

Vitrificação de Ovócitos Desnudos ou Não e Previamente Maturados *In Vitro*¹

Letícia Martins Fagundes², Eduardo Paulino da Costa³, Ciro Alexandre Alves Torres⁴,
Wald'ma Sobrinho Amaral Filha², Trícia Osório da Silva², Marilú Martins Gioso²

RESUMO - Objetivou-se avaliar os efeitos da vitrificação de ovócitos maturados *in vitro* de bovinos, utilizando o etilenoglicol (EG) associado a trehalose e polivinilpirrolidona (PVP). Utilizaram-se ovócitos provenientes de ovários de vacas abatidas em matadouro, distribuídos aleatoriamente em três tratamentos. Tratamento 0 (T0 - testemunha): ovócitos não desnudos e não congelados. Tratamento 1 (T1): vitrificação de ovócitos com *cumulus oophorus* e maturados *in vitro*. Tratamento 2 (T2): vitrificação de ovócitos desnudos e maturados *in vitro*. A porcentagem de ovócitos recuperados e com morfologia normal após a desvitrificação foi diferente entre T1 e T2 (94,7 e 76,8%; 69,5 e 49,85%, para T1 e T2, respectivamente). Após a reidratação, os ovócitos vitrificados foram fecundados e cultivados *in vitro* por sete dias. Foi verificada, em nível ultra-estrutural, liberação prematura dos grânulos corticais em ovócitos vitrificados. As taxas de fecundação e de clivagem foram diferentes entre os tratamentos (56,2; 41,7 e 12,5%; 36,3; 0,0 e 0,0% para T0, T1 e T2, respectivamente). Apenas no T0 foram obtidos mórulas e blastocistos (34,5%). Estes resultados indicam que o procedimento de vitrificação, segundo os protocolos utilizados, não é indicado para a criopreservação de ovócitos maturados de bovinos.

Palavras-chave: bovino, ovócito, vitrificação

Cryopreservation of Bovines Oocytes Desnuded or not and Previously *in vitro* Matured

ABSTRACT - This study aimed at the evaluation of the effects from cryopreservation of bovine oocytes *in vitro* matured, by using ethylene glycol (EG) associated to trehalose and polyvinylpyrrolidone (PVP), of ovary oocytes of slaughtered cows, randomly assigned to three treatments. Treatment 0 (T0 - control): oocytes that were desnuded and not vitrified. Treatment 1 (T1): cryopreservation of *in vitro* matured oocytes with *cumulus oophorus*. Tratamento 2 (T2): cryopreservation of *in vitro* matured desnuded oocytes. The percentage of recovered oocytes after cryopreservation and with normal morphology was different for vitrified oocytes (94.7 and 76.8%; 69.5 and 48.85% for T1 and T2, respectively). The main changes ultrastructural in vitrified oocytes were prematurely released of cortical granules. Later, all normal oocytes were fecundated and cultivated at 38.5°C in atmosphere with 5% CO₂ for seven days. The fecundation and cleavage rates for treatments were different (56.2, 41.7 and 12.5%; 36.3, 0.0 and 0.0%, for T0, T1 and T2, respectively). Morulas and blastocysts were obtained only in T0 (34.5%). These results indicate that, the used protocols, for vitrification procedure is not indicated for cryopreservation of matured bovine oocytes.

Key Words: bovine, oocytes, vitrification

Introdução

Vários estudos científicos sobre o uso das técnicas de criopreservação estão sendo realizados, com o propósito de formar bancos de gametas femininos que poderão ser utilizados em pesquisas ou aplicações comerciais. O uso desta biotécnica tem apresentado resultados satisfatórios quanto à preservação de ovócitos de camundongas, *hamster*, coelhas e humanos. Entretanto, os pesquisadores têm encontrado dificuldades na criopreservação de ovócitos de bovinos (Fuku et al., 1995a; Martino et al., 1996; Suzuki et al., 1996).

