

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
BIOLOGIA ANIMAL



Criopreservação de oócitos: efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

M^a do Carmo Madeira Santos Silva

Dissertação orientada por:
Doutora Rosa Lino Neto Pereira
Prof^a. Doutora Deodália Dias

Este trabalho insere-se no projeto “Propriedades da membrana e homeostase do cálcio em oócitos: estratégias inovadoras para a otimização da criopreservação”, financiado por fundos nacionais da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/CVT-REP/2863/2012).

As referências bibliográficas apresentadas nesta dissertação seguem as normas da revista *Reproduction*.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora externa, Doutora Rosa Lino Neto, pela disponibilidade constante, amizade, dedicação, conhecimento transmitido e apoio incansável durante todo o período decorrido.

À minha orientadora interna, Professora Doutora Deodália Dias, pela disponibilidade no esclarecimento de todas as dúvidas e pela revisão da tese.

Aos responsáveis do Polo de Atividades de Santarém do INIAV, Eng. Benvindo Maçãs, Doutora Olga Moreira e Doutor António Horta, pela simpatia com que me acolheram e pela possibilidade que me deram de realizar o estágio e o trabalho que suportou esta tese.

Às Doutoradas Conceição Baptista e Carla Marques, por todo o apoio, conhecimento, disponibilidade e carinho que sempre demonstraram.

Aos Doutores Sandra Cavaco Gonçalves e João Pedro Santa Clara Barbas, Dr. João Maria Nobre e Dra. Teresa Cunha, pelo carinho, interesse, preocupação e disponibilidade.

Ao Senhor Luís Inácio ao Francisco Almeida e ao Paulo Dias, pela disponibilidade e simpatia que sempre demonstraram.

À Ana, pela ajuda no laboratório, pela sua simpatia e amizade e também pelas boleias.

À Cláudia e Professora Doutora Graça Soveral, pela disponibilidade e ajuda nos ensaios realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

À Dra. Patrícia Rodrigues, por ter permitido acompanhar o seu trabalho no British Hospital em Lisboa, pela sua disponibilidade, interesse e ajuda.

Aos Doutores Rui Bessa e Susana Alves, pelo apoio e disponibilidade na análise estatística dos dados e pelos conhecimentos que me transmitiram.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Carolina Santos, Carolina Andrade, Joana e Beatriz.

À minha família, em especial aos meus pais, por todo o apoio, suporte e ajuda durante todo o meu percurso académico e principalmente pela paciência, pela preocupação e pelo acompanhamento na elaboração desta tese.

Ao Bernardo, por todo o apoio, os conselhos, o interesse e a ajuda.

RESUMO

A criopreservação de oócitos é uma técnica que embora apresentando taxas de sucesso muito baixas assume extrema importância nas questões relacionadas com a fertilidade humana, devido ao número crescente de doenças como o cancro, que podem conduzir à infertilidade. Por outro lado, contribui para a manutenção da biodiversidade e preservação das espécies em risco de extinção, onde a criopreservação de gâmetas e embriões é essencial. Este trabalho tem como objetivos aprofundar o conhecimento da fisiologia da criopreservação de oócitos e testar protocolos com crioprotectores (CPAs) diferentes. Foram avaliados os efeitos de dois protocolos de criopreservação contendo etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO) e sucrose ou 1,2-propanediol (PROH) e sucrose, e o efeito da diminuição do cálcio (Ca^{2+}) nos meios de vitrificação/aquecimento, em três experiências. Na experiência 1, os oócitos foram sujeitos ao processo de vitrificação enquanto na 2 foram sujeitos apenas ao processo de choque osmótico provocado pelos CPAs. Nestas experiências foi avaliado o efeito dos protocolos na viabilidade e posterior competência para o desenvolvimento dos oócitos após fertilização *in vitro*, em simultâneo com a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, da localização dos grânulos corticais e do tempo de digestão da zona pelúcida (ZP) de oócitos. Na experiência 3, foram analisadas a composição lipídica e a permeabilidade da membrana dos oócitos submetidos ao choque osmótico mas não vitrificados. As taxas de desenvolvimento obtidas foram superiores para oócitos sujeitos ao protocolo com EG+DMSO, tanto na experiência 1 como na 2 ($P \leq 0.04$), independentemente da presença de Ca^{2+} no meio. Foi identificado um efeito mais acentuado do choque osmótico e/ou toxicidade aliados a um possível endurecimento precoce da ZP assim como, menores concentrações de C18:1c11, nos complexos *cumulus* oócito (COCs) dos grupos com PROH. A permeabilidade dos oócitos foi alterada pela exposição a este CPA e Ca^{2+} ($P \leq 0.007$).

Assim conclui-se que o protocolo mais eficaz na criopreservação de oócitos bovinos é composto pela combinação dos CPAs EG+DMSO, independentemente da presença de Ca^{2+} . No entanto, foi identificada uma interação entre os CPAs e o Ca^{2+} em alguns parâmetros que deverá ser investigada.

Palavras-chave: criopreservação de oócitos; choque osmótico, crioprotectores; cálcio; bovinos.

ABSTRACT

Oocyte cryopreservation is a technique that still presents very low success rates. However it has extreme importance in issues related with human fertility due to the growing number of diseases such as cancer which can cause infertility. Additionally, it helps to maintain the biodiversity and preservation of endangered species in which the cryopreservation of gametes and embryos is essential. The focus of this paper is to implement a better understanding of the physiology of the oocyte cryopreservation and to test protocols with different cryoprotectors (CPAs). Two protocols were evaluated, one containing ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO) and sucrose while the other is composed by 1,2-propanediol (PROH) and sucrose. Both were submitted to a decrease on calcium (Ca^{2+}) through vitrification, divided in three different experiments. On experiment 1, the oocytes were subjected to the vitrification process while on experiment 2 they were only submitted to the process of osmotic shock induced by the CPAs. In these experiments the effect of different protocols on the viability and posterior competence of the oocytes for development after IVF have been evaluated. The evaluation of the mitochondrial membrane potential, cortical granules location and zona pellucida (ZP) time of digestion was simultaneously performed. In experiment 3, the lipid composition and the membrane permeability of the oocytes submitted to the osmotic shock without vitrification were analyzed. Independently of the presence of Ca^{2+} on the culture medium, the obtained developmental rates were superior for the oocytes submitted to the EG+DMSO protocol, in both experiences 1 and 2 ($P \leq 0.04$). An increased effect of the osmotic shock and/or toxicity was identified probably associated to a premature hardening of the ZP as well as to lower concentrations of C18:1c11 on the *cumulus* oocytes complexes in the groups with PROH. The oocytes permeability was changed by the exposure to this CPA and Ca^{2+} ($P \leq 0.007$).

In conclusion the most effective protocol for the cryopreservation of bovine oocytes is composed by the association of the CPAs EG+DMSO, independently of the presence of Ca^{2+} . However, it was identified an interaction between the CPAs and the Ca^{2+} on some parameters that should be further investigated.

Palavras-chave: oocyte cryopreservation; osmotic shock; cryoprotectors; calcium; bovine.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O COMPLEXO CUMULUS OÓCITO	2
1.2. VITRIFICAÇÃO	6
1.3. FATORES DETERMINANTES PARA O SUCESSO DA VITRIFICAÇÃO	8
1.4. O PAPEL DO CÁLCIO	10
1.5. CRIOPROTETORES	11
1.5.1. Crioprotetores permeantes	12
1.5.2. Crioprotetores não permeantes	13
1.6. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NO OÓCITO	13
1.6.1. Zona pelúcida	14
1.6.2. Membrana plasmática	14
1.6.3. Células do Cumulus	15
1.6.4. Citoesqueleto	15
1.6.5. Mitocôndrias	15
1.6.6. Potencial para o desenvolvimento	15
2. OBJETIVOS	17
3. METODOLOGIA	18
3.1. RECOLHA E MATURAÇÃO DOS OÓCITOS	18
3.2. CRIOPRESERVAÇÃO	19
3.2.1. Vitrificação	19
3.2.2. Aquecimento	20
3.3. FERTILIZAÇÃO E CULTURA IN VITRO DOS EMBRIÕES	21
3.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRÉ E PÓS-VITRIFICAÇÃO OU CHOQUE OSMÓTICO ...	23
3.4.1. Qualidade morfológica do oócito e estadio de maturação anterior à vitrificação	23
3.4.2. Capacidade de desenvolvimento dos oócitos	23

3.4.2.1.	Marcação dos grânulos corticais	23
3.4.2.2.	Potencial da membrana interna mitocondrial.....	24
3.4.2.3.	Medição da zona pelúcida e tempo de digestão da pronase	25
3.4.3.	Permeabilidade da membrana aos crioprotectores	25
3.4.4.	Composição lipídica dos oócitos e das células de <i>cumulus</i>	26
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
4.	RESULTADOS	31
4.1.	ESTADIO DE MATURAÇÃO ANTERIOR À VITRIFICAÇÃO	31
4.2.	CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO/CHOQUE OSMÓTICO E DE DESENVOLVIMENTO POSTERIOR	31
4.2.1.	Experiência 1	31
4.2.2.	Experiência 2	32
4.3.	POTENCIAL MITOCONDRIAL	33
4.4.	MARCAÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS	33
4.5.	DIGESTÃO DA ZONA PELÚCIDA	35
4.6.	COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO COMPLEXO <i>CUMULUS</i> OÓCITO	35
4.7.	PERMEABILIDADE DA MEMBRANA AOS CRIOPROTETORES.....	38
5.	DISCUSSÃO	40
6.	CONCLUSÃO	46
7.	BIBLIOGRAFIA	47
8.	ANEXOS	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Fotografia em microscopia de contraste de fase do complexo cumulus oócito	2
Figura 2 Esquema representativo da disposição dos organelos celular no oócito em diferentes fases de maturação, vesícula germinal e metafase II (adaptado de Ferreira et al. 2009).....	3
Figura 3 Fotografia em microscopia de contraste de fase (ampliação 100x), 22 horas após a fertilização, de um presumível zigoto rodeado por espermatozoides. As setas apontam para alguns espermatozoides mais visíveis na imagem.....	22
Figura 4 Fotografias de microscopia de fluorescência (ampliação 200x) dos grânulos corticais em oócitos maturados. a) grânulos corticais localizados na periferia; b) exocitose incompleta dos grânulos corticais; c) exocitose completa dos grânulos corticais	24
Figura 5 Fotografias em microscópio invertido (ampliação 400x) que representam as mudanças de volume dos oócitos na avaliação da permeabilidade da membrana plasmática aos crioprotetores. a) oócito antes do choque osmótico, b) oócito encolhido pela ação da exposição aos crioprotetores.....	26
Figura 6 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, no potencial de membrana mitocondrial dos oócitos, sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico á esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico á direita); Cont., controlo; letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência (P<0.05).....	33
Figura 7 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, na localização dos grânulos corticais nos oócitos sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico á esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico á direita). Lin, grânulos corticais à periferia; Inc, exocitose incompleta; Exo, exocitose; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência (P<0.05); letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre categorias de grupos da mesma experiência (P<0.05).....	34
Figura 8 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, no tempo de digestão (minutos) da zona pelúcida, de oócitos sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico á esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico á direita). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência (P<0.05).	35
Figura 9 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) 7.5% + dimetilsulfóxido (DMSO) 7.5% e 1,2-propanediol (PROH) 2M, com e sem cálcio, na permeabilidade da membrana (Ps, x10 ⁻⁶ cm/s) de oócitos sujeito ao choque osmótico; letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (P<0.05).....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Condições de vitrificação para o protocolo constituído por etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO)	20
Tabela 2 Condições de vitrificação para o protocolo constituído por 1,2-propanediol (PROH)	20
Tabela 3 Condições de aquecimento para o protocolo constituído por etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO)	21
Tabela 4 Condições de aquecimento para o protocolo constituído por 1,2-propanediol (PROH)	21
Tabela 5 Efeito dos crioprotetores etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH) com cálcio e sem cálcio, na sobrevivência e produção de embriões de oócitos sujeitos ao processo de criopreservação.	31
Tabela 6 Efeito dos crioprotetores etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com cálcio e sem cálcio, na produção de embriões de oócitos sujeitos ao choque osmótico.	32
Tabela 7 Composição em ácidos gordos de oócitos e respetivas células do cumulus, sujeitos ao choque osmótico, nos diferentes protocolos etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH).	36
Tabela 8 Composição em ácidos gordos do meio de maturação dos complexos cumulus oócito.	38
Tabela 9 Crioprotetores	53
Tabela 10 Meio de lavagem 1 (W1)	53
Tabela 11 Meio de maturação dos complexos cumulus oócitos.....	53
Tabela 12 Meio de fertilização (FERT) e meio de lavagem 2 (W2)	54
Tabela 13 Meio de fluído sintético do oviduto (SOF)	55
Tabela 14 Meio de transferência de embriões	55
Tabela 15 Meio de cultura in vitro de embriões.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

%	percentagem
µg	microgramas
µL	microlitros
µM	micromolar
AGMI	ácidos gordos monoinsaturados
AGPI	ácidos gordos polinsaturados
AGT	ácidos gordos totais
ATP	adenosina trifosfato
BHT	butil-hidroxitolueno
BSA	proteína albomina de soro bovino
C14:0	ácido mirístico
C15:0	ácido pentadecanóico
C16:0	ácido palmítico
C16:1c9	ácido palmitoleico
C17:0	ácido margárico
C18:0	ácido esteárico
C18:1c9	ácido oleico
C18:1c11	ácido <i>cis</i> -vacénico
C18:2n-6	ácido linoleico
C18:3n-3	ácido α-linolénico
C19:0	ácido nonadecanóico
C20:0	ácido araquídico
C20:1	ácido eicosanóico
C20:4n6	ácido araquidónico
C21:0	ácido heneicosanóico
Ca²⁺	cálcio
CC	células do <i>cumulus</i>
ClCa²⁺	cloreto de cálcio
CO₂	dióxido de carbono

COC	complexo <i>cumulus</i> oócito
CPA	crioprotetor
DMSO	dimetilsulfóxido
EG	etilenoglicol
FBS	soro fetal bovino
FERT	meio de fertilização
FSH	hormona folículo estimulante
GC-MS	cromatografia gasosa com espectrometria de massa
GLY	glicerol
HCl	ácido clorídrico
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetrametilbenzimidazolilcarbocianina iodeto
M	molar
Mg²⁺	magnésio
MII	metáfase II
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mOsm	miliosmol
N₂	azoto
Nº	número
NBCS	soro de vitelo recém nascido
NL₂	azoto líquido
O	oócitos
O₂	oxigénio
°C	graus celsius
OCS	soro de vaca em cio
PBS	tampão fosfato salino
PNA-FITC	<i>fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin</i>
PROH	1,2-propanediol
rpm	rotações por minuto

SAS	<i>statistical analysis systems</i>
SE	solução de equilíbrio
seg	segundos
SOCS	soro de vaca superovulada em cio
SOF	fluido sintético do oviduto
SNARE	<i>soluble NSF attachment receptor</i>
spzs	espermatozoides
SV	solução de vitrificação
TCM	<i>tissue culture medium</i>
VG	vesícula germinal
W1	meio de lavagem 1
W2	meio de lavagem 2
ZP	zona pelúcida

1. INTRODUÇÃO

A preservação da fertilidade humana e a criopreservação de oócitos e embriões tornou-se, nos últimos tempos, uma prioridade da medicina pelo risco muito elevado de doenças como o cancro. O desenvolvimento do conhecimento destas doenças e os avanços da ciência permitem um crescente número de casos de cura, mas que frequentemente têm como consequência a infertilidade (Tinneberg & Gasbarrini 2013), em resultado dos tratamentos aos quais os pacientes são sujeitos. Um outro aspeto importante é a preservação das espécies em risco de extinção e a preservação dos recursos genéticos em animais selvagens e domésticos, para o que a criopreservação de gâmetas constitui uma ferramenta importante no desenvolvimento de técnicas eficientes de reprodução assistida (Cocchia *et al.* 2010).

A criopreservação de embriões é já uma técnica bem-sucedida e largamente implementada desde o início da reprodução medicamente assistida (Cobo *et al.* 2013). Contudo, não é uma solução para garantir a manutenção da função reprodutiva nos casos de cancro precoce, e estes constituem uma situação cada vez mais frequente e preocupante nos dias de hoje.

Desde 1986, quando foi reportada a primeira gravidez resultante de um oócito criopreservado (Chen 1986), têm sido feitos esforços no sentido de desenvolver um método ideal de criopreservação de oócitos, mas esta técnica ainda apresenta atualmente taxas de sucesso muito baixas (Cobo *et al.* 2013). A criopreservação é dificultada por vários fatores, sendo os principais o tamanho e a forma do oócito e a grande quantidade de água armazenada na célula que conduz à formação de gelo intracelular (cristais de gelo) originando lesões por frio e danos osmóticos (Pereira & Marques 2008, Cobo *et al.* 2013).

A perda do potencial de desenvolvimento após a criopreservação, torna os oócitos de mamíferos um dos tipos de células mais difíceis de criopreservar (Ledda *et al.* 2000). Os oócitos criopreservados apresentam a taxa de sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento diminuídas, provavelmente como resultado de danos morfológicos e citológicos induzidos pelo processo de criopreservação (Albarracín *et al.* 2005).

1.1. O COMPLEXO *CUMULUS* OÓCITO

O oócito é o gâmeta feminino, constituído pelo ooplasma, nome atribuído ao seu citoplasma, pela zona pelúcida, uma membrana glicoproteica espessa que rodeia a membrana plasmática, e pelo núcleo, apenas visível no oócito imaturo. Os diversos organelos que o constituem incluem mitocôndrias, grânulos corticais, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e ribossomas, que apresentam uma distribuição celular diferente de acordo com a fase de maturação em que se encontra o oócito (Antunes *et al.* 2008).

O oócito é a maior célula existente nos mamíferos (Moussa *et al.* 2014) com cerca de 100 µm de diâmetro. Devido à sua forma esférica, tem uma baixa razão de área/volume de superfície comparativamente com os embriões que são constituídos por várias células agrupadas (Coticchio *et al.* 2004).

Biologicamente, os oócitos não estão isolados. No interior dos folículos ováricos estão rodeados por várias camadas de células do *cumulus* formando o complexo *cumulus* oócito (COC) (representado na figura 1).

