sigma M7145), 200 µl/ml aminoácidos essenciais (50x) (Sigma B6766), 22 µg/ml sódio-piruvato, 0,03g BSA (Bovine serum albumim) (Sigma A9647) e 10 µl/ml de Gentamicina (Sigma G3632) (Faheem *et al.*,2011).

### 3.2.5 - Coloração dos ovócitos

Para avaliação do desenvolvimento meiótico, os ovócitos foram corados com uma solução de aceto orceína sendo previamente fixados numa solução de fixação composta por etanol e ácido acético glacial (3:1) durante 24 horas, e visualização da morfologia nuclear num microscópio de contraste de fase (100 x) (Faheem *et al.*,2011).

## 3.3 - Maturação dos COCs

### 3.3.1 - Recolha dos ovários

Os ovários foram recolhidos no matadouro do IAMA-Ilha Terceira independentemente do ciclo sexual, gestação e do estado hormonal da fêmea. Imediatamente após o abate das vacas, os ovários foram dissecados e mergulhados diretamente numa solução tamponizada salina contendo fosfato (PBS) (Phosphate buffered saline), constituída por Água, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Glucose, Piruvato de sódio e sulfato de kanamicina, meio este previamente preparado, e mantido a uma temperatura entre os 30 a 36° C.

À chegada ao laboratório, os ovários foram colocados no banho-maria à temperatura de 36°C até à punção folicular. O tempo entre a recolha dos ovários e o seu processamento no laboratório, foi sempre inferior a duas horas.

### 3.3.2 - Recolha dos COCs

A punção dos folículos foi realizada com a ajuda de uma agulha de 18G acoplada a uma seringa de 10 ml. Todos os folículos, à exceção dos folículos de cor escura e quísticos, foram puncionados e o seu conteúdo foi recolhido para um tubo de Falcon de 15 ml. Depois de terminada a aspiração, os tubos foram deixados em repouso durante 10 minutos para que ocorra a sedimentação do líquido folicular procedendo-se à escolha dos ovócitos, através de uma lupa binocular com uma ampliação de 40 x.

### 3.3.3 - Triagem e lavagem dos COCs

O precipitado resultante da sedimentação foi colocado numa caixa de Petri, com meio de lavagem de TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) onde foi adicionado 2% de FCS, 0.3mg/ml Glutamina e 50 µg/ml Gentamicina, para posteriormente examinação à lupa. A seleção dos ovócitos foi feita em dois tempos, primeiramente de uma forma mais grosseira onde foram excluídos os ovócitos desnudados e aqueles cujo *cumulus* era expandido. Os ovócitos assim selecionados foram transferidos para uma outra caixa de Petri contendo o mesmo meio que o utilizado para a lavagem dos ovócitos (TCM – 199 Hepes) e submetidos novamente a uma segunda avaliação para separar somente os ovócitos que contenham entre 3 a 5 camadas compactas de células e cujo citoplasma não apresentasse degeneração de acordo com Santos e colaboradores (2008).

### 3.3.4 - Maturação *in vitro*

A maturação foi efetuada em caixa de Petri que continham quatro gotas de 100 µl do meio de maturação TCM – 199 Hepes, cobertas com óleo mineral. Em cada gota foram colocados 5 a 20 ovócitos e a caixa de Petri colocada de imediato na incubadora cerca de 24 h a 39°C, com atmosfera controlada a 5% CO<sub>2</sub> e saturada em água.

#### 3.3.4.1 - Avaliação da maturação celular

Após as 24 horas para maturação, os COC foram classificados segundo a expansão e morfologia das células do *cumulus* de acordo com Wit e Kruip (2001).

Os COCs foram removidos por auxílio do vortex por agitação mecânica, cerca de dois minutos. Os ovócitos desnudados foram transferidos para uma placa de Petri, adicionando uma solução de fixação composta por metanol: ácido acético glacial 3:1.

#### 3.3.4.2 - Avaliação da maturação nuclear

Posteriormente a sua fixação os COCs foram colocados numa lamina e lamela, para realização da sua coloração antes da observação ao microscópio invertido.