Muitos protocolos, como o resfriamento lento, rápido e ultra-rápido, têm sido utilizados, porém, ainda não existe um procedimento que possa produzir resultados consistentes. A vitrificação é um dos métodos de criopreservação que, recentemente, vem sendo muito pesquisada, por consistir em eliminar metodologias laboriosas dos métodos convencionais (Rall, 1987; Hoshi et al., 2001). Entretanto, apresenta como desvantagem o seu efeito tóxico, pois consiste no uso de elevada concentração de crioprotetores na solução (Pugh et al., 2000). Pode-se minimizar o efeito tóxico dos crioprotetores adicionando

¹ Apoio financeiro da FAPEMIG.

² Mestrandas em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa.

³ DVT – Universidade Federal de Viçosa (epcosta@ufv.br).

⁴ DZO – Universidade Federal de Viçosa (ctorres@ufv.br).

macromoléculas e açúcares na solução (Kasai et al., 1990), ou combinando crioprotetores, como o etilenoglicol (EG) (Martino et al., 1996).

Segundo Hochi et al. (1996), em adição aos protocolos de criopreservação, os estádios meióticos dos ovócitos também influenciam a capacidade de sobrevivência da célula criopreservada. Fuku et al. (1995b) observaram que ovócitos maturados *in vitro* (MIV) podem ser criopreservados e manter a viabilidade após descongelamento, para a fecundação *in vitro* (FIV) e cultura *in vitro* (CIV), embora os resultados ainda não sejam consistentes. Corroborando estes achados, Asada et al. (2002), após análises de ovócitos em metáfase II (MII) e desvitrificados, verificaram que somente 28,3% foram fertilizados. Adicionalmente, observaram 12% de clivagem, sendo que nenhum chegou ao estágio de mórula. Porém, Hochi et al. (1997) e Sung et al. (2001), ao vitrificarem ovócitos em MII de bovinos e camundogos, expostos à solução de EG, obtiveram taxa de 31 e 34% de clivagem até oito células, sendo que 5 e 25% chegaram ao estágio de blastocisto, respectivamente. Papis et al. (2000) também não obtiveram resultados satisfatórios após vitrificarem ovócitos em MII desnudos, obtendo somente 27% de clivagem, sendo que somente 3% se desenvolveram até o estágio de blastocisto.

Vários pesquisadores admitem que o estágio de vesícula germinal (ovócito imaturo) é mais sensível à criopreservação que qualquer outro estágio nuclear (Fuku et al., 1995a; Fuku et al., 1995b; Hochi et al., 1997; e Luna et al., 2001). Entretanto, exposição do ovócito maturado (MII) a certas condições de resfriamento e aos crioprotetores pode induzir à instabilidade dos fusos meióticos, provocando segregação anormal dos cromossomos na retomada da meiose com a fecundação, podendo causar anormalidades cromossômicas (Shaw et al., 2000). Saunders & Parks (1999), por intermédio da microscopia eletrônica, observaram várias alterações, ao congelarem ovócitos maturados *in vitro* de bovinos. Esses pesquisadores verificaram acúmulo ou dispersão cromossômica, despolimerização de microtúbulos, alterações na estrutura do fuso, formação de crateras e descontinuidade na actina do citoesqueleto.

Com a análise ultra-estrutural, Fuku et al. (1995a), Fuku et al. (1995b), Schmidt et al. (1995) e Hochi et al. (1996) verificaram, além das alterações nos microtúbulos, nos cromossomos e nas mitocôndrias, alterações na zona pelúcida, destruição das junções

gap entre as células do *cumulus ooforus* e, principalmente, a precoce distribuição periférica e exocitose dos grânulos corticais (CG), prejudicando a fecundação, em razão do enrijecimento precoce da zona pelúcida. Segundo esses pesquisadores, este enrijecimento precoce é um dos principais fatores que provocam resultados insatisfatórios na vitrificação de ovócitos maturados *in vitro*. Fuku et al. (1995b) afirmaram que esta reação prematura dos CG de ovócitos de bovino não é induzida somente pelo crioprotetor, mas também pelas baixas temperaturas.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a eficácia da vitrificação de ovócitos previamente maturados *in vitro*, utilizando o etilenoglicol associado com outros crioprotetores. Pretende-se avaliar os efeitos na morfologia celular e na subsequente capacidade de desenvolvimento após a fecundação e cultivo embrionário.