As células do *cumulus* desempenham um papel importante na maturação do oócito. Estas células facilitam a passagem de nutrientes,

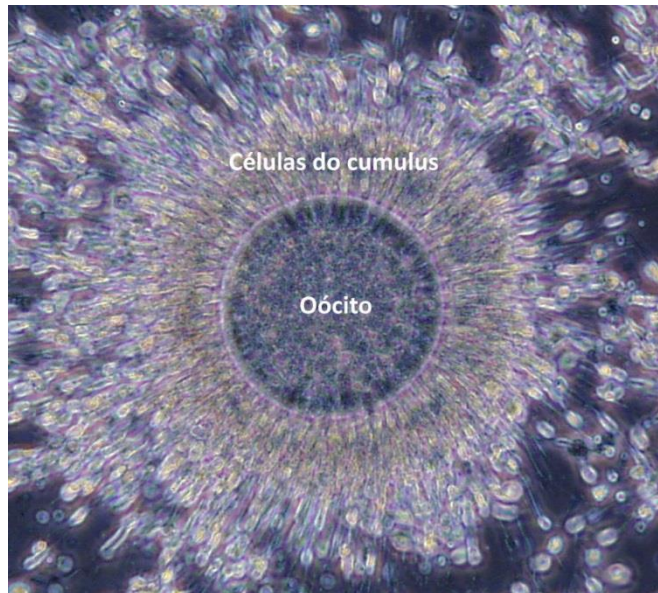


Figura 1 Fotografia em microscopia de contraste de fase do complexo *cumulus* oócito

substâncias reguladoras e pequenas moléculas, para o oócito via ligações *gap junctions* e são essenciais para o seu crescimento e posterior fertilização (Prates *et al.* 2013). Foi demonstrada que a presença das células do *cumulus* em contacto com o oócito melhora as taxas de fertilização através da secreção de moléculas que participam no processo de capacitação dos espermatozoides (spzs) e facilitam a interação dos spzs capacitados com a zona pelúcida (ZP) (Cox *et al.* 1993, Tanghe *et al.* 2003). As células do *cumulus* são necessárias para manter a capacidade para a fertilização dos oócitos vitrificados (Kohaya *et al.* 2011), embora em oócitos denudados se possa recorrer à injeção intracitoplasmática de spz para ultrapassar este problema.

Contudo, a presença de um número excessivo de camadas de células do *cumulus*, firmemente compactadas em torno dos oócitos, pode torna-los mais sensíveis à criopreservação. Esta maior sensibilidade pode resultar da alteração da velocidade e extensão da desidratação do oócito, (Luvoni & Pellizzari 2000) e/ou da diminuição da velocidade de penetração dos crioprotetores (CPAs) (Sprícigo *et al.* 2014), passos essenciais ao processo de criopreservação.

Durante o processo de desenvolvimento do oócito, o COC sofre alterações morfológicas. Numa fase inicial do desenvolvimento, em que o oócito ainda se encontra num estadio imaturo, o COC é caracterizado pela presença várias camadas de células do *cumulus* não expandidas. Numa fase mais avançada, o oócito maduro está rodeado por numerosas camadas de células do *cumulus* expandidas (Lonergan *et al.* 2003).

A maturação do oócito é uma fase importante da reprodução sendo um longo processo onde são adquiridas as competências necessárias à fertilização e ao desenvolvimento embrionário (Hyttle *et al.* 1997). Este processo compreende duas fases, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática caracterizadas pela segregação dos cromossomas e pela redistribuição dos organelos citoplasmáticos e síntese/metabolização de vários componentes, respetivamente (Mao *et al.* 2014).

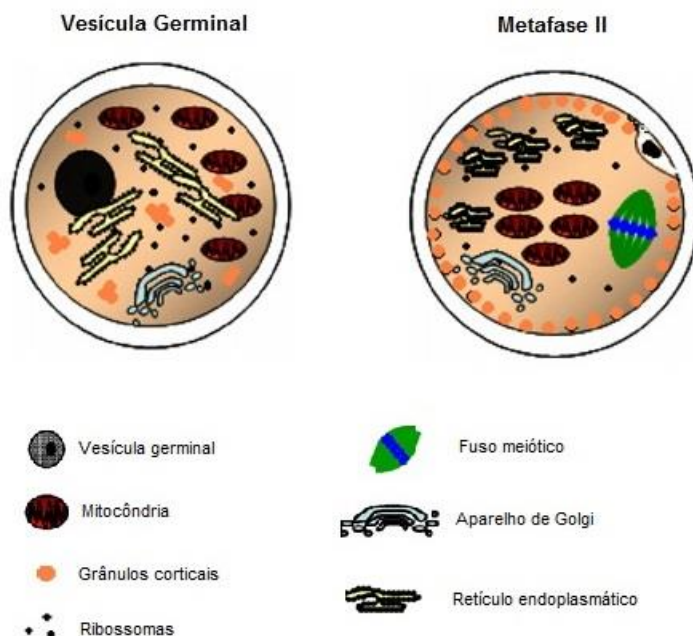


Figura 2 Esquema representativo da disposição dos organelos celular no oócito em diferentes fases de maturação, vesícula germinal e metafase II (adaptado de Ferreira *et al.* 2009)

Durante a maturação nuclear ocorre a condensação da cromatina com a posterior formação dos cromossomas que ficam alinhados formando a placa equatorial característica da fase final da maturação do oócito, a metafase II. Ocorre também a formação e extrusão do primeiro glóbulo polar resultante da meiose I, ficando o oócito preparado para a fertilização (Albertini 1992).

Por sua vez, durante a maturação citoplasmática existe a alteração da disposição dos

organelos no citoplasma do oócito que varia de acordo com as necessidades celulares durante cada fase do seu desenvolvimento (Ferreira *et al.* 2009). Pode verificar-se na figura 2, as diferenças na disposição dos organelos numa fase inicial de desenvolvimento em que o oócito é considerado imaturo – fase de vesícula germinal (VG), e também numa fase final de desenvolvimento em que o oócito está maturo – metafase II (MII). Destacam-se ainda no processo de maturação citoplasmática do oócito a redistribuição de alguns dos organelos que o constituem como os grânulos corticais e as mitocôndrias cuja disposição é essencial para o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário.

Os grânulos corticais são vesículas exclusivas dos oócitos, formadas a partir do aparelho de *Golgi* (Calhaz Jorge 2005), cujo padrão de distribuição pode ser considerado um critério de maturação citoplasmática em bovinos (Wang *et al.* 1997). A localização dos grânulos corticais tal como o retículo endoplasmático no oócito maturado é essencial para a fertilização uma vez que estes organelos desempenham um papel importante no bloqueio da entrada de mais de um spz (Ferreira *et al.* 2009). O mecanismo de bloqueio da polispermia inicia-se com a entrada do spz no oócito que induz a libertação de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (Coy *et al.* 2002), proveniente do retículo endoplasmático. A exposição ao Ca^{2+} causa a excitose dos grânulos corticais, alinhados na proximidade da membrana plasmática durante a maturação, que se fundem com a membrana plasmática do oócito libertando moléculas para o espaço perivitelino (espaço entre a zona pelúcida e a membrana plasmática do oócito). Esta ação resulta no endurecimento da ZP que impede a entrada dos spzs (Coy *et al.* 2008, Carlson 2009). Também ocorrem alterações a nível da membrana plasmática do oócito que contribuem para prevenir a polispermia, como a rápida despolimerização da membrana após a entrada do spz que impede a adesão de outros spzs (Carlson 2009).

Por outro lado, as mitocôndrias são organelos importantes indispensáveis ao desenvolvimento oocitário e embrionário. A sua distribuição varia de acordo com o estado de maturação sendo também considerado um critério para a aferição da maturação e qualidade do oócito. De facto, Stojkovic *et al.* (2001) evidenciaram uma associação entre a distribuição das mitocôndrias e a qualidade do COC. Estes autores classificaram morfológicamente a homogeneidade do ooplasma e a compactação das células do *cumulus*, correlacionando-as positivamente com a redistribuição das mitocôndrias para a região central do citoplasma. Igualmente estes COC com uma boa morfologia apresentavam um maior conteúdo de adenosina trifosfato (ATP) que conduzia a um melhor desenvolvimento embrionário. Pelo

contrário, uma distribuição anormal das mitocôndrias durante a maturação reduz a competência para o desenvolvimento embrionário (Nagai *et al.* 2006).

Durante a maturação, o enriquecimento do ooplasma em substâncias nutritivas é essencial para o suporte do desenvolvimento embrionário posterior (Prates *et al.* 2014). Os COCs estão expostos a um determinado ambiente durante a maturação que pode afetar o sucesso da fertilização e o consequente desenvolvimento embrionário (Sutton *et al.* 2003a; Sutton-McDowall *et al.* 2010) pois é necessário, para além das reservas energéticas internas do oócito, também um substrato energético externo de forma a este atingir um forte potencial de desenvolvimento (Dunning *et al.* 2014).

A produção de energia, sob a forma de ATP, é essencial para sustentar a meiose durante a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário pré-implantatório (Paczkowski *et al.* 2013). Tanto os lípidos como os glúcidos são importantes fontes de energia utilizados durante a maturação. Comparativamente, os ácidos gordos são uma maior fonte energética que a glucose (106 moléculas de ATP produzidas na oxidação de uma molécula de ácido gordo simples para 30 moléculas de ATP por molécula de glucose) (Dunning *et al.* 2014) porém, são duas fontes de energia que funcionam alternadamente, verificando-se que quando diminui a oxidação de ácidos gordos, aumenta a oxidação da glucose (Paczkowski *et al.* 2013).

No caso dos lípidos, os ácidos gordos são armazenados no interior do oócito sobretudo como triglicéridos dentro das gotículas lipídicas, sendo estes os lípidos mais abundantes nos oócitos bovinos (Lapa *et al.* 2011). Durante a maturação, os lípidos são incorporados no citoplasma dos oócitos a partir do soro adicionado ao meio de cultura (fonte externa de lípidos) verificando-se uma alteração no conteúdo de triglicéridos e colesterol dos oócitos (Kim *et al.* 2001). O conteúdo lipídico dos oócitos diminui durante a maturação sendo assim considerado uma fonte de energia importante para a maturação (Ferguson & Leese 1999, Kim *et al.* 2001). Os triglicéridos armazenados nas gotículas lipídicas são hidrolisados resultando na libertação de ácidos gordos livres que são metabolizados nas mitocôndrias através da β -oxidação para produção de ATP (Dunning *et al.* 2014). Segundo Auclair *et al.* (2013), as células do *cumulus* fornecem ácidos gordos livres ao oócito que contribuem para o seu armazenamento, verificando-se uma diminuição das reservas lipídicas intracelulares do oócito durante a maturação na ausência destas células. Assim sendo, a ausência das células do *cumulus* durante a maturação afeta o metabolismo dos lípidos no oócito (Auclair *et al.* 2013)

sugerindo uma perda de capacidade de armazenamento do oócito ou uma necessidade energética maior gastando mais reservas lipídicas (Dunning *et al.* 2014). De forma a verificar a importância da β -oxidação dos ácidos gordos para a maturação dos oócitos, Ferguson e Leese (2006) utilizaram um inibidor da oxidação dos ácidos gordos que bloqueia a sua entrada nas mitocôndrias impedindo a oxidação. Estes autores verificaram que os oócitos maturados com esta substância apresentavam a capacidade de desenvolver embriões reduzida ou seja, baixo potencial de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, num estudo comparando oócitos de porco, bovino e rato, foi possível concluir que a importância do metabolismo dos lípidos varia de acordo com a espécie e que se revela mais importante em espécies cujos oócitos são mais ricos em substâncias lipídicas, como o porco e o bovino, sendo no entanto indispensável ao completo processo de maturação mesmo em oócitos de rato que contêm um conteúdo lipídico reduzido (Paczkowski *et al.* 2013).

Relativamente ao metabolismo da glucose, um outro metabolito essencial para o COC, tem a particularidade de ser preferencialmente metabolizada pelas células do *cumulus*, uma vez que o oócito tem uma baixa capacidade de absorver a glucose, sendo assim dependente destas células para fornecer os substratos derivados da oxidação da glucose necessários à maturação (Cetica *et al.* 1999). A glucose entra nas células do *cumulus* e é convertida principalmente em piruvato ou lactato que pode então entrar diretamente no oócito e ser utilizado para a produzir ATP (Sutton *et al.* 2003b, Sutton-McDowall *et al.* 2010). Segundo um estudo relativo ao metabolismo da glucose e dos lípidos em oócitos denudados e em células do *cumulus*, verificou-se que o metabolismo da glucose nas células do *cumulus* é proporcional ao metabolismo dos lípidos no oócito demonstrando um equilíbrio no metabolismo do COC, em que o metabolismo das células do *cumulus* está adaptado para controlar o fluxo de metabolitos para o oócito durante a maturação (Cetica *et al.* 2002).

1.2. VITRIFICAÇÃO

A criopreservação dos oócitos pode ser realizada por dois métodos: a congelação lenta e a vitrificação. Está bem estabelecido que a congelação lenta é extremamente prejudicial para os oócitos, apresentando a vitrificação resultados mais promissores (Pereira & Marques 2008).

A definição de vitrificação é a solidificação de uma solução, a uma temperatura muito baixa e sem a formação de cristais de gelo, através do aumento da viscosidade conseguida por velocidades de arrefecimento muito elevadas (Mukaida & Oka 2012). A ausência de cristais de gelo é resultado da passagem do fluido para um estado sólido não estruturado semelhante a um vidro, fenómeno que dá nome à técnica (Cabodevila & Teruel 2001). Esta técnica aplicada aos oócitos, é uma forma de arrefecimento ultra-rápida que utiliza concentrações muito elevadas de CPAs, impedindo a formação de cristais de gelo (Smith *et al.* 2011) e minimizando os danos causados no COC (Cocchia *et al.* 2010). Por este processo, a maior parte da água constituinte do oócito é substituída pelos CPAs (Ciani *et al.* 2012) e os oócitos são desidratados através de uma rápida exposição a uma solução concentrada de CPAs antes das amostras serem mergulhadas diretamente em azoto líquido (NL₂) (Smith *et al.* 2011).

A criopreservação envolve o controlo de muitas variáveis como o tipo de CPA utilizado, o método aplicado para a sua adição e remoção, as taxas de arrefecimento e aquecimento entre outros. O desenvolvimento de métodos bem sucedidos para a criopreservação de oócitos requer a compreensão dos efeitos de cada variável e a interação entre eles (Díez *et al.* 2005, 2012).

A adição dos CPAs é feita na fase que antecede a vitrificação. As células são expostas a um ambiente hipertónico e o aumento da concentração do soluto extracelular gera um gradiente osmótico através da membrana, que causa a saída da água da célula induzindo à sua desidratação (Ambrosini *et al.* 2006). Após a descongelação ou durante o aquecimento, é feita a remoção dos CPAs das células que recuperam o volume devido ao influxo de água extracelular até à estabilização atingindo o volume isotónico (Si *et al.* 2006). Todo este processo de desidratação e reidratação é determinado pela permeabilidade da membrana plasmática e por fatores externos como a composição e concentração de CPAs no exterior da célula, o tempo de exposição e a temperatura (Liu *et al.* 2012).

Na maioria dos protocolos de vitrificação, a exposição aos CPAs é realizada em dois passos devido à elevada concentração necessária, que poderia reduzir a viabilidade dos oócitos como consequência dos danos osmóticos e da elevada toxicidade (Liu *et al.* 2012). Inicialmente os oócitos são expostos a metade da concentração final de vitrificação, onde são mantidos durante alguns minutos e posteriormente são introduzidos no meio de vitrificação com uma elevada concentração de CPAs durante apenas alguns segundos (Vajta *et al.* 1999, Chian *et al.* 2004, Kuwayama *et al.* 2005)

Nos primeiros protocolos de vitrificação, os oócitos eram submetidos a elevadas concentrações de CPAs por longos períodos de tempo (até 50 minutos), o que resultava numa elevada toxicidade e num grande *stress* osmótico. Estudos posteriores melhoraram substancialmente os protocolos iniciais aplicando uma mistura de CPAs com diferentes características bioquímicas de forma a minimizar o *stress* osmótico (Cobo *et al.* 2013).

O processo de vitrificação é ainda o resultado de observações empíricas (Smith *et al.* 2011). Estão ainda muitas perguntas por responder e por compreender muitos dos mecanismos celulares que estão envolvidos na criopreservação de oócitos, sendo necessários estudos mais aprofundados que permitam desenvolver protocolos mais eficientes e aumentar as taxas de sucesso desta técnica.

1.3. FATORES DETERMINANTES PARA O SUCESSO DA VITRIFICAÇÃO

Existem diversos fatores que afetam o sucesso da criopreservação de oócitos que serão abordados nos pontos seguintes. Um importante fator que afeta a criopreservação dos oócitos é a fase de maturação em que são vitrificados. Esta fase está relacionada com diferentes propriedades tais como a relação metabólica entre os oócitos e as células do *cumulus*, a permeabilidade da membrana plasmática, a presença ou ausência da membrana nuclear, a presença ou ausência da configuração do fuso e dos cromossomas (Sprícigo *et al.* 2014).

Tradicionalmente os oócitos são criopreservados em fase MII (Clark & Swain 2013) uma vez que é a fase do ciclo celular da meiose que apresenta melhores resultados após a vitrificação (Men *et al.* 2002, Mo *et al.* 2014). Esta fase é caracterizada pela presença do fuso acromático periférico, formado pelos microtúbulos, que se estendem de um pólo ao outro e, de cada pólo, para os cinetócoros dos cromossomas que se encontram alinhados ao longo da placa metafásica (Ambrosini *et al.* 2006).