A maturação nuclear foi classificada segundo os autores Datta e Goswami (1999) nas diferentes categorias:

##### I – Vesícula Germinativa

O ovócito apresenta um involucro nuclear bem distinto, rodeado pela vesícula germinal, a cromatina não condensada a volta do núcleo.

##### II – Metáfase I

Os cromossomas estão dispostos na placa equatorial através do fuso acromático, os cromossomas diploides (2n) apresentam-se completamente condensados com ausência do corpo polar.

### III – Anáfase I

Separação dos dois cromossomas. Cada cromossoma constituído por dois cromatídeos que migram para um dos polos da célula.

### IV – Telófase I

Os cromatídeos estão separados, e um conjunto de cromossomas (n) atinge um dos polos da célula enquanto o fuso acromático desagrega-se.

### V – Metáfase II

O corpo polar é visível no espaço perivitelino. A cromatina do ovócito encontra-se condensada.

## 3.4 - Vitrificação dos ovócitos imaturos

Os COCs depois de selecionados com as características pretendidas e antes de fazer a sua maturação, foram sujeitos a duas lavagens com meio de lavagem TCM – 199 Hepes (Sigma M 2520) onde foi adicionado 2% de FCS (Soro fetal bovino), 0.3mg/ml Glutamina e 50 µg/ml Gentamicina, posteriormente passam por dois meios distintos, o meio de equilíbrio durante 5 minutos e depois para um meio de vitrificação durante 1 minuto.

Os COCs serão colocados no criotop para rapidamente ser colocado em azoto líquido. Cada criotop tem a capacidade máxima de 6 COCs. Os criotop poderão estar em azoto líquido quanto tempo for necessário.

## 3.5 - Fertilização *in vitro*

Antes da fertilização dos ovócitos os mesmos terão de ser descongelados dos criotop e posteriormente maturados onde ficarão na incubadora aproximadamente 24 h. A descongelção é realizada com meio de descongelção constituído por três soluções de sacarose que diferem somente na concentração (0,5M; 0,25M; 0,1M e 0M) preparado previamente em stock.

Quando se retirou o criotop do azoto líquido, os COCs são colocados no meio constituído por TCM-199 Hepes adicionado de 20% FCS (Soro fetal bovino), Gentamicina e 0.5 M Sacarose. Os meios foram filtrados com um filtro de 0.22 µm.

A realização da FIV requer a preparação de um meio de fertilização, composto por duas partes, meio TALP de base para IVF que tem validade de cerca de três semanas, conservado a 4°C, e o meio TALP intermediário para IVF, que deverá ser filtrado e armazenado na incubadora até 2 h antes da sua utilização.

Para iniciar a fertilização descongelou-se uma palhinha de sémen, colocando-a num banho-maria a 36 – 37°C durante 30 segundos. De seguida a mesma foi limpa com álcool a 70%.

A palhinha de sémen foi cortada e todo o seu conteúdo vertido para um tubo de falcon vazio, adiciona-se 4.000µl de SP-TL, e levou-se a centrífugadora a 1800 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi então retirado e adicionado novamente 4.000µl de SP-TL, passando novamente pela centrífugadora mais 5 minutos. Este processo foi ainda realizado da mesma forma uma última vez, retirando o sobrenadante da mesma forma e adicionando desta vez 4.000 µl de IVF-TL. O sobrenadante foi retirado mas não na totalidade. O tubo de falcon que continha o sémen e um pouco de meio foi agitado de forma a haver uma homogeneização dos dois.

Desse mesmo tubo é retirado cerca de 200 µl para se avaliar em dois pontos o sémen:

- Motilidade: colocando um pouco de sémen numa lamina com lamela e verificar no microscópio.

- Concentração: colocando um certo volume de sémen, previamente verificado tendo em conta a sua concentração, num eppendorf e adicionar um pouco de água.

Antes de adicionar o sémen aos COCs, os mesmos foram passados por diferentes meios, preparando então uma caixa de petri com duas gotas de (100 µl) de meio Hepes-TL de seguida a mesma situação com meio IVF-TL. Por último preparou-se uma caixa de petri mais pequena com varias gotas, estas de 50 µl de meio IVF-TL e cobriu-se com óleo mineral. Eram colocados entre 7 a 8 COCs para cada uma das gotas.

