

RESUMOS DE DISSERTAÇÕES SUBMETIDAS AOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO  
DO CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA E DE PESQUISADORES DESTE CENTRO

SUMMARIES OF DISSERTATIONS SUBMITTED TO THE GRADUATE  
PROGRAM AT THE *CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SANTA MARIA* AND RESEARCHES AT THIS CENTER

EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO EM OÓCITOS IMATUROS DE BOVINOS  
FECUNDADOS *IN VITRO*<sup>1</sup>

EFFECTS OF VITRIFICATION ON IMMATURE BOVINE OOCYTES  
DURING *IN VITRO* FERTILIZED

Autor: André Metzdorf<sup>2</sup>

Comissão Examinadora: Mara Iolanda Batistella Rubin<sup>3</sup>  
João Carlos Deschamps<sup>4</sup>  
José Carlos Ferrugem Moraes<sup>5</sup>  
Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>3</sup>

A vitrificação tem sido recentemente aplicada para preservar oócitos maduros de diferentes espécies animais. O objetivo do presente estudo foi

vitricar oócitos imaturos de bovinos usando o etileno glicol, propileno glicol e glicerol em diferentes concentrações dos sais de TCM-199 modificado. Os

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900, Santa Maria, RS, em 22.08.95. Trabalho financiado pela FAPERGS.

<sup>2</sup>Médico Veterinário, aluno do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Professor Adjunto, Departamento de Clínica de Grandes Animais, UFSM.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Professor Adjunto, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

<sup>5</sup>Médico Veterinário, Pesquisador do CPPSUL, EMBRAPA, Bagé, RS.

complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram mantidos por 5 minutos no meio de equilíbrio contendo 10% de etileno glicol e 20% de propileno glicol em TCM-199 modificado. Após o período de equilíbrio, os CCOs foram transferidos para o meio de vitrificação contendo 15% de etileno glicol, 15% de glicerol e 20% de propileno glicol em TCM-199 modificado e imediatamente expostos ao vapor de nitrogênio líquido por 1 minuto sendo logo em seguida imersos no nitrogênio líquido. Os CCOs foram divididos em três tratamentos ou seja, T1, T2 e grupo controle (GC). No T1, os agentes crioprotetores foram adicionados ao TCM-199 modificado já diluído (BERTANI et al., 1992), enquanto que no T2, os sais do TCM-199 modificado foram ajustados considerando também, o volume dos crioprotetores adicionados ao meio. No GC, os CCOs não foram vitrificados, mas obtidos da mesma forma que os vitrificados. A proporção de oócitos maturados no GC (43/53), não foi estatisticamente diferente dos tratamentos T1 (73/94) e T2 (55/77). Entretanto, a porcentagem de oócitos degenerados e fragmentados foi significativamente maior no T1 (28,6%) em relação ao grupo controle (13,2%;  $p < 0,0430$ ), enquanto que no T1 e T2 (22,3%) foi similar. Após fecundação, a porcentagem de clivagem foi estatisticamente maior no GC (64,2%) em relação ao T1 (14,9%;  $p < 0,0001$ ) e T2 (13,3%,  $p < 0,0001$ ). Em ambos tratamentos e no grupo controle o índice de partenogênese foi inferior a 4%. O endurecimento da zona pelúcida foi examinado em 232 oócitos a fim de elucidar a baixa taxa de fecundação obtida nos oócitos vitrificados. O tempo requerido para a digestão da zona pelúcida em 50% dos oócitos do GC ( $3'50'' \pm 18''$ ) foi similar aos oócitos vitrificados ( $4'23'' \pm 15''$ ;  $P < 0,3308$ ). Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de se obter elevadas taxas de maturação nuclear após congelamento/descongelamento em oócitos imaturos de bovinos. Os dados também sugerem que o baixo índice de fecundação não foi causado pelo endurecimento da zona pelúcida. Outros estudos deverão de ser realizados para avaliar a maturação citoplasmática de oócitos vitrificados.

**Palavras-chave:** oócito, congelamento, fecundação,

maturação nuclear, vitrificação, bovino.

The vitrification has recently been applied to preserve mature oocytes for using in different fields. The aim of the present study was to vitrify immature oocytes using ethylene glycol, propylene glycol and glycerol in different concentrations of modified TCM-199. *Cumulus*-oocyte complexes (COC) were maintained for 5 minutes in an equilibration medium containing 10% of ethylene glycol, 15% glycerol and 20% propylene glycol in TCM-199 and immediately exposed to nitrogen. COC were divided in two treatments (T1 and T2) and a control group (CG). In the T1, the cryoprotective agents were added to the modified TCM-199 without adjusting the compounds of the medium while, in the T2, the TCM-199 salts were adjusted considering the volume of cryoprotectants added to the medium. In the CG, COC were not vitrified and were obtained when the vitrified samples were thawed. The proportion of nuclear maturation in the CG (43/53) was not statistically different from the T1 (73/94) and T2 (55/77). However, the percentage of both degenerated and fragmented oocytes was significantly higher in the T1 (28.6%) compared to the CG (13.2%);  $p < 0.0431$  while it was similar to the T1 and T2 (22.3%). After fertilization, the cleavage percentage was statistically higher in the CG (64.2%) than in the T1 (14.9%);  $p < 0.0001$  and T2 (13.3%;  $p < 0.0001$ ). In the treatment and control groups, parthenogenesis was observed in less than 4% of the oocytes. Hardening of the zona was analyzed in 232 oocytes to explain the reason for the low fertilization rate obtained with vitrified oocytes. The mean time required to digest 50% of the oocytes in the CG ( $3'50'' \pm 18''$ ) was similar to the vitrified oocytes ( $4'23'' \pm 15''$ ;  $p < 0.3308$ ). The present results demonstrate the possibility of obtaining high rates of nuclear maturation after vitrifying/thawing immature bovine oocytes. The data also suggest that the low fertilization rate is not caused by hardening of the zona. Further studies need to be done to evaluate the oocyte cytoplasmic maturation after vitrification.

**Key words:** oocyte, freeze, fertilization, nuclear maturation, vitrification, bovine.