Material e Métodos

Ovários bovinos foram obtidos de animais abatidos em matadouro e transportados para o laboratório em, no máximo, três horas após a coleta em solução fisiológica entre 35 e 37°C, contendo penicilina e estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990). No laboratório, os ovários foram submetidos à aspiração, manipulação e classificação, conforme Costa (1994). Foram selecionados para o experimento os ovócitos que apresentaram *cumulus oophorus* compactos (COC_s). Os ovócitos foram divididos aleatoriamente em três tratamentos: Tratamento 0 (testemunha), constituído de 692 ovócitos com COC_s não congelados (frescos), os quais foram submetidos aos processos de MIV, FIV e CIV, conforme descrito em itens posteriores; Tratamento 1 (vitrificado com *cumulus oophorus* – VCOC_s), constituído de 357 ovócitos e Tratamento 2 (vitrificado desnudado – VD), constituído de 371 ovócitos desnudados segundo Costa (1994). Os ovócitos de cada tratamento foram previamente submetidos à maturação *in vitro* em meio de cultivo, por 24 horas, segundo Costa (1994). Os ovócitos do tratamento 2 foram maturados com células da granulosa em suspensão, na quantidade de dois milhões por mililitro. Após a MIV, os ovócitos dos tratamentos 1 e 2 foram criopreservados pelo método de vitrificação. A vitrificação foi realizada conforme protocolo utilizado em zigotos por Saha et al. (1996), em três etapas para desidratação. As duas primeiras etapas duraram cinco minutos cada, com as

soluções em temperatura ambiente, enquanto a última, que correspondia à solução de vitrificação, durou apenas um minuto a 4°C. Todas as soluções tiveram o pH previamente ajustado para 7,30 - 7,35. Na primeira etapa, foi utilizada uma solução contendo 10% de etilenoglicol (EG); na segunda, 10% de EG + 0,3 mol L⁻¹ de trehalose; e na terceira, 40% de EG + 0,3 mol L⁻¹ de trehalose + 20% de polivinilpirrolidona (PVP). Antes de completar o tempo da terceira etapa, os ovócitos foram envasados em grupos de 20 a 30 em palhetas de 0,25 mL. Uma vez acondicionados na palheta, esta foi fechada e mergulhada em nitrogênio líquido acondicionado em uma caixa de isopor.

Os ovócitos dos tratamentos 1 e 2 foram desvitrificados pela imersão da palheta em banho-maria a 30°C por 20 segundos, e a reidratação em temperatura ambiente, em apenas um banho. A solução de reidratação foi composta de 20% EG mais 0,3 mol L⁻¹ de trehalose e 10% de PVP. Esta solução teve o pH previamente ajustado para 7,30 - 7,35. Os ovócitos permaneceram nesta solução por seis minutos e, posteriormente, foram lavados quatro vezes em meio Talp-Hepes e avaliados morfológicamente. Os ovócitos considerados normais foram submetidos à FIV e CIV. Foram considerados normais os ovócitos que apresentaram formas esférica e simétrica, sem degeneração aparente, e anormais, aqueles com perda de conteúdo celular, citoplasma vacuolizado, retraído ou fragmentado. Os resultados obtidos das alterações morfológicas foram distribuídos em tabelas de contingência e analisados pelo teste do qui-quadrado (Sampaio, 1998).

A fecundação *in vitro* foi realizada segundo Costa (1994), utilizando sêmen bovino congelado em palhetas médias. O meio de manipulação, incubação do sêmen e o de fecundação foram o Sp-TI e Fert-Talp, respectivamente, de Parrish et al. (1988), modificado segundo Costa (1994).