Sémen foi então pipetado e colocar cerca de 9 µl em cada gota, sendo a caixa de petri colocadas de imediato na incubadora, a 39°C, 5% CO<sub>2</sub> e saturação em água.

### **3.6- Cultura *in vitro* de embriões**

Para a cultura *in vitro* de embriões é necessária a preparação do meio de cultura previamente, onde deverá estar no mínimo 2 h na incubadora antes da sua utilização.

Passadas 24h da fertilização, inicia-se a cultura dos embriões onde se efetua uma primeira lavagem utilizando meio de cultura. Como os COCs fecundados apresentam no seu redor células da granulosa, os mesmos foram passados por várias gotas de meio de cultura a fim de se libertarem das camadas celulares, poderá ser utilizado o vortex.

Foi então preparada uma caixa de 4 poços com meio de cultura e coberta com óleo mineral, onde foram colocados no máximo 10 zigotos em cada poço, colocando a caixa de imediato na incubadora a 39°C, 5% CO<sub>2</sub> e saturação em água.

Ao 6<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dia após a FIV foi realizada a avaliação do estado de desenvolvimento dos embriões, considerando-se como desenvolvidos os que atingiram o estado de mórula ou blastocisto.

### **3.7- Análise e tratamento de dados**

Para análise estatística foi utilizando o software SPSS 17,0, (Inc., Chicago, IL., USA). Levou-se a cabo a análise de variâncias One-Way, ANOVA expressando em média os resultados com o fim de estudar a distribuição normal dos dados. Em continuação e dependendo das variáveis a estudar, aplicou-se o método LSD (Least Square Differences) para análise post-hoc no desenvolvimento nuclear após maturação do grupo controlo, grupo DMSO e grupo DMSO + Ficol. No estudo das variáveis para a taxa de ovócitos sobreviventes no grupo controlo, grupo DMSO e grupo DMSO + Ficol bem como no desenvolvimento embrionário *in vitro* após criopreservação e maturação do grupo controlo, grupo DMSO e grupo DMSO + Ficol aplicou-se da mesma forma a análise One-Way ANOVA com o método LSD para análise post-hoc. Considerou-se a existência de diferenças significativas para  $P < 0,05$ .

## 4 - Resultados e Discussão

No presente trabalho os COCs foram divididos em dois grupos de trabalho, dependentes um do outro em que na primeira parte do trabalho foi avaliada a toxicidade do Ficol como crioprotetor dos COCs imaturos, e na segunda parte do trabalho foi avaliada a capacidade desses COCs serem fecundados e se desenvolverem até ao estado de morula/blastocisto após criopreservação/descongelção seguida de FIV.

Relativamente à toxicidade do Ficol nos COCs, os resultados obtidos demonstraram que em nenhum dos tratamentos se observou abaixamento da taxa de maturação, recorrendo ao desenvolvimento nuclear (Quadro 7). A suplementação do meio de vitrificação com o Ficol não demonstrou nenhuma melhoria no desenvolvimento nuclear (44.1%) porém não se verificou que esse crioprotetor tenha uma ação negativa no progresso de maturação nuclear. Os COCs maturados sem Ficol como crioprotetor tiveram uma taxa de maturação de 48.8% vs 51.0% para o grupo considerado controlo.

Em relação a expansão das células do cumulus oophorus, observou-se uma menor taxa de expansão dos cumulus dos COCs pertencentes ao grupo DMSO ( $88,7 \pm 2,6$ ) quando comparados com os resultados obtidos no grupo DMSO+Ficol ( $91,8 \pm 2,2$ ) ( $p < 0,05$ ). No grupo controlo a taxa de maturação avaliada por este critério foi de  $92,9 \pm 1,6$ . Apesar das diferenças, os resultados não são estatisticamente diferentes.

