

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA CONGELAÇÃO LENTA E VITRIFICAÇÃO
SOBRE A QUALIDADE E VIABILIDADE DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Fabício Rasi de Almeida Prado

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Abril de 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABRÍCIO RASI DE ALMEIDA PRADO – Nascido em 11 de Agosto de 1976, formado em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas no ano de 2004, concluiu o curso de mestrado no ano de 2006 pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu cujo orientador foi o professor doutor Gilson Hélio Toniollo e no ano de 2007 deu início ao doutorado pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, onde a orientadora foi a professora doutora Gisele Zoccal Mingoti.

Duas coisas são infinitas: o universo e a estupidez dos homens

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

A minha esposa Melissa pela ajuda e dedicação durante esta importante etapa das nossas vidas.

Aos meus pais e irmãos João e Nilva, Gustavo e Eduardo pelo estímulo e ajuda durante este percurso

A minha companheira e amiga fiel Mel, que durante um ano e cinco meses esteve presente na minha família e na minha vida, MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal por ter me recebido e permitido que eu realizasse o programa de pós-graduação.

A minha orientadora Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti pelos ensinamentos, orientação, atenção, paciência e estímulo no desenvolvimento deste projeto.

A CAPES pela bolsa concedida durante o curso de doutorado.

Aos professores doutores João Ademir e Gener pela ajuda no desenvolvimento das análises estatísticas deste projeto de pesquisa.

Agradeço também a todos que de forma direta e indireta colaboraram com a realização deste trabalho

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMO.....	X
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de embriões criopreservados com glicerol e cultivados após por 48 horas após a descongelação.....28
- Tabela 2.** Número de embriões criopreservados com glicerol e sacarose e cultivados após por 48 horas após descongelação.....29
- Tabela 3.** Número de embriões criopreservados com etilenoglicol e cultivados após por 48 horas após descongelação.....30
- Tabela 4.** Número de embriões criopreservados com etilenoglicol e sacarose e cultivados após por 48 horas após descongelação.....31
- Tabela 5.** Desenvolvimento e qualidade de embriões cultivados in vitro após congelação com diferentes crioprotetores.....32
- Tabela 6.** Taxa de gestação de vacas após a inovulação de embriões vitrificados em receptoras.....33
- Tabela 7.** Taxa de gestação entre raças após a inovulação de embriões vitrificados em receptoras.....33

ABREVIATURAS

BI- Blastocisto

BSA - Albumina sérica bovina

°C - Grau Celsius

PIV - Produção embrionário *in vitro*

CO₂ - Dióxido de Carbono

FIV - Fecundação *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

Hr - Horas

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

LH - Hormônio luteinizante

Mg - Miligramas

MIV - Maturação *in vitro*

ml - Mililitro

OPU - Punção folicular guiada por ultra-som

PBS - Tampão salina fosfato

SAS - "Statistical analysis system"

SFB - Soro fetal bovino

SOF - Fluido sintético de oviduto

TALP - "Tyrode.s Albumin Lactate and Pyruvate"

TCM199 - "Tissue culture medium 199"

% - Porcentagem

RESUMO

O objetivo deste estudo foi contribuir para o conhecimento da técnica de criopreservação de embriões *in vitro*. Oócitos (n=965) foram maturados durante 24h em TCM-199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio e 75 mg/ml de gentamicina. Os zigotos foram cultivados em meio SOFm suplementado com 0,5% BSA e FCS 2,5%. Culturas foram realizadas a 38,5°C em 5% de CO₂ no ar umidificado, em 100 µl de meio de gotículas recuperado com óleo mineral. No sétimo dia da cultura, os embriões (n = 387) foram marcados e apenas blastocistos excelente a boa qualidade foram criopreservados (10 embriões / palheta 0,25 ml). Os seguintes grupos experimentais foram concebidos, nomeado de acordo com a solução de crioprotetor utilizado: glicerol 1,0 M de etileno glicol em PBS (G); glicerol 1,0 M + 0,3 M de sacarose em PBS (GS); etilenoglicol 1.5 M em PBS (E) e 1,5 M + 0,3 M de sacarose em PBS (ES). Após o descongelamento, os embriões foram re-cultivadas em 100 ml de meio de gotas SOFm a 38,5 ° C e 5% de CO₂ no ar por 72 h. Os dados demonstraram que a qualidade do embrião, avaliada pelo escore de embriões e número de células embrionárias, parece ser melhor no grupo E e ES. No processo de vitrificação, 300 embriões de excelente qualidade morfológica, Bi e Bl foram vitrificados, e foram sincronizadas 500 receptoras de embriões, divididas em 3 grupos de 150 animais cada grupo. O diagnóstico de gestação nas receptoras após a inovulação dos embriões foram realizados após 42 dias. A taxa de concepção variou entre os grupos, sendo que no grupo I obteve 6 gestações (18,75%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 9 gestações (26,47%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e 12 gestações (35,3%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman. No grupo II, obteve 3 gestações (9,38%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 7 gestações (20,6%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e 9 gestações (26,5%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman. No grupo III, obteve 8 gestações (25,0%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 10 gestações (29,41%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e 10 gestações (29,41%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman.