Para avaliação da taxa de fecundação, os ovócitos foram submetidos aos procedimentos sugeridos por Costa (1994). Foram considerados fecundados os ovócitos que apresentaram os dois pronúcleos, com presença ou não da cauda do espermatozóide.

Após a incubação com o sêmen, os ovócitos foram cultivados, durante sete dias, em gotas com 50 µL de meio TCM 199 acrescido de 10% de soro de vaca em diestro. Os ovócitos do tratamento 2 foram cultivados com células da granulosa em suspensão. O meio foi renovado a cada 48 horas. As taxas de

clivagem e de mórulas e blastocistos foram avaliadas no segundo e sétimo dias de cultivo, respectivamente. Os resultados obtidos quanto à clivagem e desenvolvimento para mórulas e blastocistos foram distribuídos em tabelas de contingência e analisados pelo teste do qui-quadrado (Sampaio, 1998).

Para confirmação da maturação citoplasmática em nível ultra-estrutural, segundo Costa (1994), foi processado, após a MIV, um total de 30 ovócitos de cada tratamento para microscopia eletrônica de transmissão. A contrastação foi realizada com o citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e com o acetato de uranila (Watson, 1958). Também foram processados, para análise ultra-estrutural, 30 ovócitos de cada tratamento para confirmação da fecundação e 30 ovócitos pós-vitrificação e reidratação.

Resultados e Discussão

Com relação à porcentagem de ovócitos recuperados após a desvitrificação, houve diferença ($P < 0,01$) entre o tratamento de ovócitos maturados *in vitro* e vitrificados com *cumulus oophorus* (VCO_s) e o tratamento de ovócitos vitrificados desnudados (VD), sendo 94,7% (338/357) e 76,8% (285/371), respectivamente. A taxa de recuperação dos VCO_s foi semelhante à obtida por pesquisadores congelando ovócitos de vacas ou novilhas (Hamano et al., 1992; Men et al., 2002).

Entre os escassos estudos realizados com a criopreservação de ovócitos maturados *in vitro* e desnudados, poucos relataram a taxa de recuperação. Entretanto, Sung et al. (2001), ao trabalharem com ovócitos de camundongas maturados *in vitro* e desnudados, obtiveram taxa de recuperação, após a desvitrificação, de 73,8%, valor semelhante ao obtido neste experimento.

Segundo Souza (2001), a taxa de recuperação dos ovócitos parece não ser afetada pelo tipo de crioprotetor, pela espécie animal e nem mesmo pelo método de criopreservação utilizado. Dessa forma, as perdas dos ovócitos que ocorreram de maneira mais intensa no VD que no VCO_s podem ser atribuídas à maior dificuldade de visualização dos ovócitos desnudados durante os procedimentos de desvitrificação e reidratação dos mesmos.

Em relação à porcentagem de ovócitos com morfologia anormal, houve diferença ($P < 0,05$) entre o VCO_s (30,5%) e VD (51,2%) (Tabela 1). Segundo Lim et al. (1999), o tipo de crioprotetor utilizado pode

afetar a morfologia dos ovócitos bovinos, sendo preferível o uso de substâncias mais permeáveis. Dessa forma, o EG foi utilizado como crioprotetor neste experimento, por possuir baixo peso molecular e alta permeabilidade, na tentativa de evitar maior ocorrência de injúrias celulares. Entretanto, a análise ultra-estrutural evidenciou que, mesmo nos ovócitos aparentemente normais após a desvitrificação, ocorreram alterações. A principal alteração encontrada nos vitrificados foi a liberação prematura dos grânulos corticais. Esta condição, verificada também por vários pesquisadores, afeta a condição da zona pelúcida, interferindo na fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (Fuku et al., 1995a; Fuku et al., 1995b; Schmidt et al., 1995; Hochi et al., 1996). Ao contrário, os ovócitos não criopreservados (testemunha) apresentaram os grânulos corticais distribuídos normalmente conforme verificado por Costa (1994), com distribuição equitativa nas proximidades da membrana plasmática. Além das alterações nos grânulos corticais, foram também verificadas nos ovócitos criopreservados outras alterações como vacuolização e perda de cristas mitocondriais, fato observado por Fuku et al. (1995a), em ovócitos vitrificados imaturos.