**Quadro 7:** Taxa de desenvolvimento nuclear, após maturação

	Número de Ovócitos	Maturação (%)	Estádios de desenvolvimento nuclear dos oócitos em Número e (%)					Ovócitos Maturados
			GVBD	MI	AI	TI/II	MII	
Grupo 1a) Controlo	213	$92.9 \pm 1.6$	4 (1.9)	11 (5.2)	2 (0.9)	10 (4.7)	98 (46.0)	108 (51.0)
Grupo 1b) DMSO	258	$88.7 \pm 2.6$	14 (5.4)	12 (4.7)	1 (0.4)	10 (3.9)	116 (45.0)	126 (48.8)
Grupo 1c) DMSO+Ficol	220	$91.8 \pm 2.2$	4 (1.8)	14 (6.4)	0	14 (6.4)	83 (38.0)	97 (44.1)

GVBD – Destruição da vesícula germinativa      TI/II – Telófase I e II

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

AI – Anáfase I

Depois de verificar que o Ficol não é tóxico para os COCs durante o processo de vitrificação, avançamos para a segunda parte do trabalho, onde os COCs após criopreservação/descongelamento foram fecundados *in vitro* sendo avaliado além da capacidade de fecundação, o estado de desenvolvimento dos já embriões até 9º dia de desenvolvimento em meio de cultura constituído por TCM - 199 Hepes (Sigma M 2520) adicionado de 100 µl/ml de aminoácidos não essenciais (100x) (Sigma M7145), 200 µl/ml aminoácidos essenciais (50x) (Sigma B6766), 22 µg/ml sódio-piruvato, 0,03g BSA (Bovine serum albumim) (Sigma A9647) e 10 µl/ml de Gentamicina (Sigma G3632) (Quadro 8).

Em relação a taxa de sobreviventes, depois de se retirarem os COCs dos criotop após vitrificação, observa-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre o grupo do DMSO ( $94.5 \pm 1.4\%$ ) sendo menor no grupo do DMSO + Ficol ( $85.6 \pm 7.0$ ), Laowtammathron *et al.*, (2005) obteve resultados semelhantes quando utilizou 10% de Ficol na vitrificação de blastocistos de búfalos. No entanto Hajarian *et al.*, (2011) obteve também uma taxa de sobrevivência de  $90.34 \pm 2.5\%$  utilizando ovócitos imaturos vitrificados com DMSO utilizando criotop para o mesmo processo.

Na avaliação da maturação dos ovócitos podemos verificar uma melhoria na suplementação do DMSO com o ficol ( $80.1 \pm 6.8\%$ ) em comparação somente com o DMSO ( $75.6 \pm 3.6\%$ ) indicando que a suplementação é benéfica, protegendo aparentemente os COCs da elevada toxicidade do DMSO (Quadro 8).

**Quadro 8:** Taxa de ovócitos sobreviventes.

	Número de ovócitos	Taxa de sobreviventes (%)	Maturação (%)	Clivagem (%)
Grupo 2a) Controlo	176	$100 \pm 0.0^a$	$94.1 \pm 0.7^a$	$80.0 \pm 3.4^a$
Grupo 2b) DMSO	168	$94.5 \pm 1.4^{ab}$	$75.6 \pm 3.6^b$	$31.1 \pm 2.0^b$
Grupo 2c) DMSO+Ficol	210	$85.6 \pm 7.0^b$	$80.1 \pm 6.8^{ab}$	$39.8 \pm 5.3^b$

<sup>ab</sup> Números na mesma coluna com diferentes letras (a, b, c) diferem significativamente  $P < 0.05$

Em relação aos resultados referentes ao desenvolvimento embrionário no estado de 2 - 8 células, (Quadro 9) foram superiores no grupo controlo ( $67.9 \pm 5.1\%$ ), já nos restantes tratamentos não se verificam diferenças significativas DMSO ( $26.5 \pm 1.8\%$ ) e DMSO + Ficol ( $17.4 \pm 1.1\%$ ). Os resultados obtidos para o DMSO estão semelhantes aos resultados obtidos por Hajarian *et al.*, (2011) de ( $23.33 \pm 1.62\%$ ) para a mesmo estado de desenvolvimento embrionário. Verificou-se que a adição do Ficol no meio de

vitrificação evitou algum tipo de bloqueio no estado de 2 – 8 células promovendo então a continuação do desenvolvimento embrionário (Shire *et al.*, 1980).