Não houve diferenças estatísticas entre os grupos. No procedimento in vitro, o etilenoglicol teve a vantagem de ser menos tóxico do que outros crioprotetores, devido ao seu baixo peso molecular, podemos concluir que a criopreservação de embriões PIV com este crioprotetor tende a produzir embriões de melhor qualidade após a descongelação e no experimento in vivo, estatisticamente não houve diferença, entre raças dentro do grupo e nem entre grupos.

Palavras-Chaves: Bovinos, criopreservação, vitrificação, embriões, in vitro

ABSTRACT

The aim of this study was to contribute to the knowledge of the technique of cryopreservation of embryos in vitro. Oocytes (n = 965) were matured for 24h in TCM-199 supplemented with 0.2 mM pyruvate, 25 mM sodium bicarbonate and 75 mg / ml of gentamicin. Zygotes were cultured in medium supplemented with 0.5% SOFm BSA and 2.5% FCS. Cultures were performed at 38.5 °C in 5% CO₂ in humidified air in 100 l of medium droplets recovered with mineral oil. On the seventh day of culture, the embryos (n = 387) were scored and only good quality excellent blastocysts were cryopreserved (10 embryos / straw 0.25 ml). The following experimental groups were designed, named according to the cryoprotectant solution used: glycerol 1.0 M ethylene glycol in PBS (G) 1.0 M glycerol + 0.3 M sucrose in PBS (GS), ethylene glycol 1.5 M PBS (E) and 1.5 M + 0.3 M sucrose in PBS (ES). After thawing, the embryos were re-grown in 100 ml of medium SOFm drops to 38.5 °C and 5% CO₂ in air for 72 h. The data demonstrated that embryo quality was evaluated by scoring the number of embryos and embryonic cells, seems to be better in group E and ES. In the process of vitrification, 300 embryos of excellent morphology, Bi and Bl, were vitrified, and 500 were synchronized embryo recipients were divided into 3 groups of 150 animals each group. Pregnancies after embryo transfer in recipient embryos were performed after 42 days. The conception rate varied between the groups, whereas in group I had six pregnancies (18.75%) of recipients that received embryos Nellore, 9 pregnancies (26.47%) of recipients that received embryos of Brangus and 12 pregnancies (35.3%) of recipients that received embryos from Brahman. In group II, had three pregnancies (9.38%) of recipients that received embryos Nellore, 7 pregnancies (20.6%) of recipients that received embryos of Brangus and nine pregnancies (26.5%) of recipients that received embryos from Brahman. In group III, had eight pregnancies (25.0%) of recipients that received embryos Nellore, 10 pregnancies (29.41%) of recipients that received embryos of Brangus and 10 pregnancies (29.41%) of recipients that received embryos from Brahman. There were no statistical differences between groups. In the in vitro procedure, the ethylene glycol had the advantage of being less toxic than other cryoprotectants due to its low molecular weight, we can conclude that cryopreservation

of IVP embryos with cryoprotectant this tends to produce better quality embryos after thawing and in experiment In vivo, no statistically significant difference between breeds within the group or between groups.

Key Words: Cattle, cryopreservation, vitrification, embryos, in vitro

I. INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, as pesquisas em reprodução animal tiveram um grande avanço principalmente na área de biotecnologia aplicada. As biotécnicas da reprodução possuem grande importância para aplicação em programas de manejo reprodutivo assistido, especialmente em relação ao aproveitamento de gametas de animais com características fenotípicas e genotípicas desejáveis e ao intercâmbio de material genético entre países. Além da importância zootécnica, as pesquisas que envolvem a utilização de biotecnologia *in vitro* possuem papel fundamental para permitir o estudo dos mecanismos fisiológicos básicos que ocorrem *in vivo* (HASLER et al., 1997). O Brasil atualmente é o país que mais se destaca na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. Todavia, a menor criotolerância desses embriões, quando comparados com embriões produzidos *in vivo*, levam à necessidade do estabelecimento de um eficiente e prático protocolo de criopreservação, visando maximizar o aproveitamento dos embriões PIV excedentes que não puderam ser transferidos, seja por falta de receptoras ou outras razões (IETS, 2005; WERLICH et al., 2006).

A transferência comercial de embriões teve início na década de 70, porém a escassez no número de receptoras disponíveis para a transferência dos embriões sempre foi um fator limitante. Conseqüentemente, muitos embriões produzidos eram descartados ou mantidos por até 24 horas, no máximo, para serem então transferidos (ALVES et al., 2003).