Souza (2001) obteve menor porcentagem de ovócitos imaturos e desnudos com morfologia normal após a desvitrificação, resultado semelhante ao encontrado neste experimento. Segundo esse autor, que utilizou a mesma metodologia do presente experimento, a menor porcentagem de ovócitos imaturos e desnudos encontrados com morfologia normal pode ser atribuída às etapas de desidratação. Os

dois tratamentos foram submetidos às mesmas condições nas etapas de desidratação, porém o VCOC_s pode ter apresentado melhor resultado, em razão de suas células do *cumulus oophorus* possibilitarem trânsito menos drástico do crioprotetor. Corroborando os resultados obtidos por Souza (2001) e Agca et al. (1998), pode-se inferir que os ovócitos desnudos necessitam de tempo de desidratação dos VCOC_s diferenciado. Portanto, é provável que o tipo de crioprotetor utilizado e o tempo de desidratação sejam diferentes quanto ao uso de ovócitos com presença ou não de células do *cumulus oophorus*.

O número de ovócitos com anormalidades foi diferente ($P < 0,05$), em relação ao citoplasma retraído e à perda de conteúdo celular. Corroborando os resultados obtidos por Martino et al. (1996), a principal anormalidade encontrada neste experimento foi citoplasma retraído. Segundo Souza (2001), embora pouca importância tenha sido dada a esta anormalidade, o grau de retração do citoplasma é bastante importante, pois, de acordo com a intensidade, pode comprometer totalmente a integridade da membrana citoplasmática e a organização das organelas do ovócito.

Em relação à perda do conteúdo celular, alguns trabalhos (Dahli et al., 2000a; Dahli et al., 2000b) classificaram esta injúria e o rompimento da zona pelúcida como anormalidades distintas. Entretanto, corroborando resultados observados por Souza (2001), no presente experimento, o rompimento de zona pelúcida estava associado aos ovócitos que apresentaram perda de material citoplasmático, visto que não é possível a perda de material sem o rompimento prévio da zona pelúcida.

Tabela 1 - Anormalidades morfológicas encontradas em ovócitos vitrificados após maturação com *cumulus oophorus* (T1 - VCOC_s) ou desnudos (T2 - VD)
Table 1 - Morphological abnormalities from oocytes vitrificated after maturation with *cumulus oophorus* (T1 - VCOC_s) or desnude (T2 - VD)

Tratamento Treatment	N(%)	Anormalidades (%) Abnormalities (%)	
		ZP rompida Disruption of ZP	Citoplasma retraído Retracted cytoplasm
T1 (vitrificados - VCOC _s) T1 (vitrificated - VCOC _s)	103/338 (30,5) ^a	13 (12,6) ^a	90 (87,4) ^a
T2 (desnudos vitrificados - VD) T2 (vitrificated desnudes - VD)	146/285 (51,2) ^b	50 (34,2) ^b	96 (65,7) ^b

ZP = zona pelúcida; ZP rompida = inclui perda de conteúdo celular.

ZP = pelucida zona; Disruption of ZP = includes celular content loss.

Valores com diferentes letras sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,01$) pelo teste do qui-quadrado.

Values within the same column, followed by different letters, differ ($P < .01$) by chi-square test.