Nos restantes estados de desenvolvimento embrionário as diferenças observadas entre o DMSO (21.5±2.1%) e o DMSO + Ficol (22.3±5.7%) não foram estatisticamente significativas, no entanto o grupo controlo (52.0±8.4%) obteve sempre percentagens superiores, sendo estas diferenças significativas ( $P < 0.05$ ). Podemos salientar a maior percentagem de embriões no estado de morula com a adição do Ficol (15.1±3.4%) comparando somente com o DMSO (11.3±1.0) (Quadro 9).

**Quadro 9:** Desenvolvimento embrionário *in vitro* após criopreservação e maturação dos ovócitos.

	2-8 Células (%)	Morula (%)	Blastocistos (%)	Desenvolvimento (%)
Grupo 2a) Controlo	67.9±5.1 <sup>a</sup>	26.3±3.9 <sup>a</sup>	25.7±6.3 <sup>a</sup>	52.0±8.4 <sup>a</sup>
Grupo 2b) DMSO	26.5±1.8 <sup>b</sup>	11.3±1.0 <sup>b</sup>	10.2±2.7 <sup>b</sup>	21.5±2.1 <sup>b</sup>
Grupo 2c) DMSO+Ficol	17.4±1.1 <sup>b</sup>	15.1±3.4 <sup>b</sup>	7.2±3.5 <sup>b</sup>	22.3±5.7 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Números na mesma coluna com diferentes letras (a, b, c) diferem significativamente  $P < 0.05$

## 5 - Considerações finais

Após realizada a análise dos resultados deste estudo, foi possível concluir que o Ficol é um crioprotetor benéfico para o processo de vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, vitrificados em criotop com posterior descongelamento, maturação e fecundação *in vitro*, demonstrando uma boa taxa de desenvolvimento embrionário após fecundação *in vitro*.

Dado o interesse do presente trabalho, seria interessante propor a continuação do mesmo de forma a implementar os ovócitos fecundados *in vitro* numa recetora, verificando até que ponto o desenvolvimento embrionário ocorreria.

## 6 - Bibliografia

Antunes, G., Marques, A., Santos, P., Chaveiro, A., Moreira da Silva, F. (2008). Atlas do Ovócito e do Embrião Bovino.

Bakhach, J. (2009). *The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues*. Organogenesis 5, 119-126.

Barnes, F., Endbock, M., Looney, C., Powell, R., Westhusin, M., and Bondioli, K. (1993). *Embryo cloning in cattle: the use of in vitro matured oocytes*. Journal of Reproduction and Fertility 97, 317-320.

Betteridge, S.. (1995). *Interaction between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view*. 7(4), 927-942.

Boediono, A. (1995). *The influence of polyvinylpyrrolidone on freezing of bovine IVF blastocysts following biopsy*. Cryobiology 32, 505-510.

Brackett, B. G., Younis, I., and Fayer-Hosken, R. A. (1989). *Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matures in vitro with high concentrations of luteinizing hormone*. Fertil 52, 319-324.

Brackett, B. G., and Zuelke, K. A. (1993). *Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos*. Theriogenology 39, 43-64.

CAO, Y. X., and Xing, Q. (2009). *Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification*. Fertility and Sterility 92, 1306-1311.

Carroll, J., Whittingham, D. G., Wood, M. J., Telfer, E., and Gosden, R. G. (1990). *Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from primary follicles*. Journal of Reproduction and Fertility 90, 1163-1167.

Chen, S. U., and Yang, Y. S. (2009). *Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic, and the time schedule for clinical practice*. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology 48, 15-22.

Cooney, R. (1998). Airborn semen and the uterine slosh-stepping stones to cloning.

Datta, T.K., and Goswami, S.L. (1999). *Time dynamic and chronology of meiotic progression of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes during in vitro maturation*. Buffalo Journal. 1, 53-60.

De Loos, F., Kastrop, P., Van Murik, P., and Kruip, T. A. (1989). *Morphology of immature bovine oocytes*. 197-204.

Deanesly, R. (1957). *Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing*. Biology of science 147, 412-421.

Dominguez, M. M. (1995). *Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cow*. Theriogenology 43, 1405-1418.

Ectors, F. J. (1995). *Le clonage par transfert de noyau dans l'espèce bovine*.

Eldson, R. P., Nelson, L. D., and Seidel, G. E. (1978). *Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin*. Theriogenology 9, 17-26.

Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angel, C. L., and Meryman, H. T. (1984). *Vitrification as an approach to cryopreservation*. Cryobiology 21, 407-426.

- Faheem, M.S., Carvalhais, I., Chaveiro, A., Moreira da Silva, F. (2011). *In vitro oocyte fertilization and subsequent embryonic development after cryopreservation of bovine ovarian tissue, using an effective approach for oocyte collection*. *Animal Reproduction Science* 125, 49-55.
- Figueiredo, J. R., Hulshof, S. C. J., and Van Den Hurk, R. (1993). *Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries*. *Theriogenology* 40, 789-799.
- Fortune, J. E. (1994). *Ovarian follicular growth and development in mammals*. *Biology of Reproduction* 50, 225-232.
- Gosden, R. G., Mullan, J., Picton, H. M., Yin, H., and Tan, S. L. (2002). *Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine*. *Human Reproduction* 8, 105-110.
- Green, S. H., Smith, A. U., and Zuckerman, S. (1956). *The numbers of oocyte in ovarian autografts after freezing and thawing*. *Journal of Endocrinology* 13, 330-334.
- Guerin, P., Guyader-Joly, C., Mermillod, P., and Leguienne, B. (1996). *La production in vitro et la cryopreservation de l'embryon chez les bovins*. *Le Point Veterinaire (numéro spécial «Reproduction des ruminants»* 28, 13-27.
- Hajarian, H., Wahid, H., Rosnina, Y., and Daliri, M. (2011). *Criotop device enhances vitrification outcome of immature bovine oocytes*. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 2541-2545.
- Hasler, J. F., Henderson, W. B., Hurtgen, P. J., Jin, Z. Q., Mccauley, A. D., Mower, S. A., Neely, B., Shuey, L. S., Stokes, J. E., and Trimmer, S. A. (1995). *Production, freezing and transfer of bovin FIV embryos and subsequent calving results*. *Theriogenology* 43, 141-152.
- Hazeleger, N. L., Hill, D. J., Walton, J. S., and Stubbings, R. B. (1993). *The interrelationship between the development of bovine oocyte in vitro and their follicular fluid environment*. *Theriogenology* 39, 231.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., and Greve, T. (1997). *Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle*. *Theriogenology* 47, 23-32.
- Jacob, L., Steen, M. and Cohen, J. (1998). *Cryopreservation of activated mouse oocytes and zygote reconstitution after thaw*. *Human Reproduction* 13, 109-116.
- Kasai, M. (1994). *Cryopreservation of mammalian embryos by vitrification*. In: T. Mori, T. Tominaga and M. Hiroi (Editors), *Prestective an Assisted Reproduction*. *Frontiers in Endocrinology* 4, 481-487.
- Kasai, M., Komi, J. H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., and Machida, T. (1990). *A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity citrifification solution, without appreciable loss of viability*. *Journal of Reproduction and Fertility* 89, 91-97.
- Kruip, T. A., Boni, R., Wurth, Y. A., Roelofsen, M. W., and Pieterse, M. C. (1995). *Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle*. *Theriogenology* 43, 675-684.
- Kruip, T. A., and Dieleman, S. J. (1982). *Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures*. *Reproduction Nutricion Development* 22, 465-473.
- Kubota, C., Yang, X., Dinnyes, A., Todoroki, J., Yamakuchi, H., Mizoshita, K., Inohae, S., and Tabara, N. (1998). *In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer and parthenogenetic activation*. *Molecular Reproduction and Development* 51, 281-286.
- Kuleshova, L. L., and Lopata, A. (2002). *Vitrification can be more favorable than slow cooling*. *Fertility and Sterility* 78, 449-454.

Laowtammathron, C., Chanchao, L., Ketudat-Carins, M., Hochi, S., and Parnpai, R. (2004). *Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution*. *Theriogenology* 64, 1185-1196.

Lazzari, G., and Galli, C. (1996). *In vitro embryo production and its application to cattle breeding*. 12<sup>e</sup> Colloque Scientifique de l' Association Européenne de Transfer Embryonnaire, 73-82.

Leibfried-Rutledge, M. L., Cristser, E. S., Parrish, J. J., and First, N. L. (1989). *In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes*. *Theriogenology* 31, 61-74.