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* oferece uma série de vantagens, como a preservação de material para o estabelecimento de bancos genéticos de diversas raças para uso futuro, pois favorece o armazenamento dos embriões por longos períodos com reduzida perda da capacidade de desenvolvimento, possibilitando a preservação de material genético de animais zootecnicamente superiores (KAIDI et al., 1999). Outra vantagem é proporcionar a otimização do aproveitamento de gametas femininos. Associado a isto, a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* representa uma ferramenta indispensável para dinamizar e difundir o processo de PIV.

Todavia, embriões bovinos de PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo*. Isto torna o método convencional de congelação inadequado para a criopreservação destes embriões, principalmente em função do excessivo tempo de exposição à faixa térmica correspondente à solidificação dos lipídios (MEZZALIRA et al., 2004). As taxas de prenhez com embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco e de embriões produzidos *in vivo* e transferidos após a descongelação estão em torno de 60 a 70%, enquanto que, para embriões produzidos *in vitro* e criopreservados, estes valores são inconstantes e mais baixos, ao redor de 20 a 25% (BERTHELOT et al., 2007).

Desta forma, torna-se essencial o estabelecimento de uma metodologia eficiente para criopreservação de embriões bovinos, que seja simples, rápida e viável, tanto para aplicações em pesquisas como em escala comercial.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O método de congelação convencional tem sido amplamente utilizado na criopreservação dos embriões, por ser uma técnica que a utilização de reduzida concentração de crioprotetores e permitindo a transferência direta após o congelação (VOLKEL & HU, 1992). Entretanto a capacidade de prevenir a formação de gelo é limitada, e os resultados na criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* ainda são variáveis (HASLER et al., 1995; MASSIP et al., 1995; HOCKI et al., 1996; KAIDI et al., 2001), sendo inferiores as taxas obtidas em embriões produzidos *in vivo* (ALVARENGA et al., 2007; DINNYES & NEDAMBALE, 2009).

Embriões PIV são mais sensíveis à baixa temperatura (VARAGO et al., 2006). Este fato pode ser atribuído principalmente à sensibilidade extrema dos embriões a baixas temperaturas durante o processo de congelação (resfriamento de 0,5^oC por minuto) e, posteriormente, de armazenamento (temperaturas muito abaixo de -60^oC). A criopreservação tem por objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível o armazenamento de células e tecidos por tempo indeterminado (RODRIGUES, 1992). O primeiro sucesso alcançado por essa técnica foi obtido simultaneamente por WHITTINGHAM et al. (1972) e WILMUT (1972) utilizando embriões de camundongos.

A razão pela qual existe a variação da viabilidade dos embriões *in vitro*, comparados com os produzidos *in vivo*, está provavelmente nas características físicas deste tipo de embrião, que fazem com que sejam mais sensíveis no momento de serem expostos a baixas temperaturas (RODRIGUES, 1996; VAJTA et al., 1997; DINNYES & NEDAMBALE, 2009).

Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes de se proceder a sua congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão, lesionando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr., 1986).

Dentre as características, estão diferenças não apenas morfológicas como também fisiológicas, como: aumento no número de vacúolos (SHAMSUDDIN et al., 1992), maior fragilidade de sua zona pelúcida (DUBY et al., 1997), menor compactação embrionária (VAN SOOM et al., 1992), menor número de blastômeros, sobre o total de massa celular interna (IWASAKI et al., 1990; RIZOS et al., 2002), alterações na expressão gênica (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; LAZZARI et al., 2002; RIZOS et al., 2003; LONERGAN et al., 2003), maior incidência de apoptoses (POMAR et al., 2005) e aumento de conteúdo citoplasmático de lipídios (MASSIP et al., 1995). Por estas razões e em especial pela última, a congelação tradicional irá diminuir consideravelmente as taxas de viabilidade de embriões PIV (PEREIRA & MARQUES, 2008). O aumento do tempo de exposição, devido à exposição gradativa da temperatura durante a congelação, faz com que o embrião permaneça maior tempo na faixa de temperatura termotrópica de transição dos lipídios, afetando-os consideravelmente (ZERON et al., 1999).

No processo de congelação, os embriões devem ser transferidos de uma solução isotônica para uma solução hipertônica, crioprotetora. Em consequência do gradiente de pressão osmótica, ocorre a saída de água do interior celular para que ocorra o equilíbrio osmótico. A redução do tamanho das células ocorre quando o equilíbrio é refeito, entre a saída de água e a entrada do crioprotetor (GORDON, 1994).

Os procedimentos de criopreservação foram desenvolvidos com intuito de preservar embriões de animais de alto valor genético/zootécnico (VAJTA, 2000). Assim, a criopreservação de embriões se tornou parte integrante da reprodução assistida, especialmente de espécies domésticas (LEIBO et al., 1996; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; KULESHOVA & LOPATA, 2002).