A taxa de fecundação foi diferente ($P < 0,01$) para os ovócitos dos tratamentos controle (T0), ovócitos maturados *in vitro* com *cumulus oophorus* (VCOC_s) e ovócitos desnudados maturados *in vitro* (VD), sendo de 56,2; 41,7 e 12,5%, respectivamente. O resultado obtido para o VCOC_s foi semelhante aos 38,3% encontrados por Le Gal & Massip (1999) e aos 47,45% verificados por Hochi et al. (1997). Entretanto, foi ligeiramente inferior aos 58,0; 62,5 e 61,7% encontrados por Hochi et al. (2001), Sung et al. (2001) e Asada et al. (2002), respectivamente. As concentrações de crioprotetores utilizadas por Hochi et al. (1997) foram similares às do presente experimento, observando-se que a alta taxa de fecundação pode ter sido atribuída às etapas de exposição aos crioprotetores, pois foram utilizadas duas etapas de desidratação de 10 e 1 minuto, respectivamente, ambas em temperatura ambiente. No presente estudo, apesar de a última etapa também ter durado 1 minuto, a temperatura foi de 4°C, o que pode ter influenciado a taxa de fecundação.

Os números e a porcentagem de ovócitos que clivaram e alcançaram estágio de mórula e blastocisto são apresentados na Tabela 2. Os procedimentos de vitrificação adotados neste experimento provocaram efeitos adversos nos ovócitos, refletindo na taxa de clivagem, que foi igual a zero em ambos os tratamentos de vitrificação.

Os ovócitos não vitrificados (T0 - testemunha) desenvolveram-se até o estágio de morúla e blastocisto, em taxas satisfatórias (34,5%), demonstrando que os procedimentos para FIV e CIV foram adequados.

Vários autores (Hamano et al., 1992; Martino et al., 1996; Agca et al., 1998; Otoi et al., 1998) observaram que um menor tempo de exposição dos ovócitos aos agentes crioprotetores melhorava as taxas de clivagem e, conseqüentemente, a produção de blastocistos. Hamano et al. (1992), utilizando um protocolo de vitrificação no qual os ovócitos ficavam expostos a solução de vitrificação por 10 segundos, conseguiram transferir três embriões bovinos, obtendo duas vacas gestantes. No presente estudo, os ovócitos foram expostos à solução de vitrificação durante um minuto, tempo este talvez inadequado, visto a elevada osmolaridade desta solução.

Além do período de exposição de um minuto utilizado na solução de vitrificação deste estudo, o procedimento foi realizado a 4°C. Aman & Parks (1994) observaram injúrias nos ovócitos maturados *in vitro* e resfriados em temperaturas entre 25 e 4°C por um minuto. Martino et al. (1995) reportaram que ovócitos imaturos de bovinos foram prejudicados, quando resfriados a 0°C durante 30 segundos. Segundo esses autores, os ovócitos foram fecundados, mas com o desenvolvimento subsequente comprometido, provavelmente em decorrência de instabilidade dos fusos provocada pelo resfriamento (Saunders & Parks, 1999; Shaw et al., 2000). Souza (2001) afirmou que a temperatura da solução de vitrificação utilizada no experimento com ovócitos imaturos pode ter prejudicado o desenvolvimento após fecundação. Do mesmo modo, a temperatura utilizada neste experimento pode ter causado danos ao desenvolvimento após a fecundação dos ovócitos maturados *in vitro*.

Tabela 2 - Clivagem e desenvolvimento embrionário de ovócitos submetidos à fecundação *in vitro* após maturação (T0) ou maturados e vitrificados (T1 e T2)
Table 2 - Cleavage and embryo development from oocytes submitted to a fertilization *in vitro* after maturation (T0) or matured and vitrification (T1 and T2)

Tratamento <i>Treatment</i>	N	Clivados (%) <i>Cleavage</i>	Mórulas e Blastocistos (%) <i>Morulae and Blastocysts</i>
T0 (testemunha) <i>T0 (control)</i>	383	139 (36,3)	48 (34,5)
T1 (vitrificados) <i>T1 (vitrificated)</i>	161	0 (0)	0 (0)
T3 (desnudados vitrificados) <i>T3 (vitrificated desnudes)</i>	99	0 (0)	0 (0)

Conclusões

A associação do etilenoglicol, trehalose e polivinilpirrolidona adotada neste experimento não foi eficaz para a vitrificação de ovócitos bovinos, previamente maturados *in vitro* com *cumulus oophorus* ou desnudados.