A fase VG ainda apresenta o núcleo com o material genético em forma de cromatina rodeada pela membrana nuclear. Assim, cada uma das fases do ciclo da meiose tem determinadas características que permitem a sua diferenciação visual. Segundo Mo *et al.* (2014), a tolerância dos oócitos à criopreservação aumenta com as fases de maturação e, quanto mais avançada for a fase de maturação do oócito, mais tolerante será à

criopreservação. No entanto, em fase MII, os oócitos estão suscetíveis à desorganização do fuso meiótico seguido da despolimerização dos microtúbulos e dos cromossomas, podendo resultar em fenómenos de aneuploidia. Estas alterações poderiam ser superadas através da vitrificação de oócitos em fase VG, pois nesta fase de desenvolvimento, os oócitos não apresentam a estrutura microtubular do fuso acromático organizada e os cromossomas estão descondensados e envolvidos pela membrana nuclear (Rojas *et al.* 2004, Ruppert-Lingham *et al.* 2006, Sprícigo *et al.* 2014). Porém, na fase de VG, os oócitos são menos permeáveis à água e aos CPAs e mais sensíveis à criopreservação (Agca *et al.* 1998), tendo como consequência os danos ao nível da membrana citoplasmática (Arav *et al.* 1996, Díez *et al.* 2005) e a perda da integridade das ligações entre o oócito e as células do *cumulus* – quebra das *gap junctions* (Díez *et al.* 2005).

A membrana plasmática do oócito, composta por fosfolípidos, colesterol, outros lípidos e proteínas (Seidel 2006), tem extrema importância para o sucesso do processo de vitrificação porque regula a taxa de fluxo da água e dos CPAs do oócito (Matos *et al.* 2015). A permeabilidade da membrana está dependente do nível de colesterol presente e da proporção de colesterol/fosfolípidos, determinando a sua fluidez e a sua sensibilidade ao frio (Horvath & Seidel 2006), que consequentemente afetará a sobrevivência dos oócitos criopreservados (Yamaji *et al.* 2011). Teoricamente, quanto maior for a permeabilidade da membrana à água e aos CPAs, menor será o *stress* osmótico causado pelo movimento dos fluidos, uma vez que membranas mais flexíveis são mais resistentes e apresentam menos lesões membranares (Seidel 2006). Porém, quando a permeabilidade é elevada, a concentração de CPAs no oócito pode ser demasiado alta, conduzindo a um efeito tóxico prejudicial (Yamaji *et al.* 2011). Por outro lado, se a permeabilidade for baixa não entrará quantidade suficiente de CPA que impeça a formação de gelo intracelular resultante do processo de vitrificação (Yamaji *et al.* 2011), sendo essencial atingir um equilíbrio que garanta o sucesso da criopreservação.

A permeabilidade da membrana aos CPAs pode ser medida através da velocidade das mudanças de volume correspondentes à saída da água e à entrada dos CPAs. Consequentemente, quando é referido que um CPA apresenta uma permeabilidade mais baixa indica que este entra na célula mais lentamente, não significando que entra em menor quantidade, mas sim que precisará de mais tempo para penetrar no oócito.

Um outro aspeto relevante para o processo de criopreservação dos oócitos é o seu conteúdo lipídico citoplasmático uma vez que este influencia a tolerância das células à criopreservação (Clark & Swain, 2013). Estudos realizados em embriões de bovino evidenciaram que os embriões com maior teor lipídico são mais sensíveis à criopreservação (Abe *et al.* 2002, Pereira *et al.* 2007). Igualmente oócitos com maior teor lipídico, como no caso dos bovinos, serão mais sensíveis à criopreservação (Ledda *et al.* 2000, Hwang & Hochi 2014).

No caso particular dos oócitos bovinos, apesar de terem um teor lipídico citoplasmático muito superior ao dos oócitos humanos, são o melhor modelo animal de estudo comparativamente com o ratinho (Chian *et al.* 2004) devido às muitas semelhanças a nível das vias endócrinas, parácrinas e autócrinas, dos ciclos reprodutivos, do tamanho dos ovários e dos oócitos, na ativação do genoma embrionário, no desenvolvimento de apenas um folículo pré-ovulatório durante cada ciclo, e a interação do oócito com o meio de cultura (Chian *et al.* 2004).

É importante destacar o papel importante das mitocôndrias na viabilidade do oócito e no conseqüente desenvolvimento embrionário. As mitocôndrias são o organelo mais abundante nos oócitos de mamífero sendo responsáveis pela produção de energia sob a forma de ATP, indispensável à maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário pré-implantatório (Nagai *et al.* 2006).

Por fim, a ZP tem um papel essencial na fertilização participando no processo de bloqueio da entrada de vários espermatozóides no oócito, juntamente com a membrana plasmática, prevenindo o fenómeno de polispermia. Assim, os possíveis danos causados a nível da ZP pela vitrificação poderão comprometer a correta fertilização do oócito (Moussa *et al.* 2014).

1.4. O PAPEL DO CÁLCIO

O Ca^{2+} é um mensageiro de sinalização intracelular omnipresente, envolvido em muitos processos biológicos incluindo a fertilização (Succu *et al.* 2011). Na fertilização, a penetração do spz no oócito causa um aumento intracelular de Ca^{2+} que poderá ser proveniente do

retículo endoplasmático (reservatório intracelular de cálcio) e também do meio extracelular (Larman *et al.* 2006).

Durante a criopreservação dá-se frequentemente o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular devido à exposição aos CPAs e ao frio que conduz à inviabilização do oócito (Mattioli *et al.* 2003). A hipótese da concentração de Ca^{2+} extracelular poder influenciar o aumento de Ca^{2+} intracelular não é ainda consensual sendo assim um dos objetivos deste trabalho o estudo do efeito da ausência/redução de Ca^{2+} nos meios de vitrificação e a possível variação da sua concentração no interior do oócito.

Existem diversos estudos relacionados com o Ca^{2+} extracelular revelando tanto efeitos positivos como negativos. Num estudo recente em oócitos ovinos, Succu *et al.* (2011) verificou que a redução/remoção do Ca^{2+} do meio de vitrificação diminui a ativação partenogénica no oócito, concluindo que este ponto pode justificar a baixa eficiência da criopreservação. Outros estudos em oócitos de rato mostraram que a ausência de Ca^{2+} no meio melhora a penetração do spz na ZP e a taxa de fertilização (Fujiwara *et al.* 2010).

Porém, nem todos os estudos realizados demonstraram efeitos benéficos da ausência do Ca^{2+} no meio. Por exemplo Kohaya *et al.* (2011) não encontrou diferenças significativas em oócitos de rato. Segundo Larman *et al.* (2006), o aumento de Ca^{2+} intracelular devido à exposição aos CPAs depende do CPA sendo que no caso do DMSO, a ausência de Ca^{2+} no meio não teve efeito na diminuição do Ca^{2+} intracelular, sugerindo que a fonte de Ca^{2+} neste caso é interna, possivelmente derivada do retículo endoplasmático. Por outro lado, em relação ao EG verificou-se que a remoção do Ca^{2+} extracelular influenciava a concentração de Ca^{2+} intracelular, remetendo para uma fonte externa de Ca^{2+} , presente no meio que penetra na membrana do oócito.

1.5. CRIOPROTETORES

Os CPAs são substâncias químicas utilizadas na criopreservação para impedir a formação de cristais de gelo e o efeito do choque osmótico provocado pelo processo (Pereira & Marques 2008). De uma forma geral, estas substâncias atuam ao nível da estabilização das membranas celulares, promovem a saída da água intracelular e reduzem a concentração de eletrólitos do meio extracelular (Cabodevila & Teruel 2001). No processo de vitrificação há a

necessidade de utilizar concentrações muito elevadas destas substâncias, de forma a permitir a vitrificação da solução em azoto líquido e evitar a cristalização durante o arrefecimento (Kasai *et al.* 1990).

São classificados de acordo com a sua capacidade de penetrar dentro das células como permeantes e não permeantes.

1.5.1. Crioprotetores permeantes

Os CPAs permeantes consistem em pequenas moléculas que penetram na membrana das células, formam ligações de hidrogénio com as moléculas de água (Chang *et al.* 2011) e baixam a temperatura de congelação (Pereira & Marques 2008). Ao reduzir a temperatura à qual ocorre a cristalização do gelo e a tendência da solução para cristalizar (Shaw & Jones 2003), os CPAs previnem a formação de cristais de gelo no meio intracelular (Chang *et al.* 2011).

Incluídos no grupo dos CPAs mais permeáveis utilizados na criopreservação de oócitos estão o etilenoglicol (EG) (Fujiwara *et al.* 2010), o dimetilsulfóxido (DMSO) (Kohaya *et al.* 2011), o 1,2-propanediol (PrOH) (Chian *et al.* 2004) e o glicerol (GLY) (Luvoni 2006).

O EG, o DMSO e o PrOH são os três CPAs convencionais mais utilizados nos protocolos de criopreservação. Penetram rapidamente no citoplasma das células e formam ligações de hidrogénio com as moléculas de água para prevenir a cristalização da água (Aye *et al.* 2010).

Estes CPAs têm propriedades semelhantes entre si (solubilidade em água a baixas temperaturas, permeabilidade celular e toxicidade relativamente baixa) embora cada um deles tenha diferentes graus de permeabilidade membranar e características específicas (Ciani *et al.* 2012).

Apesar da importância da penetração dos CPAs no oócito para evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, concentrações elevadas de CPAs nas soluções de vitrificação são tóxicas. A minimização da toxicidade das soluções de vitrificação compreende a utilização de substâncias menos tóxicas, a associação de diferentes CPAs, a exposição prévia a concentrações mais baixas de CPAs e a redução do tempo de exposição às soluções de vitrificação (Cocchia *et al.* 2010).

Os CPAs podem penetrar no interior do oócito por difusão simples através da bicamada fosfolipídica ou por difusão facilitada através de canais localizados na membrana plasmática sendo que, quando a passagem é feita por difusão simples, a permeabilidade será mais baixa e estará dependente da temperatura contrariamente aos movimentos por difusão facilitada, que são menos afetados pela temperatura e em que a permeabilidade da membrana é elevada (Jin *et al.* 2011).

Segundo Tian *et al.* (2007) a presença de DMSO e EG nos meios de vitrificação pode ativar a partenogênese em oócitos ovinos maturados *in vitro*, o que foi também demonstrado em oócitos de rato em MII (Van Der Elst *et al.* 1992).

1.5.2. Crioprotetores não permeantes

Os CPAs não permeantes são substâncias não-tóxicas, como os açúcares (Díez *et al.* 2012), que permanecem no exterior da célula (Pereira & Marques 2008) permitindo a remoção da água livre do interior da célula e a desidratação do espaço intracelular (Pereira & Marques 2008). A sua presença é necessária para diminuir o impacto negativo dos CPAs permeantes através da desidratação rápida dos oócitos, e também reduzindo rapidamente a quantidade de CPAs permeantes no seu interior durante o aquecimento (Kasai *et al.* 1990).

A trealose e a glucose são exemplos de CPAs não permeantes, sendo a sucrose o CPA mais usado na criopreservação de oócitos. Estas substâncias atuam ainda como um tampão osmótico para restringir a permeabilidade à água e impedir a expansão excessiva do oócito durante a remoção dos CPAs (Bhat *et al.* 2013). Igualmente o aumento da sua concentração no meio exterior gera um gradiente osmótico através da membrana celular, que conduz a remoção da água do interior da célula causando a sua desidratação para a entrada do CPAs antes do processo de congelamento (Ambrosini *et al.* 2006).

1.6. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NO OÓCITO

A incidência das lesões causadas pela criopreservação depende do tamanho e da forma da célula, da permeabilidade das membranas celulares e da qualidade das células (Hwang & Hochi 2014). Relativamente ao oócito, sendo uma célula de grandes dimensões, possui uma

área de superfície membranar pequena que dificulta o transporte da água e dos CPAs (Coticchio *et al.* 2004) sendo uma das principais razões que impede a correta criopreservação dos oócitos e origina danos celulares extensos.

De uma forma geral, os CPAs podem ter efeitos osmóticos dramáticos nas células durante o processo de congelação/descongelação. Quando expostos aos CPAs permeantes, os oócitos sofrem uma extensa desidratação inicial e encolhimento, em consequência da saída da água, voltando ao seu volume inicial com a entrada dos CPAs na célula. Isto causa um duplo fluxo através da membrana (saída da água e entrada dos CPAs) que influencia a concentração de soluto intracelular e o volume da célula. A extensa contração e distensão pode causar lesões ou mesmo a morte celular devido ao *stress* osmótico causado na membrana das células que poderá ser combatido através da adição de CPAs não permeantes como a sucrose (Borini & Bianchi 2011). A adição e remoção dos CPAs do oócito causa um desequilíbrio osmótico na membrana que pode resultar em grandes alterações volumétricas e causar danos na morfologia do oócito, na estrutura e função do citoesqueleto (Chian *et al.* 2014).

As lesões causadas pela criopreservação no oócito têm uma incidência a diferentes níveis celulares, que passo a referir.

1.6.1. Zona pelúcida

A fratura da ZP durante o processo de criopreservação é uma dos danos mais frequentes em oócitos comprometendo a sua capacidade de desenvolvimento posterior. Por outro lado, devido ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular causado pela exposição aos CPAs que simula o pico que acontece durante o processo de fertilização, ocorre o endurecimento prematuro da ZP presumivelmente através do desencadeamento da exocitose dos grânulos corticais, que é um processo dependente de Ca^{2+} , comprometendo a posterior penetração do spz e a fertilização (Díez *et al.* 2005, Larman *et al.* 2006, Kohaya *et al.* 2011).

1.6.2. Membrana plasmática

A integridade da membrana perde-se devido ao tempo de exposição a baixas temperaturas durante a criopreservação resultando em perdas de viabilidade e função (Zeron *et al.* 1999). Devido ao efeito dos CPAs, a membrana torna-se extremamente sensível e sofre rapidamente uma transição do estado líquido para gel que traz prejuízos para o posterior

desenvolvimento (Mukaida & Oka 2012). Também os movimentos de retração e distensão do oócito, resultantes do choque osmótico incluído no processo de vitrificação, podem quebrar a membrana plasmática e conduzir à morte do oócito (Mukaida & Oka 2012).

1.6.3. Células do *Cumulus*

Estudos em oócitos vitrificados revelaram que as células do *cumulus* também sofrem danos, sendo interrompida a comunicação intercelular entre estas células e o oócito (Fuku *et al.* 1995).

1.6.4. Citoesqueleto

A ação da baixa temperatura e dos CPAs reflete-se a nível dos microtúbulos do fuso acromático que sofrem despolimerização conduzindo à desorganização do fuso, perda de microtúbulos e também à desorganização dos cromossomas (Saunders & Parks 1999, Morató *et al.* 2008).

1.6.5. Mitocôndrias

O processo de vitrificação conduz à diminuição da concentração de ATP no interior do oócito apesar de existir uma recuperação dos níveis de ATP algumas horas após a vitrificação (Manipalviratn *et al.* 2011). Estudos indicam que o processo de vitrificação de oócitos reduz o seu conteúdo de ATP e o potencial de membrana das mitocôndrias, refletindo-se na capacidade de desenvolvimento dos oócitos que compromete a posterior formação de embriões (Zhao *et al.* 2011).

1.6.6. Potencial para o desenvolvimento

Apesar de todos os esforços feitos na tentativa de melhorar as taxas de produção de embriões derivados de oócitos criopreservados, procurando várias alternativas para atingir valores mais elevados, as percentagens de embriões obtidas sem recurso a ICSI são ainda baixas, rondando os 20% nalguns estudos (Sprícigo *et al.* 2014, Ezoie *et al.* 2015, Matos *et al.* 2015) sendo que valores mais baixos são também referenciados (Morató *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2010, Prentice *et al.* 2011). Estes valores refletem os efeitos da criopreservação a nível do

oócito que limitam o posterior desenvolvimento embrionário verificando-se um interesse crescente e um aprofundamento necessário nesta área que visa o aumento destas percentagens com a finalidade de resultar num número mais elevado de embriões que possam ser depois transferidos e originar gestações de termo.

2. OBJETIVOS

Por forma a otimizar os protocolos de criopreservação de oócitos e melhorar as taxas de sucesso desta técnica, foi delineado um estudo cujos objetivos são testar diferentes combinações de CPAs, avaliar os efeitos da redução de Ca^{2+} nos meios de vitrificação e caracterizar o efeito dos diferentes protocolos de criopreservação na sobrevivência e desenvolvimento, na composição lipídica e na permeabilidade da membrana aos CPAs do gâmeta feminino.

Neste estudo iremos testar CPAs como o EG, o DMSO, o PROH e a sucrose que serão agrupados formando dois *cocktails* distintos: EG+DMSO+sucrose e PROH+sucrose. Estes CPAs serão testados em soluções, com e sem Ca^{2+} . Serão também estudados os efeitos da criopreservação na composição lipídica dos oócitos e permeabilidade da membrana aos CPAs. Vamos avaliar esta permeabilidade, localizar os grânulos corticais e medir o potencial mitocondrial e tempo de digestão da ZP, com a determinação da viabilidade dos oócitos pós descongelção, a fim de estabelecer uma correlação entre o sucesso e os efeitos de cada protocolo nas propriedades da membrana e na homeostasia do Ca^{2+} .

3. METODOLOGIA

3.1. RECOLHA E MATURAÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários bovinos foram recolhidos no matadouro e colocados em meio PBS aquecido a 37°C num termo até serem entregues no laboratório. Após a chegada ao laboratório, os ovários foram lavados de forma a remover os vestígios de sangue do meio e foram manipulados numa câmara de fluxo laminar. Os folículos foram aspirados, com o auxílio de uma seringa de 10 mL e uma agulha de 19 G, para recolha dos oócitos. Efetuou-se apenas a punção e aspiração do conteúdo dos folículos de 2 a 6 mm de diâmetro, presentes na superfície dos ovários, que foi vertido lentamente para um tubo esterilizado de fundo cónico contendo 2 a 3 mL de meio de lavagem W1 (ver anexos, tabela 10), mantido em banho-maria a 37°C durante todo o processo. Após a aspiração de todos os folículos de cada ovário, aguardou-se um período de tempo curto, de forma a permitir que os oócitos recolhidos se depositassem no fundo do tubo, sendo então feita a decantação do líquido folicular (sobrenadante), aproveitando o sedimento composto pelas células da granulosa e os COCs.

Este sedimento foi vertido para placas de *petri* esterilizadas de 60 mm de diâmetro e diluído com meio W1, procedendo-se à seleção dos oócitos. Estes foram transferidos para uma placa de cultura de 35 mm de diâmetro com meio W1 e por fim, para uma placa de cultura com a mesma dimensão contendo 3 mL de meio de maturação (ver anexos, tabela 11) composto por TCM199 + 10% de soro (SOCS – soro de vaca superovulada em cio) e suplementado com FSH (10 µg/mL), piruvato de sódio e antibiótico.