Apesar dos índices comercialmente satisfatórios de nascimentos obtidos através da transferência a fresco de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), a maximização do potencial da PIV está intimamente relacionada com o sucesso da criopreservação desses embriões. A baixa viabilidade de oócitos e embriões produzidos *in vitro* (PIV) submetidos à criopreservação se deve, principalmente, a sensibilidade que essas estruturas apresentam ao resfriamento. Quando expostos as temperaturas

correspondentes à fase termotrópica de transição dos lipídios (ARAV *et al.*, 2000), estas estruturas sofrem diferentes graus de alterações, que variam com o período de exposição, característica que torna a vitrificação a técnica mais promissora, por possibilitar a rápida passagem através dessa faixa crítica de temperatura (VIEIRA, *et al.*, 2008).

A água é o principal constituinte celular e desidratação adequada é importante para que não ocorra formação de grandes cristais de gelo, bem como para prevenir a excessiva concentração de solutos intracelulares (MAZUR *et al.*, 1972). Já o choque osmótico pode ocorrer se o crioprotetor intracelular não se difundir para o meio extracelular rapidamente. E como consequência ocorre o edemaciamento excessivo após a exposição ao meio hipertônico (DOCHI *et al.*, 1995).

Os danos causados aos tecidos durante os processos de criopreservação e aquecimento são devido principalmente a: formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação que ocorre durante a congelação tanto no meio extra como intracelular; ou a interação entre esses dois fatores (PICKETT, 1986).

A congelação provoca aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a esse estresse, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto se torna grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em cristais de gelo (STOREY & STOREY, 1990).

As soluções crioprotetoras intracelulares são solutos orgânicos que protegem as organelas celulares durante a congelação (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Segundo WOLFE & BRYANT (1999), os solutos podem ser classificados em três grandes categorias: (1) sais, (2) açúcares e outras moléculas de médio tamanho e em (3) macromoléculas. A sobrevivência dos embriões depende do tipo de crioprotetor, da espécie e da idade de desenvolvimento, bem como do tipo de embrião produzido (*in vivo* ou *in vitro*). A toxicidade dos crioprotetores é proporcional ao aumento da concentração e ao tempo de exposição dos embriões aos mesmos. Este fato é mais evidente em função da alta concentração requerida nos protocolos para vitrificação

(HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Os crioprotetores são também diferenciados pela sua atividade intra e extracelular. Aqueles com ação intracelular são representados principalmente pelo glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol. Como substâncias não permeáveis à célula pode-se citar as proteínas (albumina sérica bovina), os açúcares (sacarose, lactose e trealose, dentre outros) e os glicosaminoglicanos (ácido hialurônico).

Como resultado dos danos causados pelos efeitos da solução, as células de mamíferos, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20°C , a não ser que se utilize um crioprotetor (SZELL & SHELTON, 1986).

De acordo com MAZUR (1970), ao submeter uma suspensão celular contendo crioprotetores a temperaturas ao redor de -5°C , tanto as células como o meio circundante permanecem descongelados. Isto é causado pelo super-resfriamento decorrente do abaixamento do ponto de solidificação da solução provocado pela adição de substâncias crioprotetoras à suspensão celular. Entre -5 e -15°C normalmente ocorre a formação de gelo no meio extracelular, mas as células continuam descongeladas e super-resfriadas, provavelmente porque a membrana plasmática impede o crescimento dos cristais de gelo em direção ao meio intracelular. A água super-resfriada do interior da célula tem um potencial químico maior do que a água do meio extracelular, parcialmente congelada. E dessa forma a água sai da célula para congelar no meio extracelular. Se a congelação for lenta, a célula perde água com rapidez adequada para manter em equilíbrio seu potencial químico com o da água do meio extracelular. Como resultado, a célula se desidrata e não sofre a congelação intracelular. Por outro lado, se a célula for resfriada rapidamente, ela não perde água com rapidez suficiente para manter o equilíbrio, provocando um super-resfriamento e congelação intracelular, que leva à lise das membranas.

O gelo não se forma no meio intracelular devido a velocidade da congelação, já que se for lenta a célula fica super resfriada e não há formação de cristais de gelo. A membrana é uma barreira à passagem dos cristais de gelo a temperaturas ao redor de -10°C , mas deixa de ser uma barreira em temperaturas inferiores (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

Segundo SEIDEL JR. (1986) os crioprotetores promovem a redução do ponto de congelação do meio, conferindo um período maior para remoção da água intracelular durante o resfriamento prévio à congelação da água. Esses possuem ainda a capacidade de interagir com as membranas celulares, auxiliando-as a sobreviverem ao estresse provocado pelas mudanças físicas. Em adição, estas substâncias têm a aptidão de proteger os embriões contra as lesões causadas pela elevação de suas concentrações, no processo de formação do gelo e durante o resfriamento.