Não existe relação entre a aparência morfológica do ovócito criopreservado, em microscopia convencional, e sua capacidade de desenvolvimento após a fecundação *in vitro*.

A criopreservação de ovócitos maturados de bovinos pelo método de vitrificação ainda não apresenta resultados consistentes e com repetibilidade, tendo em vista os resultados encontrados na literatura, inclusive o deste trabalho.

Agradecimento

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro para a execução deste experimento.

Literatura Citada

- AGCA, Y.; LIU, J.; PETER, A.T. et al. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membranewater and cryoprotectant permeability characteristics. **Molecular Reproduction Development**, v.49, p.408-415, 1998.
- AMAN, R.P.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.50, p.203-210, 1994.
- ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S. et al. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.8627, p.1-10, 2002.
- COSTA, E.P. **Aspectos morfológicos (citológicos e ultra-estruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos *in vitro***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. 155p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- DAHLI, A.; MANIK, R.S.; DAS, S.K. et al. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.1295-1303, 2000a.
- DAHLI, A.; MANIK, R.S.; DAS, S.K. et al. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.159-165, 2000b.
- FUKU, E.; LUI, J.; DOWNEY, B.R. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.177-185, 1995a.
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995b.
- HAMANO, S.; KOIKEDA, A.; KUWAYAMA, M. et al. Full-term development of *in vitro*-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v.38, p.1085-1090, 1992.
- HOCHI, S.; KOZAWA, M.; FUJIMOTO, T. et al. *In vitro* maturation a transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v.33, p.300-310, 1996.
- HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M. et al. Effect of nuclear stages during *ivm* on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.787-796, 1997.
- HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G. et al. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v.41, p.69-73, 2001.
- KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, A. et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution without appreciable loss viability. **Journal Reproduction Fertility**, v.89, p.91-97, 1990.
- LE GAL, F.; MASSIP, A. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v.38, p.290-300, 1999.
- LIM, J.M.; KO, J.J.; HWANG, W.S. et al. Development of *in vitro* matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.51, p.1303-1310, 1999.
- LUNA, H.S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence on stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.23-28, 2001.
- MARTINO, A.; POLLARD, J.W.; NAKAGATA, A. et al. The kinetics of chilling sensitivity of bovine oocytes cooled to non-physiological temperatures. **Theriogenology**, v.43, p.272, 1995.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996.
- MEN, H.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology**, v.57, p.1095-1103, 2002.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N. et al. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v.37, p.77-85, 1998.
- PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.54, p.651-658, 2000.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A. et al. Capacitation on bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1180, 1988.
- PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.9-22, 2000.
- RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, p.387-402, 1987.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electronmicroscopy. **Journal Cell Biology**, v.17, p.208-213, 1963.
- SAHA, S.; RAJAMAHENDRAN, R.; BOEDIONO, A. et al. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8, or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. **Theriogenology**, v.46, p.331-343, 1996.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação**

- animal.** Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SAUNDERS, K.M.; PARKS, J.E. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.61, p.178-187, 1999.
- SCHMIDT, M.; HYTTEL, P.; AVERY, B. et al. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.281-290, 1995.
- SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SIRARD, M.A.; BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.43, n.5, p.777-783, 1990.
- SOUZA, M.R. **Vitrificação de ovócitos imaturos de bovinos, com ou sem cumulus oophorus.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 54p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SUNG, E.; PARK, M.S.; CHUNG, H.M. et al. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxoltm, a cytoskeleton stabilizer. **Fertility and Sterility**, v.75, n.6, p.1177-1184, 2001.
- SUZUKI, T.; BOEDIONO, A.; TAKAGI, M. et al. Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle bovine oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. **Cryobiology**, v.33, p.515-524, 1996.
- WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical and Biochemical Cytology**, v.4, n.4, p.475-478, 1958.

Recebido em: 03/10/02

Aceito em: 08/12/03