O conteúdo de cada placa de cultura inicial contendo as células da granulosa foi vertido para um tubo de vidro graduado de fundo cónico, deixou-se repousar e retirou-se o sobrenadante. Depois adicionou-se 1 mL de meio de maturação e homogeneizou-se com uma seringa de 1 mL e uma agulha. Depois de adicionado à placa de cultura com os oócitos selecionados, uma ou duas gotas do homogeneizado, esta foi colocada numa incubadora durante 22h, à temperatura de 38.8°C, numa atmosfera saturada de humidade e com 5% de CO₂.

3.2. CRIOPRESERVAÇÃO

Os oócitos maturados foram criopreservados por vitrificação. Foram testados dois protocolos de vitrificação que variavam na combinação de crioprotectores utilizados; o protocolo A com EG, DMSO e sucrose e o protocolo B com PROH e sucrose. Foi também testado o efeito da diminuição de Ca^{2+} no meio de vitrificação e aquecimento utilizando os mesmos protocolos com soluções compostas por SOF livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} e soro. De modo a separar o efeito do choque osmótico dos CPAs, do efeito do arrefecimento a -196°C , num segundo ensaio, os COC maturados foram apenas expostos aos CPAs com os mesmos protocolos, mas sem o processo de vitrificação.

3.2.1. Vitrificação

Os COCs depois de maturados foram divididos aleatoriamente em 4 grupos e sujeitos ao protocolo A (adaptado de Vajta *et al.* 1999) ou B (adaptado de Criado *et al.* 2011), com e sem Ca^{2+} . Cada protocolo de vitrificação compreendia tempos e concentrações específicas de CPAs (tabelas 1 e 2) sendo comum o meio de base composto por SOF + 20% de soro (soro de vitelo recém nascido, NBCS) ou SOF livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} + 20% de soro (NBCS). Cada um dos protocolos estabelecia a utilização de duas soluções diferentes, a de equilíbrio (SE) e a de vitrificação (SV), que variavam na concentração de CPAs: a primeira com 7.5% EG + 7.5% DMSO no protocolo A, e 2M PROH no protocolo B; a segunda com 15% EG + 15% DMSO + 0.5M sucrose, e 2M PROH + 0.5M sucrose nos protocolos A e B, respetivamente.

Esta fase foi realizada à temperatura ambiente e em placas de *petri* de 60 mm de diâmetro divididas em dois, até os COCs serem congelados em *cryotops*. As soluções foram preparadas em tubos de *ependorf*, devidamente identificados, e posteriormente foram preparadas as placas com uma gota de 100 μL da SE e uma gota de 50 μL de SV, onde foram mergulhados os COCs.

Tabela 1 Condições de vitrificação para o protocolo constituído por etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO)

Solução	EG	DMSO	Meio	Sucrose (0.5M)	Volume total	Tempos
Solução de equilíbrio	75 µL	75 µL	850 µL	–	1000 µL	5 min
Solução de vitrificação	150 µL	150 µL	700 µL	0.171 gr	1000 µL	30-45 seg

Tabela 2 Condições de vitrificação para o protocolo constituído por 1,2-propanediol (PROH)

Solução	PROH	Meio	Sucrose (0.5M)	Volume total	Tempos
Solução de equilíbrio	150 µL	850 µL	–	1000 µL	10 min
Solução de vitrificação	150 µL	850 µL	0.171 gr	1000 µL	1 min

Por cada *cryotop* foram selecionados cinco ou seis COCs, em meio de SOF com 20% de soro, após suaves pipetagens de forma a remover o excesso de camadas de células do *cumulus*, permanecendo apenas uma ou duas camadas. Os COCs foram então transferidos para a SE e depois para a SV, durante o tempo correspondente a cada protocolo. Decorrido o tempo necessário, os COCs foram colocados nos *cryotop* e imersos em NL₂.

3.2.2. Aquecimento

O processo de aquecimento foi realizado à temperatura de 39°C, em placa de quatro poços. Neste processo foram utilizadas quatro soluções que variavam na concentração de CPAs (tabelas 3 e 4). No caso do protocolo A não eram incluídos nem EG nem DMSO nas soluções, ao contrário do protocolo B que incluía o PROH na sua constituição. Ambos os protocolos incluíam nas soluções, uma concentração decrescente de sucrose que permitia a remoção dos CPAs permeantes do interior dos oócitos.

Tabela 3 Condições de aquecimento para o protocolo constituído por etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO)

Solução	Meio	Sucrose	Tempo	Quantidade no Poço
I (0.5 M sucrose)	1000 µL	0.171 gr	1 min	700 µL
II (0.25 M sucrose)	1000 µL	0.0855 gr	5 min	500 µL
III (0.1 M sucrose)	1000 µL	0.0171 gr	5 min	500 µL
IV (0 M sucrose)	1000 µL	–	5 min	500 µL

Tabela 4 Condições de aquecimento para o protocolo constituído por 1,2-propanediol (PROH)

Solução	Meio	PROH	Sucrose	Tempo	Quantidade no Poço
I (0.5 M sucrose)	850 µL	150 µL	0.171 gr	1 min	700 µL
II (0.5 M sucrose)	925 µL	75 µL	0.171 gr	7 min	500 µL
III (0.3 M sucrose)	1000 µL	–	0.1026 gr	9 min	500 µL
IV (0 M sucrose)	1000 µL	–	–	2 min	500 µL

Após ser retirado do NL_2 , cada *cryotop* foi rapidamente mergulhado na solução I durante um tempo específico, tendo sido posteriormente transferido para as soluções II, III e IV, sucessivamente. Após a sua passagem pela última solução, os COCs eram mantidos em meio base, numa placa de 35 mm de diâmetro coberta por uma folha de papel de alumínio e sobre uma placa térmica, até serem avaliados e transferidos para meio FERT (ver anexos, tabela 13) e fertilizados no final de todo o processo.

3.3. FERTILIZAÇÃO E CULTURA *IN VITRO* DOS EMBRIÕES

A fertilização foi realizada em placas de 50 mm de diâmetro, divididas em quatro quadrantes com três gotas de 40 µL de meio FERT, submersas em 8 mL de óleo mineral filtrado, previamente aquecido. Depois de preparadas, as placas foram previamente

colocadas a aquecer cerca de 30-60 minutos, numa estufa incubadora a 38.8°C, saturada de humidade e 5% de CO₂.

Os COCs descongelados, foram transferidos (dez por gota) e adicionado o sémen capacitado (preparado de acordo com o protocolo em anexo), numa dose que varia entre 2 e 5 µL, correspondente a uma concentração final de 2×10⁶ espermatozoides por mL. As placas foram colocadas na estufa com 5% de CO₂, à temperatura de 38.8°C e saturada de humidade, durante 18 a 22 horas. Na figura 3 abaixo, pode ver-se um presumível zigoto, 22h após ter sido fertilizado, em que são ainda visíveis alguns dos spzs que o rodeiam. Estes presumíveis zigotos foram denudados e depois cultivados, em placas de quatro poços em gotas de 25 µL de meio SOF + BSA (ver anexos, tabela 15) cobertas de óleo mineral. Às 48 após a inseminação, os embriões de 2-8 células foram transferidos para gotas de meio SOF + BSA + 10% de soro (soro fetal bovino, FBS) (ver anexos, tabela 16) cobertas com 700 µL de óleo filtrado, onde permaneciam durante 8 dias cultivados na estufa incubadora a 38.8°C, saturada de humidade e 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂.

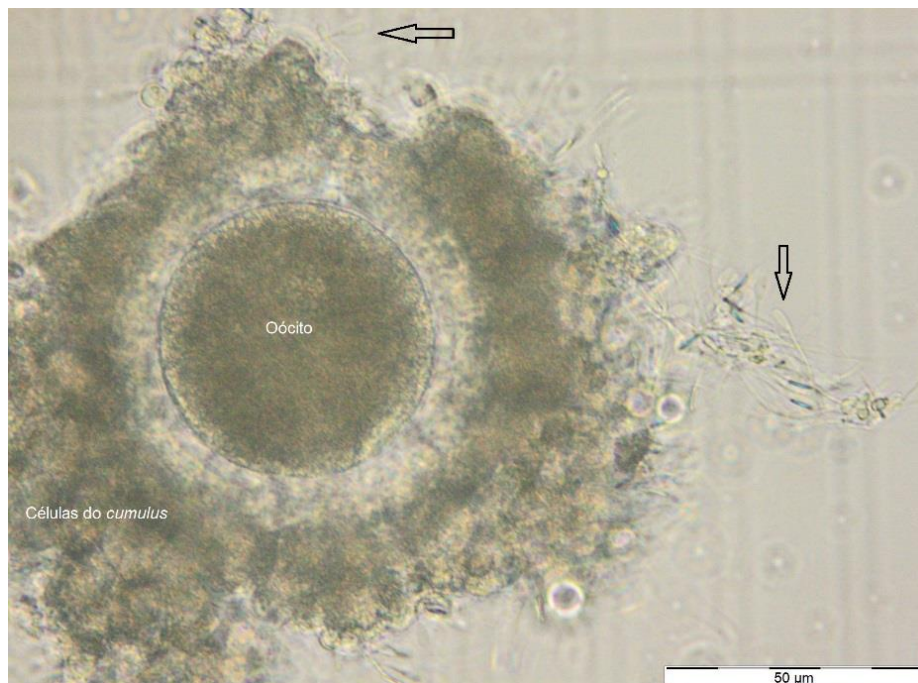


Figura 3 Fotografia em microscopia de contraste de fase (ampliação 100x), 22 horas após a fertilização, de um presumível zigoto rodeado por espermatozoides. As setas apontam para alguns espermatozoides mais visíveis na imagem

3.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE PRÉ E PÓS-VITRIFICAÇÃO OU CHOQUE OSMÓTICO

3.4.1. Qualidade morfológica do oócito e estadio de maturação anterior à vitrificação

A qualidade morfológica dos COC baseou-se na avaliação da aparência da ZP e do oolema no final do processo de maturação *in vitro*. O estadio de maturação nuclear foi avaliado em oócitos frescos fixados em solução de aceto-etanol e corados com 1% de aceto-lacmoide. Os oócitos fixados foram colocados entre lâmina e lamela, adicionou-se uma gota de corante e procedeu-se à sua observação em microscópio. Esta avaliação foi feita entre os estadios de VG e MII, sendo considerados maturados apenas os oócitos identificados com estando nesta última fase (Lapa *et al.* 2011).

3.4.2. Capacidade de desenvolvimento dos oócitos

Os COC maturados, após vitrificação e aquecimento ou em fresco, foram inseminados com sémen bovino descongelado. Foram avaliadas as taxas de clivagem às 48 horas pós inseminação ($\frac{\text{oócitos clivados}}{\text{oócitos inseminados}} \times 100$). A taxa de blastocistos e a qualidade dos embriões produzidos foram avaliadas aos sétimo e oitavo dias de cultura. Os embriões foram classificados em três categorias: grau 1 - bom, sem defeitos ou com apenas imperfeições triviais; grau 2 – médio, com algumas células extrusadas ou degeneradas e não uniformes, aparência mais escura; grau 3 – mau, má qualidade, falta de coesão ou com muitas células extrusadas ou degeneradas (Matos *et al.* 2015).

3.4.2.1. Marcação dos grânulos corticais

Os oócitos sujeitos aos diferentes protocolos de vitrificação foram denudados e fixados numa solução de 4% paraformaldeído em PBS durante uma hora à temperatura ambiente. Depois foram lavados duas vezes numa solução de PBS + PVP (0.3%) e foram permeabilizados em PBS + saponina (0.1%) durante dez minutos. Após a permeabilização, foram lavados em PBS e foram incubados durante uma hora, à temperatura ambiente e no escuro, com *fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin* (PNA-FITC - Sigma) diluído em PBS + saponina + ClCa^{2+} (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tsai *et al.* 2011). Terminado o tempo de incubação, os oócitos foram colocados em moviol entre lâmina e lamela, selada com verniz, e observados no

microscópio de fluorescência (cubo azul, filtro BP 470-490, objetiva UPlanFI 20×/0.50) De acordo com a localização dos grânulos, os oócitos foram classificados em três categorias: a) periferia, os grânulos corticais encontram-se alinhados na periferia do oócito, próximos da membrana celular; b) exocitose incompleta, parte dos grânulos corticais sofreu uma fusão com a membrana plasmática aparentando uma exocitose parcial; c) exocitose, a ausência de fluorescência revela uma exocitose completa dos grânulos corticais.

A figura 4 compreende um exemplar de cada uma das categorias consideradas na marcação dos grânulos corticais.

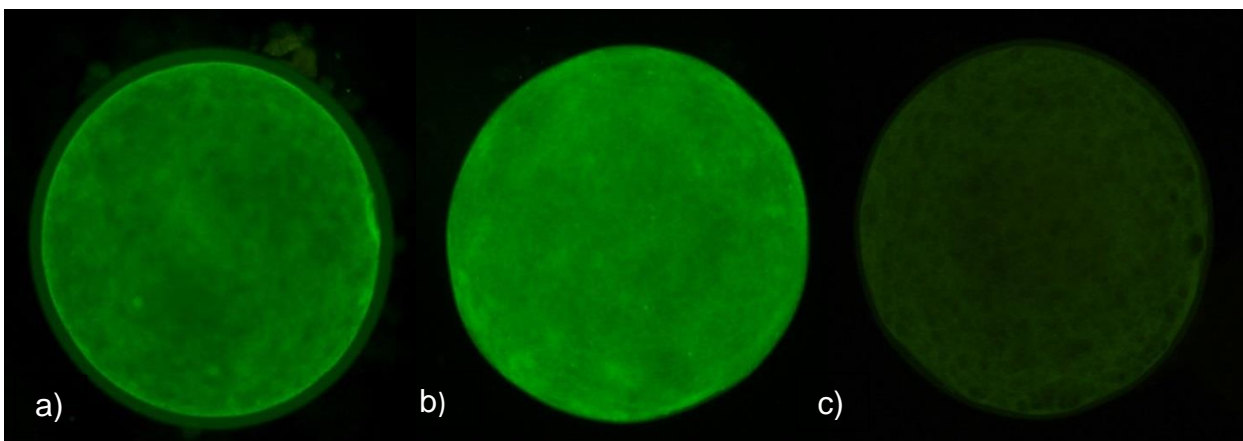


Figura 4 Fotografias de microscopia de fluorescência (ampliação 200x) dos grânulos corticais em oócitos maturados. a) grânulos corticais localizados na periferia; b) exocitose incompleta dos grânulos corticais; c) exocitose completa dos grânulos corticais

3.4.2.2. Potencial da membrana interna mitocondrial

O potencial mitocondrial dos oócitos foi avaliado com a utilização do corante 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetrametil benzimidazolilcarbocianina iodeto (JC-1; Invitrogen). As propriedades fluorescentes do JC-1 mudam de acordo com o potencial mitocondrial transmembranar interno; este corante catiónico revela uma fluorescência vermelha em oócitos com elevado potencial mitocondrial e uma fluorescência verde em oócitos com baixo potencial de membrana.

Os oócitos previamente desnudados foram incubados em meio de maturação com JC-1 (1 µg/mL), durante 20 minutos na estufa a 38.8°C. Após incubação, foram lavados em meio W1 ou de maturação com a utilização do *vortex*, durante 1 minuto, de forma a remover o

corante em excesso e posteriormente foram colocados numa lâmina aquecida e observados no microscópio de fluorescência, com a utilização do cubo azul (filtro BP 470-490 e objetiva UPlanFI 20x/0.50).

Com recurso ao *software ImageJ*, foram obtidos os valores médios de intensidade de fluorescência vermelha e verde e foi calculada a razão entre as duas cores ($r = \left(\frac{\text{Vermelho}}{\text{Verde}}\right) \times 100$).

3.4.2.3. Medição da zona pelúcida e tempo de digestão da pronase

Os oócitos desnudados foram colocados em solução de 0.5% de pronase (Sigma) e observados à lupa, à temperatura ambiente, de forma a controlar o tempo de digestão da ZP. O tempo de digestão da ZP de cada oócito foi registado como o tempo de intervalo entre o momento em que o oócito foi colocado na solução de pronase e o desaparecimento total da ZP.

3.4.3. Permeabilidade da membrana aos crioprotectores

Inicialmente os oócitos foram desnudados, com a utilização do *vortex* de forma a permitir uma melhor visualização. De seguida, procedeu-se à imobilização dos oócitos em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina. Posteriormente, as lâminas foram colocadas na platina de um microscópio invertido para serem quantificadas as mudanças dinâmicas no volume dos oócitos após ter sido adicionado o meio a testar. A permeabilidade aos CPAs foi avaliada utilizando uma solução de 7.5% de EG e 7.5% de DMSO ou de 2M PROH, com e sem Ca^{2+} .

A permeabilidade aos CPAs foi estimada pelo ajuste dos volumes ao longo da escala de tempo numa curva exponencial simples de acordo com a fórmula proposta por Martins *et al.* (2010) e Matos *et al.* (2015).