Os açúcares são freqüentemente utilizados na criopreservação, tornando-se um importante componente da regulação osmótica. Usualmente, os dissacarídeos são usados para o congelação e descongelação de embriões e oócitos (KULESHOVA *et al.*, 1999). Segundo SCHNEIDER (1986) a sacarose atua como uma contra força osmótica para restringir o movimento de água através das membranas. Se a sacarose está presente numa concentração isomolar, o embrião não irá intumescer, mas irá retrair progressivamente como um crioprotetor que deixa a célula.

Após a descongelação, a remoção do crioprotetor do interior da célula deve ser realizada de forma lenta, através da diluição desses, uma vez que a re-hidratação intracelular brusca leva à lise das membranas (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

Independentemente da técnica de congelação, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células e tecidos durante a congelação e a descongelação. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: intracelulares (como DMSO, metanol, etanol, glicerol, etilenoglicol - EG, 1,2-propanodiol, etc) e extracelulares (como lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona - PVP, rafinose, manitol, sorbitol, trealose, etc) (NIEMANN, 1991). Essas duas classes de crioprotetores são usadas separadamente ou associadas para diferentes tipos de protocolos de criopreservação (KIM *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 1998).

HANADA & NAGASE (1980) afirmam que as propriedades requeridas para um eficiente agente crioprotetor devem ser: baixo peso molecular, habilidade para atravessar a membrana das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e não ser tóxico. Segundo KASAI (2004), os crioprotetores intracelulares

são importantes constituintes da solução de congelação/vitrificação, sendo que sua presença no meio intracelular é essencial na prevenção da formação de cristais de gelo, o que impede a ocorrência de danos tóxicos e osmóticos.

Uma das funções dos crioprotetores é o de baixar o ponto de solidificação pois fornece um maior tempo para ocorrência da desidratação celular, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares. A concentração dos crioprotetores, normalmente utilizada, pode causar uma queda do ponto de solidificação em 2 a 3^oC. Contudo, o efeito de redução pode ser multiplicado várias vezes na solução hipertônica, que está entre os cristais de gelo e o fluído intracelular (SEIDEL et al., 1996).

Em geral, quando o embrião é exposto a um crioprotetor intracelular, como o glicerol, ele inicialmente se retrai devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular e também porque o embrião é muito mais permeável à saída da água do que à entrada do crioprotetor. A retração do embrião irá continuar até que o afluxo de água seja balanceado com o influxo de crioprotetor. O índice de entrada do crioprotetor irá depender do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. Ao mesmo tempo, a água entra novamente na célula e causa um aumento gradual de volume. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico (SCHNEIDER & MAZUR, 1984).

Segundo LEIBO (1984), a relação superfície/volume do embrião, características intrínsecas do crioprotetor e temperatura em que o embrião é exposto.

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após o reaquecimento, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1986) e os agentes crioprotetores podem ter uma ação direta na produção de crioinjúrias, como, por exemplo, alteração na polaridade do meio extracelular que pode lesar as membranas (ARNOLD et al., 1983).

Os crioprotetores são usualmente diluídos em solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline - PBS) acrescida de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou 10% de soro fetal bovino (SFB). No entanto, para a criopreservação de embriões tem sido relatada também a diluição em meios como Tissue Culture Medium (TCM-199) (HAMANO et al., 1992; OTOI et al., 1993; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; PAPIS et al., 1999), TCM-199/Hepes (VAJTA et al., 1998a), acrescidos de diferentes concentrações de SFB e antibióticos (OTOI et al., 1995; OTOI et al., 1998). VAJTA et al. (1998a) e PAPIS et al. (1999) relatam o uso do meio TCM-199 acrescido de 20% de SFB para diluição de diferentes crioprotetores.

O etilenoglicol tem sido utilizado em diversos protocolos devido baixo peso molecular, sendo um crioprotetor efetivo para embriões bovinos, pela sua menor toxicidade associada a uma rápida permeabilidade (FAHY *et al.*, 1987; KASAI et al., 1990), quando comparado com o glicerol e propilenoglicol (VOELKEL & HU, 1992). Na década passada o etilenoglicol (SOMMERFELD & NIEMANN, 1999; KULESHOVA *et al.*, 1999) passou a ser utilizado comercialmente por permitir a transferência direta de embriões bovinos o que proporciona rápida entrada e saída na célula durante o período de equilíbrio e rehidratação após o aquecimento (VOELKEL & HU, 1992).

A sacarose, embora isoladamente não seja um bom crioprotetor é amplamente utilizada em associação com outros agentes. Seu efeito crioprotetor ocorre durante a fase de rehidratação quando as células são submetidas a diluições sucessivas de sacarose, que modula a entrada de água para o meio intracelular (FRIEDLER et al., 1988). Devido a este fato, a adição de açúcares como a sacarose, dextrose e trealose aumentam a sobrevivência *in vitro* de blastocistos após a vitrificação (SAITO et al., 1994).