Leibfried, M. L., and First, N. L. (1979). *Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro*. *Journal of Animal Science* 48, 76-86.

Levesque, J., and Sirard, M. A. (1994). *Prteins in oocytes from calves and adult cows befor maturation. relationship with their developmental capacity*. *Reproduction Nutrition Development* 34, 133-139.

Lindner, G. M., and Wright, J. R. W. (1983). *Bovine embryo morphology and evaluation*. *Theriogenology* 20, 209-219.

Loneragan, P. (1992). *Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes*, University of Ireland, Dublin.

Loneragan, P., Monaghan, P., Riros, D., Boland, M. P., and Gordon, I. (1994). *Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmemtal competence following maturation, fertilization and culture in vitro*. *Molecular Reproduction and Development* 37, 48-53.

Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., and Venetis, C. A. (2008). *Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis*. *Fertility and Sterility* 90.

Lovelock, J., and Bishop, M. (1959). *Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide*. *Nature* 183, 1394-1395.

Luyet, B. J. (1957). *On the growth of the ice phase in aqueous colloids*.

Mahmoudzadeh, A. R. (1994). *Cripreservation of in vivo and in vitro produced bovine embryos*. Thesis.

Massip, A., Van Der Zwalmen, P., and Ectors, F. J. (1987). *Recent progress in cryopreservation of cattle embryos*. *Theriogenology* 27, 69-79.

McGaughey, R. W. (1983). *Regulation of oocyte maturation*. *Oxford Review of Reproduction Biology* 5, 106-130.

Mermillod, P., Wils, C., Massip, A., and Dessy, F. (1992). *Collection of oocytes and production of blastocysts in vitro from individual slaughtered cows*. *Journal of Reproduction and Fertility* 92, 717-723.

Moor, R. M., and Seamark, R. F. (1986). *Cell signslng, permeability and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals*. *Dary Science* 69, 927-943.

Moreira da Silva, F. (2001b). *Concentration of progesterone jugular venous plasma of heifers during the estrous cycle after immunisation against testosterone*. Departamento de Ciência Agrárias. Universidade dos Açores.

Oktay, K., Nugent, D., Newton, H., Salha, O., Chatterjee, P., and Gosden, R. G. (1997). *Isolation and characterization of primprdial follicles from frsh and cryopreserved human ovarian tissue*. *Fertil Steril* 67, 481-486.

Palma, G. A., Olivier, N., Modl, J., Wenigerkind, H., and Brem, G. (1996). *Effect of cumulus investment from ultrasound collected oocytes on the development of in vitro produced embryos by elit cows*. 12e Colloque Scientifique de l' Association Européenne de Transfer Embryonnaire 180.

Parkes, A. S., and Smith, A. U. (1953). *Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures*. Biology of science 140, 455-470.

Parrish, J. J. (1988). *Capacitation of bovine sperm by heparin*. Biology Reproduction 38, 1171-1180.

Peynot, N., Heyman, Y., and Renard, J. P. (1996). *Development of bovine oocyte after individual in vitro maturation, fertilization and co-culture*. 12e Colloque Scientifique de l' Association Européenne de Transfer Embryonnaire 184.

Pincus, G. and Enzmann, E.V. (1935). *The comparative Behavior of Mammalian Eggs in vivo and in vitro*. The Journal of Experimental Medicine 62, 665-675.

Pinto de Andrade, L. P. M. (1995). *Factores que afectam e controlam o anestro pós-parto e o reinício da actividade ovárica em vacas de carne*. Instituto Politécnico de Castelo Branco Escola Superior Agrária, 31-32.

Polge, C., Smith, A. U., and Parkes, A. S. (1949). *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature 164, 666-667.

Rall, W.F and Fahy, G. M (1985). *Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification*. Nature 313, 573-575.

Rose-Hellekant, T., and Bavister, B. D. (1995). *Substrates provided during in vitro maturation modulat acquisition of bovine oocytes developmental competence*. Biology of Reproduction 52.

Rusiyantono, Y. Dyuwita, I. Perwantara, B. and Sukra, Y. (2000). *The influence of ewe serum on in vitro oocyte maturation and early development of ovine embryos*. Media Vet. 7, 13-16.