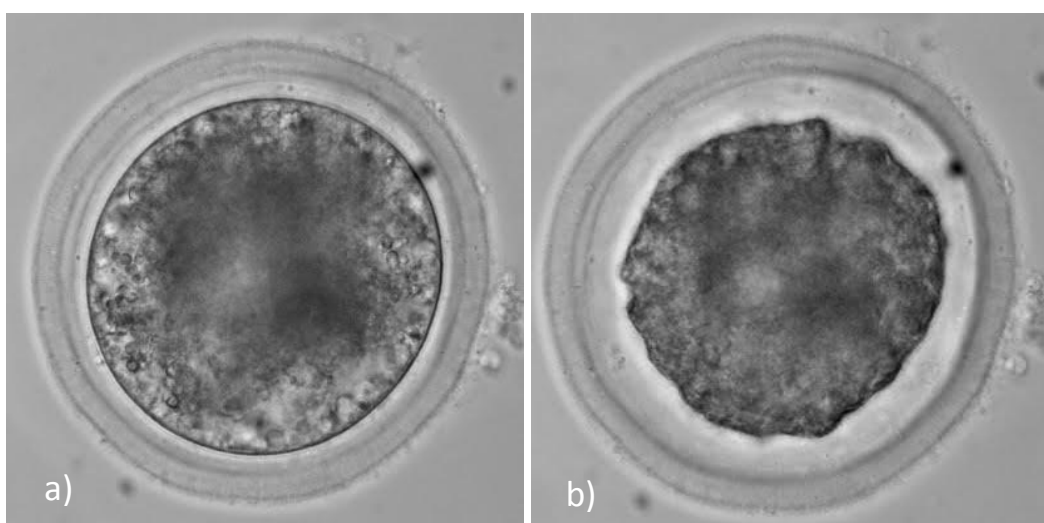


Figura 5 Fotografias em microscópio invertido (ampliação 400x) que representam as mudanças de volume dos oócitos na avaliação da permeabilidade da membrana plasmática aos crioprotetores. a) oócito antes do choque osmótico, b) oócito encolhido pela ação da exposição aos crioprotetores.

3.4.4. Composição lipídica dos oócitos e das células de *cumulus*

Antes da extração de lípidos, os COCs foram sujeitos a um processo de simulação do choque osmótico durante a vitrificação, em que são expostos aos meios e condições de congelamento/descongelamento sem serem mergulhados em NL₂. No final deste processo, os COCs foram colocados em meio W2 (ver anexos, tabela 13). A partir desta fase foi utilizado apenas materiais de vidro. Os COCs foram lavados duas vezes em PBS autoclavado, de seguida foram colocados num tubo de fundo redondo para serem removidas as células do *cumulus* dos oócitos por *vortex* durante 3 min. Os oócitos desnudados foram colocados num tubo de vidro com rosca. Todo o PBS usado na remoção das células do *cumulus* dos COCs foi reunido num tubo de fundo cónico graduado e centrifugados durante 5 min a 2500 rpm. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, o *pellet* com as células do *cumulus* foi ressuspenso em 0.3 mL de PBS e colocado num outro tubo com rosca. Todos os tubos foram congelados a -20° C até á extração dos lípidos, que foi realizada pelo método de transesterificação direta, após a liofilização das amostras. Resumidamente, foi adicionado a cada amostra 1 mL de tolueno e 100 µL de padrão interno (C19:0 - 1 mg/mL). Depois da adição

de 2 mL de metóxido de sódio em metanol (0.5 M), a solução foi agitada por *vortex* e colocada num banho de água a 50°C durante 10 min. Depois de arrefecer à temperatura ambiente, adicionou-se 2 mL de HCl em metanol (1.25 M) e deixou-se reagir durante 10 min. Após o arrefecimento, foi adicionado 6% de carbonato de potássio em duas porções de 1 mL para evitar uma efervescência excessiva, seguido da adição de 2 mL de n-hexano com BHT (25 mg/L). A solução foi agitada no *vortex*, centrifugada e a camada orgânica foi transferida para outro tubo. O passo da extração foi repetido duas vezes. A solução final foi seca com a utilização de sulfato de sódio anidro. O solvente foi então removido por evaporação em corrente de azoto a 37°C e o resíduo final foi dissolvido em 150 µL de n-hexano. A identificação de ácidos gordos foi conduzida por cromatografia gasosa com espetrometria de massa (GC-MS) (Prates *et al.* 2013)

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foram analisados, o efeito global do processo de criopreservação e, separadamente, o efeito exclusivo do choque osmótico provocado pela exposição aos crioprotectores na capacidade de desenvolvimento dos oócitos. Do ponto de vista do processo de criopreservação, está implícito o efeito da exposição ao frio juntamente com os CPAs não tendo por isso uma perceção individual destes dois parâmetros. Desta forma, realizaram-se duas experiências em que os oócitos foram sujeitos a duas condições distintas: na experiência 1 o processo de criopreservação foi completo, e nas experiências 2 e 3 foi realizada uma simulação do processo, em que os oócitos passavam diretamente dos meios de congelação para os meios de descongelação, sem serem mergulhados em NL₂.

A **experiencia 1** foi realizada em 5 sessões para estudar o efeito de 2 protocolos com diferentes CPAs e da concentração de Ca²⁺ nos meios de vitrificação nas características e competência dos oócitos criopreservados para o desenvolvimento embrionário. Oócitos bovinos (n=818) foram maturados durante 22h e, após avaliação morfológica, distribuídos aleatoriamente em 4 grupos antes da vitrificação: grupo EG+DMSO com cálcio, os oócitos (n=141) foram expostos ao meio SOF com cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs EG, DMSO e sucrose; grupo EG+DMSO sem cálcio, os oócitos (n=107) foram expostos ao meio SOF sem cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs EG, DMSO e sucrose; grupo PROH com cálcio, os oócitos (n=131) foram expostos ao meio SOF com cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs

PROH e sucrose; e grupo PROH sem cálcio, os oócitos (n=124) foram expostos ao meio SOF sem cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs PROH e sucrose.

Após vitrificação e aquecimento, os oócitos viáveis de todos os grupos foram inseminados com sémen bovino descongelado e os embriões produzidos avaliados (taxa de clivagem, taxa de produção e qualidade dos blastocistos). Foi igualmente avaliado em oócitos descongelados, o potencial de membrana das mitocôndrias, a localização dos grânulos corticais e o tempo de digestão da ZP. Quanto ao potencial de membrana das mitocôndrias foi avaliado um número total de 51 oócitos – grupo EG+DMSO com cálcio (n=9), grupo EG+DMSO sem cálcio (n=12), grupo PROH com cálcio (n=16), grupo PROH sem cálcio (n=14). A técnica de marcação dos grânulos corticais foi utilizada para análise 35 oócitos – grupo EG+DMSO com cálcio (n=12), grupo EG+DMSO sem cálcio (n=7), grupo PROH com cálcio (n=9), grupo PROH sem cálcio (n=7). Por último, foi avaliado o tempo de digestão da ZP sendo analisados 64 oócitos – grupo EG+DMSO com cálcio (n=14), grupo EG+DMSO sem cálcio (n=16), grupo PROH com cálcio (n=17), grupo PROH sem cálcio (n=17).

A **experiência 2** teve por objetivo, como já referido, estudar o efeito exclusivo do choque osmótico e da toxicidade provocado pela exposição aos CPAs, na presença ou diminuição de Ca^{2+} nos meios, nas características e na capacidade dos oócitos tratados para o desenvolvimento embrionário. Esta experiência foi realizada em 5 sessões, sendo incluído para além dos 4 grupos acima, um grupo controlo, sem qualquer tratamento. Oócitos bovinos (n=1396) foram maturados durante 22h e, após avaliação morfológica, distribuídos aleatoriamente nos 5 grupos antes do choque osmótico: grupo controlo, os oócitos (n=244) sem qualquer tratamento foram colocados em meio FERT e inseminados; grupo EG+DMSO com cálcio, os oócitos (n=184) foram expostos ao meio SOF com cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs EG, DMSO e sucrose; grupo EG+DMSO sem cálcio, os oócitos (n=161) foram expostos ao meio SOF sem cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs EG, DMSO e sucrose; grupo PROH com cálcio, os oócitos (n=205) foram expostos ao meio SOF com cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs PROH e sucrose; e grupo PROH sem cálcio, os oócitos (n=207) foram expostos ao meio SOF sem cálcio + 20% FCS juntamente com os CPAs PROH e sucrose.

Os oócitos de todos os grupos foram inseminados com sémen descongelado e os embriões produzidos avaliados (taxa de clivagem, taxa de produção e qualidade dos blastocistos). Como na experiência 1, para além da capacidade de desenvolvimento dos oócitos, foram igualmente estudados outros parâmetros: o potencial de membrana das

mitocôndrias dos oócitos, a localização dos grânulos corticais, o tempo de digestão da ZP e o estadio de maturação. Quanto ao potencial de membrana das mitocôndrias, foram avaliados um número total de oócitos de 80 – controlo (n=17), grupo EG+DMSO com cálcio (n=14), grupo EG+DMSO sem cálcio (n=13), PROH com cálcio (n=18), grupo PROH sem cálcio (n=18). Na técnica de marcação dos grânulos corticais foram avaliados 28 oócitos – controlo (n=6), EG+DMSO com cálcio (n=6), EG+DMSO sem cálcio (n=4), PROH com cálcio (n=6), PROH sem cálcio (n=6). Por último, foi avaliado o tempo de digestão da ZP foram analisados 88 oócitos – grupo controlo (n=19), grupo EG+DMSO com cálcio (n=18), grupo EG+DMSO sem cálcio (n=17), grupo PROH com cálcio (n=17), grupo PROH sem cálcio (n=17).

Na avaliação do estadio de maturação foram utilizados apenas oócitos frescos (n=25) para confirmar que estes estariam na fase de maturação exigida ao processo de congelação.

Para estudar o efeito dos CPAs na composição lipídica dos COC e na permeabilidade da membrana foi ainda realizada uma terceira experiência, **experiência 3**. Para investigar o efeito dos CPAs na composição lipídica dos COC foram realizadas 5 sessões constituindo um total de 1851 oócitos analisados, divididos nos diferentes grupos – controlo (n=542), EG+DMSO com cálcio (n=301), EG+DMSO sem cálcio (n=280), PROH com cálcio (n=322), PROH sem cálcio (n=363). Como na experiência 2, os oócitos maturados eram sujeitos à simulação do processo de vitrificação, passando diretamente dos meios de congelação para os meios de descongelação, sem serem mergulhados em NL₂. Relativamente à permeabilidade da membrana dos oócitos foram avaliados 30 oócitos em 5 sessões, divididos nos diferentes grupos - EG+DMSO com cálcio (n=7), EG+DMSO sem cálcio (n=10), PROH com cálcio (n=6), PROH sem cálcio (n=7). Estes oócitos, eram colocados em soluções de 7.5% de EG e 7.5% de DMSO ou de 2M PROH, com e sem Ca²⁺, e avaliados os volumes e as permeabilidades aos CPA.

3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados de 5 sessões de sobrevivência à vitrificação ou apenas choque osmótico e de produção de embriões foram analisados usando *proc glimmix* do SAS (Statistical Analysis Systems, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA) para os dados da experiência 1 e da experiência 2. Os modelos incluíam os tratamentos (efeito dos CPAs e do Ca²⁺) como efeito fixo e a sessão como efeito aleatório. As médias ajustadas de cada tratamento foram calculadas e comparadas,

pelo teste de Tukey-Kramer. Na experiência 2 foram utilizados contrastes ortogonais para comparar os resultados do grupo controle com os outros grupos e para comparar os efeitos dos fatores CPA e Ca^{2+} .

Os dados da marcação dos grânulos corticais, nas categorias considerados foram comparados entre grupos pelo teste exacto de Fisher, em tabela de contingência de 2x2. Foi igualmente atribuída uma ponderação a cada categoria associada ao menor ou maior endurecimento da ZP (3 pontos, periferia; 2 pontos, exocitose incompleta; e 1 pontos, exocitose) e os grupos comparados pelo teste de Mann-Whitney.

Os dados de 5 sessões do potencial mitocondrial e da composição em ácidos gordos dos oócitos foram analisados usando o *proc mixed* do SAS e considerando como efeito fixo, o tratamento e, também o tipo de células e interacção entre tipo de células e tratamento apenas nos dados das análises lipídicas. A sessão foi considerada como efeito aleatório. As médias ajustadas foram calculadas e comparadas pelo teste PDIFF de comparações múltiplas. Foram utilizados os contrastes ortogonais para comparação dos efeitos dos CPAs e do Ca^{2+} com o grupo controle.

Para a análise dos dados da permeabilidade da membrana dos oócitos (5 sessões) foi utilizado o teste de Student (*proc test*).

4. RESULTADOS

4.1. ESTADIO DE MATURAÇÃO ANTERIOR À VITRIFICAÇÃO

Oitenta por cento dos oócitos analisados apresentavam-se na fase de maturação ideal ao processo de vitrificação, fase MII. Em todos eles foi identificado o fuso meiótico com os cromossomas alinhados na placa equatorial e, em 40% dos oócitos era também visível o glóbulo polar característico desta fase de maturação.

4.2. CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO/CHOQUE OSMÓTICO E DE DESENVOLVIMENTO POSTERIOR

4.2.1. Experiência 1

Os resultados dos efeitos do processo de criopreservação de oócitos, em termos de eficiência refletidas na taxa de sobrevivência e clivagem, estão presentes da tabela 5.

Tabela 5 Efeito dos crioprotetores etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH) com cálcio e sem cálcio, na sobrevivência e produção de embriões de oócitos sujeitos ao processo de criopreservação.

	EG + DMSO		PROH	
	Com cálcio	Sem cálcio	Com cálcio	Sem cálcio
Nº de oócitos	141	107	131	124
Eficiência (%)	90.5 ± 3.4	90.3 ± 3.7	84.2 ± 4.8	87.8 ± 4.1
Taxa de sobrevivência (%)	91.1 ± 3.5	97.2 ± 1.8	90.2 ± 3.9	92.3 ± 3.3
Clivagens (%)	18.7 ± 5.2 ^a	12.0 ± 4.3 ^a	5.9 ± 2.9 ^b	2.2 ± 1.6 ^b

Letras diferentes indicam diferentes significativas entre grupos (P<0.05).

Apenas para o parâmetro das clivagens foi encontrado um efeito significativo do crioprotetor, revelando taxas superiores de embriões clivados para o EG+DMSO comparativamente com o PROH (P=0.007), independentemente da presença/ausência de cálcio nos meios (P>0.05). Relativamente à eficiência do processo (P>0.05) e à taxa de sobrevivência (P>0.05) não foram encontradas diferenças apresentando valores elevados em todos os grupos. Quanto ao número de blastocistos obtidos nesta experiência (dados não

revelados na tabela devido ao número reduzido) foram apenas 2, nos grupos EG+DMSO com cálcio e PROH com cálcio.

4.2.2. Experiência 2

Os resultados da simulação do processo de criopreservação de oócitos sem a imersão em NL₂, em termos de taxas de clivagens e blastocistos obtidos apresentam-se na tabela 6.

Tabela 6 Efeito dos crioprotetores etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com cálcio e sem cálcio, na produção de embriões de oócitos sujeitos ao choque osmótico.

	Controlo	EG + DMSO		PROH	
		Com cálcio	Sem cálcio	Com cálcio	Sem cálcio
N^o de oócitos	244	185	160	206	206
Clivagens (%)	77.8 ± 4.7 ^a	74.6 ± 5.4 ^a	77.2 ± 5.2 ^a	62.2 ± 6.3 ^b	60.7 ± 6.4 ^b
Blastocistos (%)	15.4 ± 2.6 ^a	7.4 ± 2.2 ^b	8.1 ± 2.5 ^b	6.4 ± 2.2 ^b	4.7 ± 1.9 ^b

Letras diferentes indicam diferentes significativas entre grupos (P<0.05).

Observando os resultados apresentados na tabela 6 verifica-se que foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos tanto para a taxa de clivagem (P=0.003) como para a dos blastocistos (P=0.04). No que diz respeito aos embriões clivados, verificou-se um efeito negativo do PROH quando comparado com o grupo controlo (P=0.0007) e com EG+DMSO (P=0.0008). De facto as taxas de clivagem obtidas utilizando o PROH foram mais baixas, enquanto no caso dos crioprotectores EG+DMSO foram semelhantes às obtidas no controlo. Não se verificou um efeito significativo da presença/redução de cálcio nos meios (P>0.05) quer nas taxas de clivagem quer nas de blastocistos. Ainda relativamente aos blastocistos, apesar das taxas não terem sido diferentes entre os tratamentos, foram significativamente mais baixas (P<0.05) comparativamente com o grupo controlo evidenciando assim um efeito negativo dos CPAs na produção de embriões.

4.3. POTENCIAL MITOCONDRIAL

Os resultados relativos ao potencial de membrana mitocondrial dos oócitos sujeitos aos diferentes processos, experiência 1 (gráfico à esquerda) e 2 (gráfico à direita), apresentam-se na figura 5.

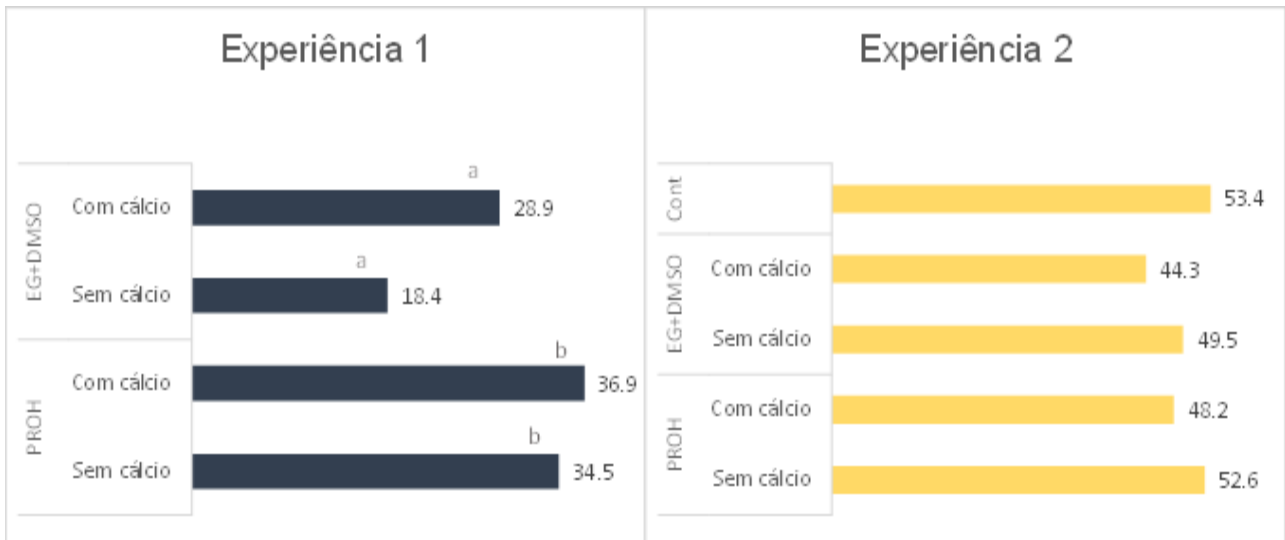


Figura 6 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, no potencial de membrana mitocondrial dos oócitos, sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico à esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico à direita); Cont., controle; letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência ($P < 0.05$).