A criopreservação de embriões pelas técnicas de congelação convencionais normalmente utiliza um único crioprotetor, enquanto que a vitrificação envolve o uso de associações como glicerol e etilenoglicol, glicerol e propanodiol ou propanodiol e etilenoglicol em combinação com sacarose, trealose ou galactose (DOBRINSKY, 2002).

Os crioprotetores e a criopreservação podem provocar ruptura no citoesqueleto do embrião. Uma alternativa seria provocar a despolimerização reversível dos

filamentos de actina antes da criopreservação, quando o período de incubação for curto. As citocalasinas têm sido empregadas como estabilizadores de microfilamentos para prevenir danos e estabilizar a membrana plasmática. A repolimerização dos microfilamentos ocorre naturalmente após a rehidratação (DOBRINSKY, 2002). O tratamento das células com essas substâncias faz com que a membrana plasmática se torne mais elástica e que os microfilamentos não se rompam devido à micromanipulação (Mc GRATH & SOLTER, 1983).

Embriões bovinos PIV e criopreservados são mais sensíveis à congelação e resultam em taxas de concepção significativamente menores após a transferência, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* e criopreservados (DOBRINSKY, 2002).

Nos últimos anos, várias tentativas tem sido realizadas para aumentar as taxas de sobrevivência desses embriões pós-criopreservação. Duas linhas de pesquisa têm sido seguidas: a) modificações nos sistemas de produção *in vitro*, aperfeiçoando as condições de cultivo embrionário, o que possibilitará uma maior resistência ao processo de criopreservação; b) desenvolvimento de uma técnica de criopreservação adequada para embriões produzidos *in vitro* (MARTÍNEZ et al., 2002).

KHURANA & NIEMANN (2000) relatam gestações e nascimentos de bezerros provenientes de transferência de embriões produzidos *in vitro* congelados e reaquecidos. Porém, as taxas de gestação são inconsistentes e invariavelmente menores do que aquelas reportadas para embriões produzidos *in vivo*. Isto pode estar relacionado com algumas diferenças na morfologia, ultra-estrutura e metabolismo entre os embriões provenientes das duas técnicas.

SIQUEIRA-PYLES et al. (2002) produziram embriões *in vitro* em diferentes meios de cultivo e FERNANDES et al. (2002) vitrificaram e avaliaram a sua viabilidade podendo observar que o meio composto por aminoácidos e BSA desde o início, associado a SFB no terceiro dia de cultivo produz altas taxas de produção de blastocisto, porém não resulta em diferença estatística nas taxas de viabilidade. Portanto o meio de cultivo pode aumentar a quantidade de blastocistos produzidos não acompanhado da melhora da qualidade embrionária.

A vitrificação foi idealizada por LUYET em 1937. Depois de quase 50 anos, RALL e FAHY descreveram a vitrificação como uma alternativa ao processo de congelação lenta (RALL & FAHY, 1985). Ao contrário da congelação lenta, a vitrificação envolve a exposição do material biológico a altas concentrações de agente crioprotetor (geralmente entre 4 e 6 mol/L) por um curto período de tempo (25 segundos a 5 minutos), geralmente à temperatura ambiente, seguido de um resfriamento ultra-rápido em nitrogênio líquido, não sendo necessária a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo (SANTOS, et al., 2007). De acordo com STACHECKI & COHEN (2004), a vitrificação possui dois aspectos básicos a serem levados em consideração. O primeiro consiste no fato de que as altas concentrações de agentes crioprotetores utilizadas na exposição aumentam os efeitos tóxicos e, em segundo lugar, apesar desse efeito durante o período de equilíbrio, a vitrificação, por ser uma congelação altamente rápida, aumenta as taxas de sobrevivência.

BERNARDI *et al.* (1991) utilizaram o glicerol associado à sacarose em protocolo com embriões de camundongas PIV. Então desenvolveram um protocolo de congelação ultra-rápida para embriões bovinos, que resultou no nascimento do primeiro produto deste método no Brasil. MEZZALIRA *et al.* (1996) obtiveram 19,2% (5/26) de prenhez com a transferência de embriões bovinos produzidos *in vivo* congelados pelo método ultra-rápido com 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose em meio DPBSm (Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline Modified). Já Almeida (2001) alcançou 14% (1/7) e 40% (2/5) de gestações criopreservando embriões bovinos, pelo método ultra-rápido com 2,0 M de EG e 0,3 M trealose, 3,0 M de etilenoglicol e 0,3 M trealose e pelo método rápido (convencional) com 1,5 M de etilenoglicol em DPBSm, respectivamente.