Saha, S. Otoi, T. Takagi, M. Boediono, A. Sumantri, C. (1996). *Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using athyleno glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone*. Cryobiology 33, 291-299.

Santos, R. Tharasanit, T. Van Haeften, T. Figueiredo, J. Silva, J and Van der Hurk, R. (2007). *Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods*. Cell and Tissue Research. 327 167-176.

Sato, M., Sardana, MK., Grasser, WA., Garsky, VM., Murray, JM., Gould, RJ. (1990). *Echistatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture*. Journal Cell Biology. 1713-1723.

Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B. G., Korb, H., and Schleger, W. (1990). *In vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum*. Theriogenology 33(2), 447-485.

Seki, S., and Mazur, P. (2008). *Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice*. Biology of Reproduction 79, 727-605.

Shaw, J. M., and Jones, G. M. (2003). *Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos*. Human Reproduction 9, 583-605.

Shea, B.F. (1981). *Evaluating the bovine embryo*. Theriogenology 15, 31-42.

Shire, J. G., and Wihitten, W. K. (1980). *Genetic variation in the timing of frst cleavage in mice: Effect of maternal genotype*. Biology of Reproduction 23, 369-376.

Sirard, M.A and Lambert, R.D. (1985). *In-vitro fertilisation of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy*. *Biology of Reproduction* 33, 487-494.

Stachcki, J. J., and Cohen, J. (2004). *An overview of oocyte cryopreservation*. *Reproduction Biomedicine* 9, 152-163.

Staigmiller, R. B. (1988). *In vitro methods for production of viable oocytes*. *Journal of Animal Science* 66, 54-64.

Tan, S. J., and Lu, K. H. (1990). *Effects of different oestrus stages of ovaries and sizes of follicles on generation of FIV early bovine embryos*. *Theriogenology* 33, 335.

Thibault, C., Szollosi, D., and Gerard, M. (1987). *Mammalian oocyte maturation*. *Reproduction Nutrition Development* 27 (5), 865-896.

Thono, F., Ectors, F. J., Deval, A., Fontes, R. S., Toueti, K., and Beckers, J. F. (1993). *In vitro maturation, fertilization and developmental rates of bovine oocytes connected with the reproductive status of donor*. *Theriogenology* 39, 330.

Tornell, J., Billig, H., and Hillensjo, T. (1991). *Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides*. *Human Reproduction* 6, 411-422.

Vajta, G. (2000). *Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animal*. *Animal Reproduction Science* 60-61, 357-364.

Vajta, G., and Kuwayama, M. (2006). *Improving cryopreservation systems*. *Theriogenology* 65, 236-244.

Vajta, G., Holm, P., Callesen, H. (1997). *Survival and Development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in-straw direct rehydration*. *Journal of Reproduction and Fertility* 111, 65-70.

Van Soom, A., and Kruif, A. (1996). *Oocyte Maturation, Sperm Capacitation and Pre-implantation Development in the Bovine: Implications for in vitro Production of Embryos*. *Reproduction in Domestic Animals* 31, 687-701.

Wardle, D. (1998). *Stellar Reserarch That Has Launched Four Industries And Eight Spin-off Companies*.

Wasserman, P., and Mortillo, S. (1991). *Structure of the mouse egg extracellular coat*. *International Review of Cytology* 130, 85-110.

Wit, A. A. C., Wurth, Y. A., and Kruip, T. A. (2000). *Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology an developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex*. *Journal of Animal Science* 78, 1277-1283.

Wit, A. A. and Kruip, T. A. (2001). *Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte diameter and developmental capacity*. *Animal Reproduction Science* 65, 51-65.

Wurth, Y. A., Boni, R., Hulshof, S. C. J., and Kruip, T. A. (1992). *Bovine embryo production in vitro after selection of ovaries, follicles and oocytes*. 12<sup>th</sup> International Congress of Animal Production 1, 387-389.

(1): [www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci\\_repro/lab/lab10/maturation1.html](http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lab/lab10/maturation1.html)

(2): [www.midatest.fr/te-et-biotechnologies](http://www.midatest.fr/te-et-biotechnologies)