Na experiência 1 foi encontrado um efeito significativo do crioprotetor ($P = 0.005$), em que se obtiveram valores de potencial mitocondrial mais elevados para o crioprotetor PROH, independentemente da presença ou ausência de cálcio ($P > 0.05$).

Na experiência 2 não foram encontradas diferenças significativas entre grupos ($P > 0.05$). Verificou-se uma tendência para um possível efeito do cálcio ($P = 0.07$), apresentando valores mais baixos na presença de cálcio nos meios.

4.4. MARCAÇÃO DOS GRÂNULOS CORTICAIS

Na figura 6 estão apresentados os resultados da marcação dos grânulos corticais, na experiência 1 (gráfico à esquerda) e 2 (gráfico à direita), em forma de percentagem correspondente a cada uma das categorias atribuídas a cada tratamento.

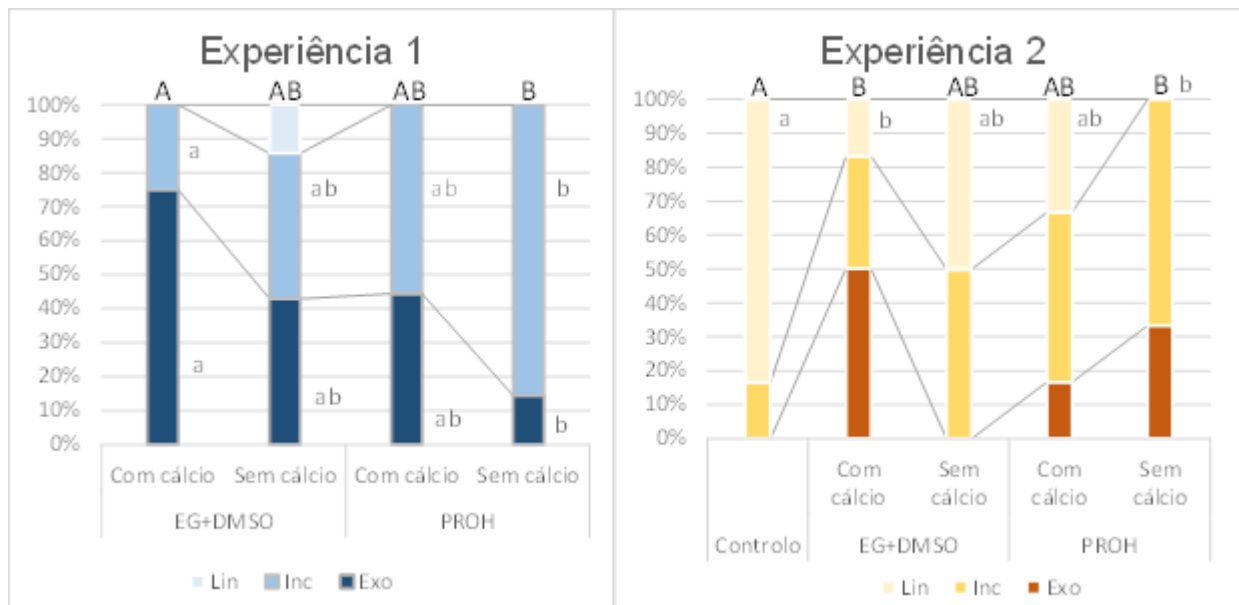


Figura 7 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, na localização dos grânulos corticais nos oócitos sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico á esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico á direita). Lin, grânulos corticais à periferia; Inc, excitose incompleta; Exo, excitose; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência ($P < 0.05$); letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre categorias de grupos da mesma experiência ($P < 0.05$).

Globalmente, na experiência 1 foi encontrado um menor endurecimento da ZP no grupo PROH sem cálcio quando comparado com o grupo EG+DMSO com cálcio ($P=0.001$). Relativamente às diferentes categorias consideradas, distinguem-se os grupos EG+DMSO com cálcio e PROH sem cálcio na excitose incompleta, com valores de 25% e 85.7% respetivamente ($P=0.02$). Do mesmo modo, se diferenciam ($P=0.02$) os mesmos grupos quanto à categoria da excitose, com valores de 75% e 14.3%.

Na experiência 2 encontrou-se um maior endurecimento da ZP nos grupos EG+DMSO com cálcio ($P=0.02$) e PROH sem cálcio ($P=0.006$) quando comparados com o grupo controlo. Quanto às categorias, foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos apenas para a localização dos grânulos corticais à periferia, entre o grupo controlo e os grupos EG+DMSO com cálcio ($P=0.04$) e PROH sem cálcio ($P=0.008$), com valores de 83.3% para o controlo, 16.7% para o EG+DMSO com cálcio e 0% para o PROH sem cálcio.

4.5. DIGESTÃO DA ZONA PELÚCIDA

Na figura 7 estão apresentados os gráficos da experiência 1 e 2 dos tempos médios, em minutos, de digestão da ZP de oócitos sujeitos aos diferentes tratamentos.

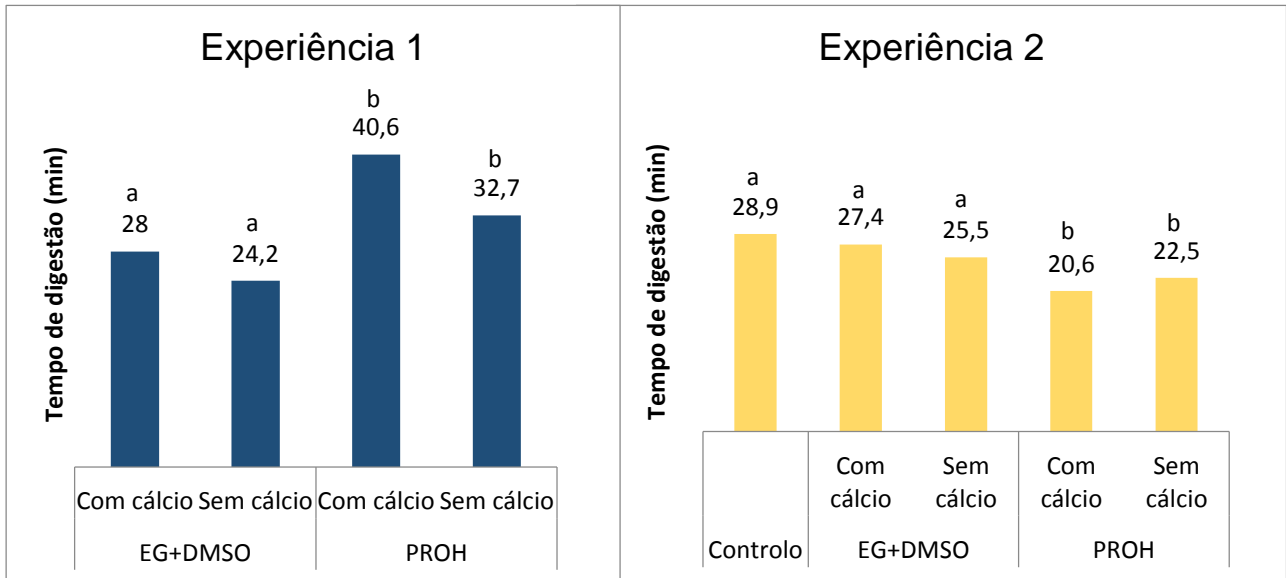


Figura 8 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH), com e sem cálcio, no tempo de digestão (minutos) da zona pelúcida, de oócitos sujeitos ao processo de vitrificação (experiência 1, gráfico á esquerda) ou choque osmótico (experiência 2, gráfico á direita). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos da mesma experiência ($P < 0.05$).

Na experiência 1 foi encontrado um efeito do crioprotetor, em que o PROH apresenta tempos de digestão mais elevados em comparação com o EG+DMSO ($P=0.03$).

Na experiência 2 foi encontrada uma diferença significativa entre o grupo controlo e os grupos PROH com cálcio ($P=0.0006$) e PROH sem cálcio ($P=0.007$) cujos tempos de digestão são mais baixos comparativamente com o controlo. Encontrou-se também novamente um efeito do crioprotetor, o EG+DMSO apresenta valores mais elevados que o PROH ($P=0.004$).

4.6. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO COMPLEXO *CUMULUS* OÓCITO

Na tabela 7 estão apresentadas as concentrações de ácidos gordos totais por oócito e células do *cumulus* de cada COC também a percentagem de cada ácido gordo encontrado, para cada tipo de células e tratamento, em COCs sujeitos ao choque osmótico.

Tabela 7 Composição em ácidos gordos de oócitos e respetivas células do *cumulus*, sujeitos ao choque osmótico, nos diferentes protocolos etilenoglicol (EG) + dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,2-propanediol (PROH).

	CONTROLO		EG+DMSO				PROH			
	O	CC	Com cálcio		Sem cálcio		Com cálcio		Sem cálcio	
			O	CC	O	CC	O	CC	O	CC
AGT (µg/O)	0.1 ± 0.04	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.05	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04
C14:0(%)	1.5 ± 0.34	1.0 ± 0.34	1.5 ± 0.39	1.4 ± 0.45	1.5 ± 0.39	1.0 ± 0.39	1.3 ± 0.34	1.7 ± 0.34	1.6 ± 0.34	1.7 ± 0.34
C15:0*(%)	0.4 ± 0.09	0.1 ± 0.09	0.2 ± 0.10	0.02 ± 0.11	0.1 ± 0.10	0 ± 0.10	0.2 ± 0.09	0 ± 0.09	0.2 ± 0.09	0 ± 0.09
C16:0*(%)	28.8 ± 1.97	28.1 ± 1.97	29.1 ± 2.25	21.1 ± 2.51	27.7 ± 2.25	26.8 ± 2.25	30.2 ± 1.97	28.9 ± 1.97	29.3 ± 1.97	27.7 ± 1.97
C16:1c9(%)	1.2 ± 0.34	0.5 ± 0.34	1.4 ± 0.38	1.3 ± 0.45	1.7 ± 0.38	1.4 ± 0.38	1.3 ± 0.34	0.6 ± 0.34	0.9 ± 0.34	0.8 ± 0.34
C17:0(%)	0.9 ± 0.29	1.0 ± 0.29	1.1 ± 0.33	0.9 ± 0.39	1.0 ± 0.33	0.9 ± 0.33	1.0 ± 0.29	0.3 ± 0.29	1.5 ± 0.29	0.8 ± 0.29
C18:0*(%)	23.3 ± 3.14	26.9 ± 3.14	24.8 ± 3.59	29.7 ± 4.11	21.2 ± 3.59	26.8 ± 3.59	23.9 ± 3.14	37.4 ± 3.14	23.9 ± 3.14	24.9 ± 3.14
C18:1c9(%)	20.4 ± 2.04	20.1 ± 2.04	21.8 ± 2.33	21.6 ± 2.66	23.7 ± 2.33	21.5 ± 2.33	22.0 ± 2.04	15.6 ± 2.04	20.9 ± 2.04	21.2 ± 2.04
C18:1c11*(%)	3.9 ^b ± 0.54	4.0 ^b ± 0.54	4.7 ^b ± 0.61	7.2 ^a ± 0.71	4.4 ^b ± 0.61	3.5 ^{bc} ± 0.61	3.8 ^b ± 0.54	2.1 ^c ± 0.54	3.3 ^{bc} ± 0.54	4.0 ^b ± 0.54
C18:2n-6(%)	11.8 ± 1.33	9.4 ± 1.33	7.7 ± 1.52	8.2 ± 1.74	9.6 ± 1.52	9.0 ± 1.52	8.2 ± 1.33	5.6 ± 1.33	8.9 ± 1.33	8.6 ± 1.33
C20:0(%)	1.7 ± 0.69	1.7 ± 0.69	2.3 ± 0.78	1.4 ± 0.91	2.4 ± 0.78	1.9 ± 0.78	1.8 ± 0.69	3.1 ± 0.69	2.5 ± 0.69	2.4 ± 0.69
C20:1(%)	0.2 ± 0.35	0.1 ± 0.35	0.3 ± 0.40	0.2 ± 0.43	0.6 ± 0.40	0 ± 0.40	1.2 ± 0.35	0.6 ± 0.35	0.5 ± 0.35	0.7 ± 0.35
C21:0*(%)	2.0 ± 0.60	3.0 ± 0.60	2.1 ± 0.68	2.6 ± 0.74	2.3 ± 0.68	4.1 ± 0.68	2.0 ± 0.60	2.5 ± 0.60	3.7 ± 0.60	3.3 ± 0.60
C20:4n-6*(%)	3.5 ± 0.57	4.0 ± 0.57	2.6 ± 0.65	4.3 ± 0.76	3.3 ± 0.65	3.2 ± 0.65	2.8 ± 0.57	1.5 ± 0.57	2.6 ± 0.57	3.6 ± 0.57
C18:3n-3(%)	0.4 ± 0.20	0.1 ± 0.20	0.5 ± 0.23	0.2 ± 0.26	0.5 ± 0.23	0.1 ± 0.23	0.5 ± 0.20	0.1 ± 0.20	0.2 ± 0.20	0.5 ± 0.20
AGS	58.7 ± 4.26	61.7 ± 4.26	61.0 ± 4.87	56.9 ± 5.50	56.2 ± 4.87	61.5 ± 4.87	60.4 ± 4.26	73.9 ± 4.26	62.8 ± 4.26	60.7 ± 4.26
AGMI	25.7 ± 2.78	24.7 ± 2.78	28.3 ± 3.18	30.1 ± 3.58	30.4 ± 3.18	26.3 ± 3.18	28.2 ± 2.78	18.9 ± 2.78	25.5 ± 2.78	26.6 ± 2.78
AGPI	15.7 ± 1.87	13.6 ± 1.87	10.8 ± 2.14	12.8 ± 2.47	13.4 ± 2.14	12.2 ± 2.14	11.5 ± 1.88	7.2 ± 1.87	11.6 ± 1.87	12.7 ± 1.87

O, oócitos; CC, células dos *cumulus*; AGT, ácidos gordos totais; AGS, ácidos gordos saturados; AGMI, ácidos gordos monoinsaturados; AGPI, ácidos gordos polinsaturados; letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (P<0.05); * indica os tipos de ácidos gordos com diferenças significativas entre grupos (P<0.05).

Foram detetados um total de 14 ácidos gordos diferentes nos COCs analisados (tabela 7). Os ácidos gordos mais abundantes tanto nos oócitos como nas células do *cumulus* foram o ácido palmítico (C16:0) seguido do ácido esteárico (C18:0) e do ácido oleico (C18:1c9). O ácido linoleico (C18:2n-6) é o quarto ácido gordo mais abundante. Os ácidos gordos menos

abundantes são o ácido pentadecanóico (C15:0), seguido do ácido margárico (C17:0), do ácido α -linolénico (C18:3n-3) e do ácido eicosanóico (C20:1).

A concentração de ácidos gordos totais foi semelhante em todos os grupos, não tendo sido identificado efeito do tipo de células, oócito ou células de *cumulus*, do tratamento ou interação tratamento \times tipo de células ($P > 0.05$).

Individualmente, foram encontradas algumas diferenças significativas entre tipo de células e/ou tratamentos. No ácido gordo C15:0, os oócitos apresentaram maior concentração que as células do *cumulus* ($P = 0.007$) assim como para o C16:0 ($P = 0.015$). Para os C18:0 ($P = 0.006$) e C21:0 ($P = 0.008$) foram as células do *cumulus* que apresentaram maior concentração que os oócitos. No C18:1c11 verificou-se um efeito do tratamento ($P = 0.008$) e, mais especificamente, do CPA utilizado ($P = 0.004$), independentemente do tipo de célula. Assim os grupos EG+DMSO apresentaram maior concentração deste ácido gordo que os grupos PROH ($P = 0.004$) e os grupos EG+DMSO com cálcio têm concentrações superiores de C18:1c11 quando comparados com todos os outros tratamentos ($P \leq 0.01$). Ainda no C18:1c11, a interação entre o tratamento e o tipo de células revelou que as células do *cumulus* do grupo EG+DMSO com cálcio apresentam uma percentagem deste ácido gordo superior a todos os outros grupos ($P \leq 0.007$); com percentagens intermédias semelhantes estão os oócitos do grupo EG+DMSO com cálcio, os oócitos e células do *cumulus* do grupo controlo, os oócitos e células do *cumulus* do grupo EG+DMSO sem cálcio, os oócitos e células do *cumulus* do grupo PROH sem cálcio e os oócitos do grupo PROH com cálcio; e a percentagem mais baixa pertence às células do *cumulus* do grupo PROH com cálcio ($P \leq 0.02$) que não é diferente das células do *cumulus* do grupo EG+DMSO sem cálcio nem dos oócitos do grupo PROH sem cálcio.

Relativamente à composição de ácidos gordos presente no meio de maturação (tabela 8), comum a todos os tratamentos, verificou-se que o ácido linoleico (C18:2n-6) foi o mais abundante, seguido do C18:0, do C16:0 e do C18:1c9. Contrariamente aos COCs, onde os ácidos gordos saturados são maioritários, no meio de maturação os ácidos gordos polinsaturados estão em maior quantidade.

Tabela 8 Composição em ácidos gordos do meio de maturação dos complexos *cumulus* oócito.

Ácidos gordos	%	Ácidos gordos	%
C14:0	0.53	C18:1c11	0.49
C15:0	0.53	C18:2n-6	51.63
C16:0	10.32	C20:0	0.15
C16:1c9	1.05	C20:1	0
C17:0	0.94	C18:3n-3	4.08
C18:0	18.63	C21:0	0
C18:1c9	9.00	C20:4n-6	2.66
Ácidos gordos saturados		31.10 %	
Ácidos gordos monoinsaturados		10.54 %	
Ácidos gordos polinsaturados		58.37 %	

4.7. PERMEABILIDADE DA MEMBRANA AOS CRIOPROTETORES

Na figura 8 estão apresentados os resultados da permeabilidade dos oócitos sujeitos ao processo de choque osmótico derivado dos diferentes cocktails de CPAs acima referidos, com e sem cálcio.