O método OPS tem sido aplicado para criopreservação de embriões bovinos (PIV), em diferentes estágios de desenvolvimento (VAJTA, 1997; VAJTA et al., 1997a e b; VAJTA et al., 1998a). Os resultados nas taxas de reexpansão de embriões vitrificados no dia 6 (blastocistos iniciais e blastocistos) e no dia 7 (blastocistos eclodidos) foram 90, 97 e 81%, respectivamente (VAJTA et al., 1998b). Esses resultados podem ser considerados um avanço significativo na criopreservação de embriões bovinos. Porém até o momento, a curva lenta de congelação e os métodos de

vitrificação não se mostraram adequados para obtenção de padrões desejáveis de sobrevivência de embriões bovinos em estágio de pré-compactação produzidos tanto *in vivo* como *in vitro* (LEIBO et al., 1996).

A vitrificação é uma técnica promissora na reprodução assistida, sendo um procedimento simples, menos oneroso e que requer menos tempo do que os métodos de congelação lenta (DOBRINSKY, 2002; KULESHOVA & LOPATA, 2002).

Diferentes protocolos de vitrificação têm sido usados para criopreservação de embriões, *in vivo* e *in vitro*, produzidos nos últimos 15 anos. Eles diferem em muitos aspectos, incluindo o tipo e a concentração do número de etapas de equilíbrio do crioprotetor, tipo de criopreservação, dispositivo utilizado, tempo de exposição e o número de etapas de diluição no aquecimento, acredita que cada um desses fatores pode afetar os resultados (VAJTA et al., 1998, MASSIP et al., 1987, DATTENA et al., 2000).

MARTINEZ et al. (2002) afirmam que a vitrificação pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de embriões bovinos PIV e que essa técnica pode ser considerada inclusive para utilização em programas comerciais. A vitrificação pode ser definida segundo FAHY (1986) e SUCCU et al. (2007) como sendo a solidificação de um líquido, não pela cristalização, mas pela extrema elevação da viscosidade durante o processo de resfriamento. DOBRINSKY (2002) e KULESHOVA & LOPATA (2002) afirmam que este processo provoca solidificação das células evitando completamente a formação de cristais de gelo intra e extracelulares tanto durante o resfriamento como no aquecimento.

A vitrificação é um protocolo de criopreservação baseado na desidratação do embrião através da sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores seguida da imersão direta em nitrogênio líquido, o que permite a solidificação se que ocorra cristalização (MARTINO et al., 1996b).

Comparando as duas técnicas, a congelação tradicional é uma tentativa de manutenção do equilíbrio entre danos osmóticos e tóxicos utilizando baixas concentrações de crioprotetores e controlando a formação de gelo através da

congelamento do meio extracelular e desidratação do embrião. Em contraste, a estratégia de vitrificação é mais radical, pois é baseada na eliminação total da formação de gelo. Porém, as altas concentrações de crioprotetores aumentam os danos osmóticos e tóxicos. Por outro lado, a alta velocidade de resfriamento e aquecimento resulta em uma rápida passagem através da temperatura crítica ao redor de 0°C, o que minimiza os danos causados pelo resfriamento (VAJTA, 1997).

As soluções de vitrificação, assim como as soluções usadas para a congelamento, contêm um crioprotetor, vários sais e usualmente uma ou mais macromoléculas. A adição de polietilenoglicol aumenta a viscosidade da solução de vitrificação contendo etilenoglicol. Outras macromoléculas comumente usadas incluem o Ficoll, a PVP e o dextran. Para protocolos de vitrificação, o etilenoglicol em associação com outros crioprotetores não permeáveis tem se tornado a solução mais comumente utilizada (HOCHI et al., 1996; MARTINO et al., 1996a e b).

Utilizando uma associação de 20% de 1,2 propanodiol e 25% de glicerol, MASSIP et al. (1987) vitrificaram mórulas e blastocistos de bovinos em fase bastante precoce. O resultado de gestação obtido foi de 39,1%.

MAHMOUDZADEH et al. (1993) comunicaram o método de adição de soluções de vitrificação em única etapa em mórulas e blastocistos iniciais, observando que a melhor solução de vitrificação era composta de etilenoglicol a 7,15M e sacarose a 0,3M, enquanto que ISHIMORI et al. (1993) relataram o uso da associação das soluções de DMSO e etilenoglicol para a vitrificação de embriões bovinos. A taxa de gestação de mórulas e blastocistos iniciais foi de 38% e 40%, respectivamente.

III. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes protocolos de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Objetivos específicos

- Avaliar e comparar diferentes metodologias de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, por meio das taxas de reexpansão e eclosão embrionária pós-descongelação;
- Selecionar o melhor protocolo *in vitro* de criopreservação para transferência de embriões.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1: Congelação de embriões bovinos produzidos in vitro a partir de complexos cumulus-oócito provenientes de ovários de abatedouro.

1.1. Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro

Os ovários de vacas abatidas na região de Araçatuba-SP foram retirados das carcaças, aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados em garrafas térmicas para o laboratório da UNESP – Campus de Araçatuba, não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente, por meio de agulha de calibre 18-G, adaptada a seringa de 20 ml, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 ml e decantado por 15 minutos para seleção dos oócitos. O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 100 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os complexos *cumulus*-oócito (COC) com *cumulus* compacto com pelo menos 4 camadas de células e citoplasma de granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação.