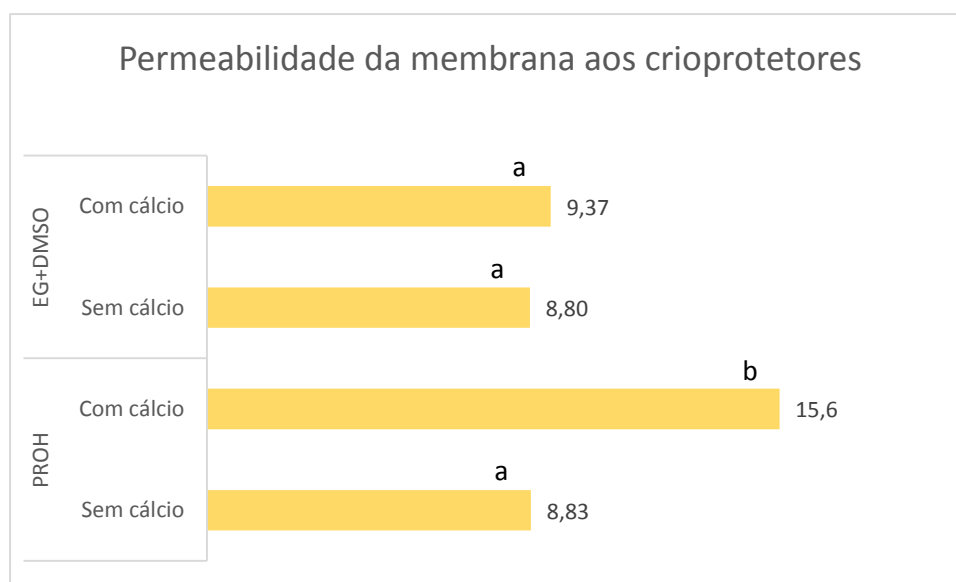


Figura 9 Efeito dos crioprotetores etilenogliol (EG) 7.5% + dimetilsulfóxido (DMSO) 7.5% e 1,2-propanediol (PROH) 2M, com e sem cálcio, na permeabilidade da membrana (P_s , $\times 10^{-6}$ cm/s) de oócitos sujeito ao choque osmótico; letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos ($P < 0.05$).

Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos - o grupo PROH com cálcio revelou um valor de permeabilidade superior aos restantes grupos ($P \leq 0.007$).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho analisámos a capacidade de sobrevivência e posterior desenvolvimento de oócitos bovinos sujeitos a dois protocolos de vitrificação compostos por CPAs diferentes, EG+DMSO+sucrose e PROH+sucrose, e também o efeito da diminuição de Ca^{2+} nos meios de vitrificação. Os resultados obtidos (tabela 5) revelaram que os oócitos sujeitos aos protocolos de vitrificação com EG+DMSO, independentemente da concentração de Ca^{2+} , apresentaram uma melhor capacidade de desenvolvimento comparativamente aos submetidos aos protocolos com PROH, traduzida numa taxa de clivagem mais elevada, mas que não se refletiu num maior número de blastocistos. Este resultado corrobora que a combinação destes dois CPAs é benéfica, sendo frequentemente utilizada por diversos autores no processo de vitrificação (Chian *et al.* 2004, Albarracín *et al.* 2005, Díez *et al.* 2005, Morató *et al.* 2008, Kohaya *et al.* 2011, Bhat *et al.* 2013, Matos *et al.* 2015).

Contrariamente ao que concluiu Criado *et al.* (2011), que obtiveram resultados promissores com a vitrificação com PROH de oócitos humanos sugerindo um protocolo inovador que reduz para 2 M a concentração deste CPA, os resultados obtidos neste estudo não foram positivos. Os nossos resultados em oócitos sujeitos ao protocolo composto pelo CPA PROH, tanto na experiência 1 (tabela 5) como na 2 (tabela 6), foram mais baixos comparativamente com os resultantes do protocolo composto por EG+DMSO, relativamente às taxas de clivagem. Criado *et al.* (2011) avaliou apenas a taxa de sobrevivência dos oócitos, que foram mais baixas que as nossas (56% e 90.2%, respetivamente) nas mesmas condições, com 2 M de PROH e utilizando o azoto líquido (-196°C), não tendo demonstrado o efeito deste protocolo na capacidade de desenvolvimento posterior dos oócitos. Porém Lee *et al.* (2011) analisaram o processo completo de criopreservação e posterior desenvolvimento dos oócitos e obtiveram taxas de clivagem e blastocistos superiores às nossas. Esta divergência poderá ser resultante da origem dos oócitos de espécies diferentes, rato e vaca no nosso caso, e também da vitrificação em menor temperatura (-207°C), ou ainda das ligeiras diferenças nos protocolos de vitrificação como a inclusão da trealose além do PROH ou os tempos de exposição aos CPAs (apenas 5 minutos no meio de equilíbrio).

Tal como verificaram Kohaya *et al.* (2011), a eficiência e a taxa de sobrevivência dos oócitos vitrificados, com diferentes combinações de CPAs, foram uniformemente elevadas revelando que a maioria dos oócitos vitrificados sobrevive ao aquecimento. No entanto

existem danos que se refletem nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário como o endurecimento precoce da ZP dos oócitos (Larman *et al.* 2006) ou a diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias e também da concentração de ATP no interior dos oócitos (Zhao *et al.* 2011), o que também foi confirmado neste trabalho.

Como já referido, as percentagens de embriões clivados obtidas com oócitos criopreservados, sem recurso a ICSI, são ainda baixas, rondando os 20% nalguns estudos (Sprícigo *et al.* 2014, Ezoë *et al.* 2015, Matos *et al.* 2015) e noutros apresentando valores ainda mais baixos (Morató *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2010, Prentice *et al.* 2011). Os resultados que mais se aproximam dos nossos são os de Sprícigo *et al.* (2014) cujas taxas de clivagem são de 24.1% comparativamente com 18.7% obtidas neste trabalho.

Apesar de Succu *et al.* (2011) terem obtido taxas superiores de sobrevivência dos oócitos após a diminuição do Ca^{2+} nos meios de vitrificação, neste trabalho a comparação para cada um dos protocolos de vitrificação constituídos por CPAs diferentes, com meios com Ca^{2+} e redução de Ca^{2+} (tabela 5) não revelaram esse efeito. De facto a diminuição do Ca^{2+} nos meios de vitrificação não aumentou a capacidade de desenvolvimento dos oócitos vitrificados quer quanto à taxa de sobrevivência, de clivagens ou de blastocistos, estando de acordo com os resultados obtidos por Kohaya *et al.* (2011) quando utilizada a mesma combinação de CPAs, EG+DMSO.

A criopreservação é um processo que envolve o controlo de muitas variáveis. De acordo com Díez *et al.* (2012) para implementar novos métodos de criopreservação de oócitos terão de ser conhecidos os efeitos de cada variável e a interação entre eles. De forma a aprofundar o conhecimento destas variáveis, neste estudo avaliámos diversos parâmetros que poderiam influenciar a capacidade de desenvolvimento dos oócitos vitrificados. Começando pela avaliação do choque osmótico e possível toxicidade dos CPAs utilizados, os resultados obtidos sugerem um efeito negativo do PROH traduzido por taxas de clivagem inferiores. Contudo este efeito não se refletiu nas taxas de blastocistos que foram igualmente baixas tanto para o PROH como para o EG+DMSO comparativamente com o controlo. Estes resultados podem sugerir um efeito dos CPAs em fases diferentes do desenvolvimento embrionário, refletindo-se logo a nível das primeiras divisões celulares no caso do PROH enquanto no EG+DMSO se manifesta numa fase mais tardia. Não foram encontrados estudos que confirmassem o efeito do choque osmótico provocado pelo PROH como único crioprotetor permeante no processo de vitrificação em oócitos bovinos, uma vez que o

conhecimento atual deste processo conduz para um efeito benéfico da conjugação de mais que um CPA como forma de reduzir a toxicidade e o choque osmótico resultante da exposição a elevadas concentrações destas substâncias (Cocchia *et al.* 2010). Porém Sakurai & Machida (1992) sugeriram que a toxicidade está dependente não só da concentração dos CPAs, que neste caso é mais elevada no protocolo EG+DMSO, mas também do tempo e da temperatura de exposição a estes, tendo sido o tempo de exposição superior nos protocolos com PROH utilizados neste trabalho que podem justificar os resultados obtidos.

Outro parâmetro estudado foi o potencial de membrana mitocondrial para avaliar o efeito da vitrificação e do choque osmótico na viabilidade das mitocôndrias que, de acordo com Nagai *et al.* (2006) é primordial para o sucesso do processo de criopreservação e manutenção da capacidade para o desenvolvimento dos oócitos vitrificados. Os presentes resultados evidenciaram que os oócitos vitrificados com os protocolos com PROH apresentaram menores alterações neste parâmetro quando comparados com oócitos vitrificados com EG+DMSO e com oócitos não submetidos a qualquer efeito dos CPAs ou frio (controle). Perante estes resultados podemos concluir que este não é um parâmetro que explica os piores resultados obtidos para o PROH em termos de capacidade de desenvolvimento dos oócitos vitrificados.

A teoria de que a exposição aos CPAs e ao frio, subjacentes ao processo de vitrificação, prejudica a fertilização provocando a exocitose dos grânulos corticais e conseqüentemente o endurecimento prematuro da ZP (Vincent *et al.* 1990) foi sustentada por este trabalho visto que, se verificou uma maior percentagem de exocitose em todos os protocolos de vitrificação quando comparados com os oócitos não submetidos à imersão em NL₂, excluindo o grupo PROH sem cálcio (figura 6). Este grupo (figura 6, gráfico da experiência 1) teve menor percentagem de exocitose completa e maior incompleta do que o grupo EG+DMSO com cálcio sugerindo que a presença de Ca²⁺ nos meios de vitrificação potencia o efeito negativo nestes CPAs, aumentando a taxa de exocitose completa. O bloqueio à polispermia após a fertilização é um processo muito complexo, envolvendo várias proteínas intracelulares da família SNARE, ativadas após a ligação do spz e o aumento da concentração de Ca²⁺, regulando a exocitose dos grânulos corticais (Tsai *et al.* 2011). Este processo foi alterado nos oócitos vitrificados mas também após apenas o choque ósmotico em alguns grupos (figura 6).

Num estudo realizado em ratos, Fujiwara *et al.* (2010) sugerem a possibilidade de que o processo de vitrificação por si só induz a exocitose dos grânulos corticais através do aumento

de Ca^{2+} intracelular e que este aumento pode ser combatido removendo o Ca^{2+} dos meios. No presente trabalho, não encontramos um efeito individual do Ca^{2+} na excitose dos grânulos corticais mas verificamos que o grupo EG+DMSO com cálcio apresentou maior percentagem de excitose completa que o grupo PROH sem cálcio, apesar de não se ter verificado para os restantes grupos. Algumas destas incorências poderão resultar de uma sobreposição do efeito do frio/arrefecimento cuja proteção parece ser muito menor quando utilizado o CPA PROH, ou ser devido ao número reduzido da amostra e dificuldades na interpretação das imagens de fluorescência.

Segundo Tian *et al.* (2007) o endurecimento da ZP pode ser provocado apenas pelo processo de vitrificação, ou seja, resulta de um efeito conjunto da exposição ao frio e aos CPAs, não sendo suficiente o efeito exclusivo dos CPAs, testado na experiência 2, o que vai ao encontro dos nossos resultados dos tempos de digestão da ZP (figura 7, gráfico da experiência 2). Nos grupos com PROH o tempo de digestão até diminuiu sugerindo, em vez do endurecimento da ZP, o enfraquecimento desta como efeito do choque osmótico. Kasai *et al.* (2002) identificaram a existência de lesões a nível da integridade da ZP e mesmo da membrana plasmática, algumas invisíveis macroscopicamente, comprometendo a viabilidade dos oócitos e que poderão explicar estes resultados. Por outro lado, os CPAs EG+DMSO, independentemente da presença de Ca^{2+} , não parecem exercer esse efeito na ZP, tanto na experiência 1 como na 2 (figura 7) uma vez que o tempo de digestão desta é semelhante ao grupo controlo.

Relacionando o tempo de digestão da ZP com os resultados de desenvolvimento embrionário de oócitos vitrificados e submetidos ao choque osmótico (tabelas 5 e 6), o maior endurecimento da ZP dos oócitos vitrificados nos grupos com PROH (figura 7, gráfico da experiência 1) poderá ser explicado pelo efeito mais acentuado do choque osmótico e possível toxicidade encontrada para este CPA e também pela menor resistência ao frio. Outros autores referem que este endurecimento traduzido por um aumento do tempo de digestão pode ser devido à presença de Ca^{2+} nos meios (Larman *et al.* 2006), o que não se verificou neste trabalho.

A composição lipídica dos COCs e a permeabilidade da membrana aos CPAs foram também parâmetros avaliados neste trabalho (experiência 3). Pereira *et al.* (2007) e Clark & Swain (2013) demonstraram a influência negativa exercida pelos lípidos citoplasmáticos na tolerância das células à criopreservação. Neste trabalho foi analisada a composição em ácidos

gordos dos COCs, para verificar se o conteúdo lipídico destes seria alterado pela exposição aos CPAs. Os resultados (tabela 7) revelaram que a concentração de ácidos gordos totais por COC ($P > 0.05$) não foi alterada pelos diferentes tratamentos, mas que estes interferiram na composição individual do ácido gordo C18:1c11. A análise da composição em ácidos gordos dos COCs mostrou ainda que o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0) e o ácido oleico (C18:1c9) foram o primeiro, segundo e terceiro ácidos gordos mais abundantes, respectivamente. Outros autores encontraram uma predominância do C16:0, C18:0 e C18:1c9 porém numa ordem diferente (Kim *et al.* 2001, Lapa *et al.* 2011). Estes autores têm como segundo ácido gordo mais abundante o ácido oleico (C18:1c9) e terceiro o ácido esteárico (C18:0). Estas diferenças podem ser justificadas pelas diferentes origens das amostras, alimentação e raças diferentes ou quantidade reduzida das amostras e também pelo método de análise utilizado.

Segundo Kim *et al.* (2001) a composição em ácidos gordos pode ser importante para a competência do oócito e para as diferenças na fertilização e no potencial de desenvolvimento. No entanto, as diferenças encontradas resultantes do efeito dos CPAs foram essencialmente no C18:1c11, sendo a sua concentração superior nos protocolos com EG+DMSO. O papel no C18:1c11 na resistência à criopreservação dos oócitos deverá ser aprofundado. Estes autores (Kim *et al.* 2001) sugerem também que a composição lipídica dos oócitos é semelhante à do meio de cultura porém, Lapa *et al.* (2011) confirmaram a hipótese de que os oócitos possuem um mecanismo de proteção que lhes permite manter estáveis os níveis de AGPI prevenindo danos no oócito. Neste trabalho as concentrações de AGPI foram superiores no meio de cultura quando comparados com os oócitos e respectivas células do *cumulus*, em todos os grupos analisados, estando de acordo com a hipótese apresentada acima. Foram igualmente identificadas algumas diferenças na composição em ácidos gordos entre células do *cumulus* e oócitos. Prates *et al.* (2013) após a análise de COCs porcinos também encontraram diferenças nesta composição entre células do *cumulus* e oócitos, sugerindo a existência de um sistema de comunicação e trocas de ácidos gordos dentro dos COCs durante o processo de maturação, influenciando a qualidade dos oócitos e a resistência à criopreservação.

Avaliando por fim a permeabilidade da membrana plasmática, este é também um parâmetro importante para a tolerância das células à criopreservação porque pode modular outros fatores como a toxicidade dos CPAs e as mudanças drásticas de volume devido ao *stress* osmótico, responsáveis pelos principais danos causados pelo processo de criopreservação

(Matos *et al.* 2015). Os nossos resultados revelaram um valor médio de permeabilidade da membrana superior (15.6 ± 0.36) para o grupo PROH com cálcio, ou seja o CPA PROH, na presença de Ca^{2+} , atravessa a membrana plasmática do oócito mais rapidamente. Jin *et al.* (2011) obtiveram valores de permeabilidade mais elevados assim como Matos *et al.* (2015). Segundo Matos *et al.* (2015) a redução da velocidade de fluxo de entrada/saída de água e CPAs das células favorece a sua sobrevivência após a criopreservação através da diminuição do *stress* osmótico. Assim sendo, para os grupos EG+DMSO os valores de permeabilidade da membrana podem justificar os melhores resultados no desenvolvimento dos oócitos e o mesmo se passa para o grupo PROH com cálcio. Porém, o grupo PROH sem cálcio apresentou um valor de permeabilidade diferente que o PROH com cálcio sugerindo uma interação entre o CPA e o Ca^{2+} . Neste caso a diminuição do Ca^{2+} parece influenciar a permeabilidade da membrana aos CPAs.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu-nos concluir que o protocolo de vitrificação composto pela combinação dos CPAs, EG+DMSO, foi mais eficaz quanto ao desenvolvimento dos oócitos comparativamente ao protocolo constituído pelo CPA PROH. Foi identificado um efeito mais acentuado do choque osmótico e/ou toxicidade aliados a um possível endurecimento precoce da ZP, assim como menores concentrações de C18:1c11 nos COC nos grupos com PROH. Igualmente a permeabilidade dos oócitos foi alterada pela exposição a este CPA.

A diminuição do Ca^{2+} nos meios de vitrificação não revelou por si só um efeito significativo no desenvolvimento dos oócitos vitrificados ou submetidos apenas ao choque osmótico. No entanto nalguns dos parâmetros avaliados, parece existir uma interação deste com os diferentes CPAs sendo por isso necessários mais estudos que possam confirmar a esta interação e o papel do Ca^{2+} na criopreservação dos oócitos.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe H, Yamashita S, Satoh T & Hoshi H** (2002) Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development* **61** 57–66.
- Agca Y, Liu J, Peter AT, Critser ES & Critser JK** (1998) Effect of Developmental Stage on Bovine Oocyte Plasma Membrane Water and Cryoprotectant. *Molecular Reproduction and Development* **49** 408–415.
- Albarracín JL, Morató R, Rojas C & Mogas T** (2005) Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* **63** 890–901.
- Albertini DF** (1992) Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research* **296** 57–68.
- Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, Caserta D, Cosmi E, Marci R & Moscarini M** (2006) Oocytes cryopreservation: state of art. *Reproductive Toxicology* **22** 250–262.
- Antunes G, Marques A, Santos P, Chaveiro A & Moreira da Silva F** (2008) *Atlas Do Ovócito E Do Embrião Bovino*. Estoril: Príncipeia.
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB & Crowe JH** (1996) Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* **33** 589–599.
- Auclair S, Uzbekov R, Elis S, Sanchez L, Kireev I, Lardic L, Dalbies-Tran R & Uzbekova S** (2013) Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **304** E599–E613.
- Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J & Courbiere B** (2010) Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology* **48** 1905–1912.
- Bhat MH, Yaqoob SH, Khan FA, Waheed SM, Sharma V, Vajta G, Ganai NA & Shah RA** (2013) Open pulled straw vitrification of in vitro matured sheep oocytes using different cryoprotectants. *Small Ruminant Research* **112** 136–140.
- Borini A & Bianchi V** (2011) Oocyte cryopreservation. Slow freezing. In *Principles and Practice of Fertility Preservation*, pp 283–292. Eds J Donnez and SS Kim. New York: Cambridge University Press.
- Cabodevila J & Teruel M** (2001) Criopreservación de embriones bovinos. In *Bioteconología de La Reproducción*, pp 149–174. Ed GA Palma. Buenos Aires: Gustavo A. Palma.
- Calhaz Jorge C** (2005) Ovulação, fecundação e implantação. In *Medicina Materno-Fetal*, pp 11–12. Ed L Mendes da Graça. Lisboa: Lidel.
- Carlson BM** (2009) Transport of Gametes and Fertilization. In *Human Embryology and Developmental Biology*, pp 31–35. Philadelphia: Mosby elsevier.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G & Beconi M** (1999) Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation. *Theriogenology* **51** 541–550.
- Cetica P, Pintos L, Dalvit G & Beconi M** (2002) Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction* **124** 675–681.

- Chang C-C, Nel-Themaat L & Nagy ZP** (2011) Cryopreservation of oocytes in experimental models. *Reproductive Biomedicine Online* **23** 307–313.
- Chen C** (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet* **1** 884–886.
- Chian R-C, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O & Nagai T** (2004) High Survival Rate of Bovine Oocytes Matured In Vitro Following Vitrification. *Journal of Reproduction and Development* **50** 685–696.
- Chian R-C, Wang Y & Li Y-R** (2014) Oocyte vitrification: advances, progress and future goals. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **31** 411–420.
- Ciani F, Cocchia N, Esposito L & Avallone L** (2012) Fertility Cryopreservation. In *Advances in Embryo Transfer*, pp 225–248. Ed B Wu. Rijeka: InTech.
- Clark NA & Swain JE** (2013) Oocyte cryopreservation: searching for novel improvement strategies. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **30** 865–875.
- Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohí J & Pellicer A** (2013) Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertility and Sterility* **99** 1485–1495.
- Cocchia N, Ciani F, Russo M, El Rass R, Rosapane I, Avallone L, Tortora G & Lorizio R** (2010) Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. *Cryobiology* **60** 229–234.
- Coticchio G, Bonu MA, Borini A & Flamigni C** (2004) Oocyte cryopreservation: a biological perspective. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **115S** S2–S7.
- Cox J, Hormazabal J & Santa Maria A** (1993) Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology* **40** 1259–1267.
- Coy P, Gadea J, Romar R, Matás C & García E** (2002) Effect of in vitro fertilization medium on the acrosome reaction, cortical reaction, zona pellucida hardening and in vitro development in pigs. *Reproduction* **124** 279–288.
- Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C & Aviles M** (2008) Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* **135** 19–27.
- Criado E, Albani E, Novara PV, Smeraldi A, Cesana A, Parini V & Levi-Setti PE** (2011) Human oocyte ultravitrification with a low concentration of cryoprotectants by ultrafast cooling: a new protocol. *Fertility and Sterility* **95** 1101–1103.
- Díez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, de la Varga S, Fernández A, Facal N & Carbajo M** (2005) Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* **64** 317–333.
- Díez C, Muñoz M, Caamaño JN & Gómez E** (2012) Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. *Reproduction in Domestic Animals* **47 Suppl 3** 76–83.
- Dunning KR, Russell DL & Robker RL** (2014) Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* **148** R15–R27.
- Van Der Elst J, Van Den Abbeel E, Nerinckx S & Van Steirteghem A** (1992) Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology* **29** 549–562.

- Ezoe K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Miki T, Takayama Y, Beyhan Z, Kato Y, Okuno T, Kobayashi T & Kato K** (2015) Developmental Competence of Vitrified-Warmed Bovine Oocytes at the Germinal-Vesicle Stage is Improved by Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators during In Vitro Maturation. *PloS One* **10** 1–14.
- Ferguson EM & Leese HJ** (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* **116** 373–378.
- Ferguson EM & Leese HJ** (2006) A Potential Role for Triglyceride as an Energy Source During Bovine Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *Molecular Reproduction and Development* **73** 1195–1201.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V, Ferriani RA & Navarro PAAS** (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71** 836–848.
- Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J & Kashiwazaki N** (2010) Ethylene Glycol-supplemented Calcium-free Media Improve Zona Penetration of Vitrified Rat Oocytes by Sperm Cells. *Journal of Reproduction and Development* **56** 169–175.
- Fuku E, Xia L & Downey BR** (1995) Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **32** 139–156.
- Horvath G & Seidel GE** (2006) Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* **66** 1026–1033.
- Hwang I-S & Hochi S** (2014) Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *BioMed Research International* **2014** 1–11.
- Hyttle P, Fair T, Callesen H & Greve T** (1997) Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* **47** 23–32.
- Jin B, Kawai Y, Hara T, Takeda S, Seki S, Nakata Y-I, Matsukawa K, Koshimoto C, Kasai M & Edashige K** (2011) Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction* **85** 834–847.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T & Machida T** (1990) A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Reproduction* **89** 91–97.
- Kim J, Kinoshita M, Ohnishi M & Fukui Y** (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* **122** 131–138.
- Kohaya N, Fujiwara K, Ito J & Kashiwazaki N** (2011) High Developmental Rates of Mouse Oocytes Cryopreserved by an Optimized Vitrification Protocol: The Effects of Cryoprotectants, Calcium and Cumulus Cells. *Journal of Reproduction and Development* **57** 675–680.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O & Leibo SP** (2005) Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* **11** 300–308.
- Lapa M, Marques CC, Alves SP, Vasques MI, Baptista MC, Carvalhais I, Silva Pereira M, Horta a EM, Bessa RJB & Pereira RM** (2011) Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. *Reproduction in Domestic Animals* **46** 904–910.
- Larman MG, Sheehan CB & Gardner DK** (2006) Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* **131** 53–61.

- Ledda S, Leoni G, Bogliolo L & Naitana S** (2000) Oocyte Cryopreservation and Ovarian Tissue Banking. *Theriogenology* **55** 1359–1371.
- Liu J, Phy J & Yeomans E** (2012) Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. *Theriogenology* **78** 1641–1652.
- Lonergan P, Faerge I, Hyttel PM, Boland M & Fair T** (2003) Ultrastructural modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or butyrolactone. *Molecular Reproduction and Development* **64** 369–378.
- Luvoni GC** (2006) Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* **66** 101–111.
- Luvoni GC & Pellizzari P** (2000) Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* **53** 1529–1540.
- Manipalviratn S, Tong Z-B, Stegmann B, Widra E, Carter J & DeCherney A** (2011) Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration.pdf. *Fertility and Sterility* **95** 1839–1841.
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N & Jin F** (2014) Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reproductive Biomedicine Online* **28** 284–299.
- Martins AP, Lopes PA, Martins S V, Madeira A, Santos NC, Prates JAM, Moura TF & Soveral G** (2010) Conjugated linoleic acid reduces permeability and fluidity of adipose plasma membranes from obese Zucker rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **398** 199–204.
- Matos JE, Marques CC, Moura TF, Baptista MC, Horta AEM, Soveral G & Pereira RMLN** (2015) Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Reproductive Biology and Endocrinology* **13** 1–8.
- Mattioli M, Barboni B, Luisa G & Loi P** (2003) Cold-Induced Calcium Elevation Triggers DNA Fragmentation in Immature Pig Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **65** 289–297.
- Men H, Monson RL & Rutledge JJ** (2002) Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology* **57** 1095–1103.
- Mo XH, Fu XW, Yuan DS, Wu GQ, Jia BY, Cheng KR, Du M, Zhou YH, Yue MX, Hou YP, Li JJ & Zhu SE** (2014) Effect of meiotic status, cumulus cells and cytoskeleton stabilizer on the developmental competence of ovine oocytes following vitrification. *Small Ruminant Research* **117** 151–157.
- Morató R, Izquierdo D, Paramio MT & Mogas T** (2008) Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* **57** 137–141.
- Moussa M, Shu J, Zhang X & Zeng F** (2014) Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Science China. Life Sciences* **57** 903–914.
- Mukaida T & Oka C** (2012) Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* **26** 789–803.
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H & Hoshi K** (2006) Correlation of Abnormal Mitochondrial Distribution in Mouse Oocytes with Reduced Developmental Competence. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* **210** 137–144.

- Paczkowski M, Silva E, Schoolcraft WB & Krisher RL** (2013) Comparative Importance of Fatty Acid Beta-Oxidation to Nuclear Maturation, Gene Expression, and Glucose Metabolism in Mouse, Bovine, and Porcine Cumulus Oocyte Complexes. *Biology of Reproduction* **88** 111–111.
- Pereira RM & Marques CC** (2008) Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and Tissue Banking* **9** 267–277.
- Prates, EG, Alves, SP, Marques, CC, Baptista, MC, Horta, Bessa, RJB & Pereira R** (2013) Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin. *In Vitro Cellular & Development Biology* **49** 335–345.
- Prates EG, Nunes JT & Pereira RM** (2014) A role of lipid metabolism during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo production. *Mediators of Inflammation* **2014** 1–11.
- Prentice JR, Singh J, Dochi O & Anzar M** (2011) Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology* **75** 602–609.
- Rojas C, Palomo MJ, Albarracín JL & Mogas T** (2004) Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology* **49** 211–220.
- Ruppert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ & Shaw RW** (2006) Membrane integrity and development of immature murine cumulus-oocyte complexes following slow cooling to -60 degrees C: the effect of immediate rewarming, plunging into LN2 and two-controlled-rate-stage cooling. *Cryobiology* **52** 219–227.
- Sakurai T & Machida T** (1992) Survival of Mouse Morulae Vitrified in an Ethylene at Various Glycol-Based after Exposure to the Solution. *Biology of Reproduction* **47** 1134–1139.
- Saunders KM & Parks JE** (1999) Effects of Cryopreservation Procedures on the Cytology and Fertilization Rate of In Vitro-Matured Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction* **61** 178–187.
- Seidel GE** (2006) Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* **65** 228–235.
- Shaw JM & Jones GM** (2003) Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update* **9** 583–605.
- Si W, Benson JD, Men H & Critser JK** (2006) Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology* **53** 336–348.
- Smith GD, Motta EE & Serafini P** (2011) Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification. *Reproductive Biomedicine Online* **23** 298–306.
- Sprícigo JFW, Morais K, Ferreira AR, Machado GM, Gomes ACM, Rumpf R, Franco MM & Dode MAN** (2014) Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology* **69** 256–265.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonc PB & Wolf E** (2001) Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation : Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. *Biology of Reproduction* **64** 904–909.
- Succu S, Berlinguer F, Leoni GG, Bebbere D, Satta V, Marco-Jimenez F, Pasciu V & Naitana S** (2011) Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology* **75** 715–721.

- Sutton M, Cetica P, Beconi M, Kind K, Gilchrist R & Thompson J** (2003a) Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* **126** 27–34.
- Sutton ML, Gilchrist RB & Thompson JG** (2003b) Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update* **9** 35–48.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB & Thompson JG** (2010) The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction* **139** 685–695.
- Tanghe S, Van Soom A, Mehrzad J, Maes D, Duchateau L & de Kruif A** (2003) Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology* **60** 135–149.
- Tian S-J, Yan C-L, Yang H-X, Zhou G-B, Yang Z-Q & Zhu S-E** (2007) Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Animal Reproduction Science* **101** 365–371.
- Tinneberg H-R & Gasbarrini A** (2013) Infertility today: the management of female medical causes. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* **123 Suppl** S25–S30.
- Tsai P-S, van Haeften T & Gadella BM** (2011) Preparation of the cortical reaction: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. *Biology of Reproduction* **84** 327–335.
- Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T & Callesen H** (1999) The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* **52** 939–948.
- Wang W, Hosoe M, Li R & Shioya Y** (1997) Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Development, Growth & Differentiation* **39** 607–615.
- Yamaji Y, Seki S, Matsukawa K, Koshimoto C, Kasai M & Edashige K** (2011) Developmental Ability of Vitrified Mouse Oocytes Expressing Water Channels. *Journal of Reproduction and Development* **57** 403–408.
- Zeron Y, Pearl M, Borochoy A & Arav A** (1999) Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* **38** 35–42.
- Zhao X, Du W, Wang D, Hao H, Liu Y, Qin T & Zhu H** (2011) Effect of cyclosporine pretreatment on mitochondrial function in vitrified bovine mature oocytes. *Fertility and Sterility* **95** 2786–2788.
- Zhou XL, Al Naib a, Sun D-W, Sun DW & Lonergan P** (2010) Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology* **61** 66–72.

8. ANEXOS

Tabela 9 Crioprotetores

Reagentes	Laboratório	Referência
EG	Sigma	E9129
DMSO	Sigma	D5879
PROH	Sigma-Aldrich	P4347
Sucrose	Sigma	S1888

Tabela 10 Meio de lavagem 1 (W1)

Reagentes	Laboratório	Referência	Concentração	Quantidade
TCM199	gibco	22340-020	–	95 mL
Água para embriões	Sigma	W1503	5%	5 mL *
OCS	–	–	5%	5 mL
Antibiótico	BI	03-033-1B	1%	1 mL

*Dos 100 mL da solução inicial (TCM199+água), desprezam-se 5 mL.

Tabela 11 Meio de maturação dos complexos *cumulus* oócitos

Reagentes	Laboratório	Referência	Concentração	Quantidade
TCM199	Sigma	M4530	–	9 mL
Gentamicina	Sigma	G1272	10.5 mM	40 µL
Piruvato de sódio	Sigma	4562	0.3 M	50 µL
SOCS	–	–	10%	1 mL

Tabela 12 Meio de fertilização (FERT) e meio de lavagem 2 (W2)

Reagentes	Laboratório	Referência	FERT		W2	
			Concentração	Quantidade	Concentração	Quantidade
NaCl	Sigma	S5886	0.11 M	0.6660 gr	0.11 M	0,6660 gr
KCl	Sigma	P9333	3.2 mM	0.0238 gr	3.2 mM	0.0238 gr
NaHCO ₃	Merk	1.06329.0500	0.02 M	0.2090 gr	2 mM	0.0168 gr
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Sigma	S-9638	0.24 mM	0.0062 gr	0.24 mM	0.0062 gr
Lactato de sódio	Merk	6522.0500	0.01 M	160 µL	0.01 M	160 µL
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Sigma-Aldrich	M0250	0.17 mM	0.0100 gr	0.17 mM	0.0100 gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma	C-5080	1.2 mM	0.0294 gr	1.2 mM	0.0294 gr
Hepes	Sigma	H3375	0.01 M	0.2400 gr	0.01 M	0.2400 gr
Vermelho Fenol	Sigma-Aldrich	P3532	28.2 µM	0.0010 gr	28.2 µM	0.0010 gr
Piruvato de sódio	Sigma	4562	0.63 mM	0.0055 gr	0.63 mM	0.0055 gr
BSA	Sigma	A7888	0.6%	0.6000 gr	0.3%	0.3000 gr
Heparina	Sigma	H3393	182 usp/mg	0.0030 gr	–	–
Glucose	Sigma	G6152	5.6 mM	0.1000 gr	5.6 mM	0.1000 gr
Antibiótico	BI	03-033-1B	2%	2 mL	2%	2 mL
Penicilamina	Sigma	P-4875	2 mM		–	–
Epinefrina	Sigma	E-1635	0.25 mM		–	–
PHE Hipotaurina	Sigma	H-1384	1 mM	4 mL	–	–
Solução salina	–	–	0.9%		–	–
Água para embriões	Sigma	W1503	–	100 mL	–	100 mL
pH			7.8		7.3-7.4	
osmolaridade			300 mOsm		265 – 270 mOsm	

Tabela 13 Meio de fluído sintético do oviduto (SOF)

Reagentes	Laboratório	Referência	Concentração	Quantidade
NaCl	Sigma	S5886	0.11 M	0.3147 gr
KCl	Sigma	P9333	7 mM	0.0267 gr
KH ₂ PO ₄	Merk	1.04873.0250	1 mM	0.0081 gr
CaCl ₂ 2H ₂ O	Merck	2382	2 mM	0.0126 gr
MgCl ₂ 6H ₂ O	Merck	5833	0.5 mM	0.0049 gr
NaHCO ₃	Merk	1.06329.0500	0.02 M	0.105 gr
Na lactato	Merk	6522.0500	3 mM	14.1 µL
Na Piruvato	Sigma	4562	0.3 mM	0.0017 gr
Vermelho fenol	Sigma	P3532	4 µM	0.000065 gr
Glutatião	Sigma	G-6013	0.1 mM	0.0031 gr
Glutamina	Sigma		1 mM	0.25 mL
AA essenc. (BME)	Sigma	B6766	1%	1 mL
AA n/essenc.(MEM)	Sigma	M7145	2%	5 mL
Água para embriões	Sigma	W1503	–	50 mL

Tabela 14 Meio de transferência de embriões

Reagentes	Laboratório	Referência	Concentração	Quantidade
SOF	–	–	–	12.5 mL
BSA	Sigma-Aldrich	A-7888	0.6% (p/v)	0.075 gr

Tabela 15 Meio de cultura *in vitro* de embriões

Reagentes	Laboratório	Referência	Concentração	Quantidade
SOF	–	–	–	9 mL
BSA	Sigma-Aldrich	A-7888	0.6% (p/v)	0.06 gr
FBS	Sigma	F9665	10% (v/v)	1 mL