1.2. Maturação *in vitro*

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 1 µg/mL de 17-β estradiol, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL e 0,6% de BSA). Posteriormente os COCs foram transferidos para placa de cultivo de maturação, contendo gotas de 100 µL de meio de maturação, recobertas com óleo mineral (20 COCs/gota) por 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

1.3. Fecundação *in vitro*

Foi utilizado sêmen de um único touro de fertilidade *in vitro* comprovada por meio de avaliações prévias, tendo como pré-requisitos mínimos: motilidade pós-descongelação de 60% e vigor igual ou superior a 3 em meio TALP-FIV e taxa de clivagem igual ou superior a 70%.

Uma palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 37°C por 30 segundos e os espermatozoides viáveis foram separados por centrifugação em gradiente de densidade descontínuo de Percoll 90 e 45% durante 5 minutos a 9000xg a temperatura ambiente. Posteriormente o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em meio TL-sêmen. O sêmen foi então submetido à nova centrifugação por 3 minutos.

O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos por mL de meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 10 µg/ml de heparina e 4 µL/ml da solução de PHE (1 mM hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina), segundo BAVISTER (1989). Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV. Os COCs foram lavados duas vezes em meio H-199, suplementado com 0,5% de BSA livre de ácidos graxos, e uma vez em meio TALP-FIV. Foram adicionados 20 COCs por gota de FIV, incubados a 38,5°C, por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

1.4. Cultivo de desenvolvimento

Após fecundação, os zigotos foram lavados por três vezes (sem a remoção total das células do *cumulus*) e co-cultivados em gotas de 100 µL de meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,5°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar, por 8 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados 40, 144, 168 e 192 horas após o início da fecundação.

1.5. Criopreservação dos embriões

Mórulas e blastocistos obtidos no dia 7 de cultivo (D0 = dia da FIV) foram selecionados para congelação. Os embriões foram aleatoriamente divididos em 4 grupos, de acordo com o protocolo de congelação utilizado:

- 1) Grupo G: Glicerol 1,0 M em PBS;
- 2) Grupo E: Etilenoglicol 1,5 M em PBS;
- 3) Grupo GS: Glicerol 1,0 M com sacarose 0,3 M em PBS;
- 4) Grupo ES: Etilenoglicol 1,5 M com sacarose 0,3 M em PBS.

O tempo limite de permanência nas diferentes soluções foi de 10 minutos. Todo o processo foi realizado na capela de fluxo laminar, sob estereomicroscópio. Os meios e soluções foram feitos no dia do uso.

Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25 ml previamente identificadas com a data da congelação, número de embriões por palheta e número da palheta em questão. Após a passagem pelas soluções, foi realizado o envasamento dos embriões, de acordo com o esquema: meio, ar, meio contendo os embriões, ar e meio. As palhetas foram lacradas e posteriormente colocadas na máquina de congelação.

A curva de resfriamento teve início na temperatura de +6°C e foi reduzida até valores compreendidos entre -6°C e -7°C, numa velocidade de 1°C/minuto. A cristalização do meio de congelação no espaço extracelular foi induzida (“seeding”) na temperatura de -6°C e -7°C. Após a permanência de 5 minutos nessa temperatura, os embriões foram congelados a -33°C e -35°C numa velocidade de decréscimo de temperatura entre 0,3 a 0,5°C/minuto. Os embriões foram mantidos nessa temperatura durante 5 a 10 minutos e, posteriormente, foram imersos em nitrogênio.

1.6. Descongelamento e cultivo dos embriões

No processo de descongelamento, as palhetas foram retiradas do botijão de nitrogênio líquido e expostas à temperatura ambiente por 10 segundos. Em seguida foram imersas em água aquecida a 22°C por 1 minuto com a bucha da palheta em posição vertical, fora da água.

Após, os embriões que utilizaram como crioprotetor o glicerol ficaram imersos por 5 minutos nas seguintes soluções: 1) PBS acrescido de 0,6 M sacarose e 5% de glicerol; 2) PBS acrescido de 0,6 M sacarose e 2,5% de glicerol; 3) PBS acrescido de 0,6 M de sacarose. Em seguida, foram transferidos para o meio de manutenção (PBS + 20% SFB) a uma temperatura de 37°C por 5 minutos.

Os embriões que utilizaram como crioprotetor o etilenoglicol foram banhados por três vezes em solução contendo PBS acrescido de 20% de SFB, a uma temperatura de 37°C.

Os embriões foram então cultivados em meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,5°C em atmosfera de 5% CO₂ em ar, durante 24-48 horas.

EXPERIMENTO 2. Vitrificação de embriões bovinos produzidos in vitro a partir de oócitos obtidos por punção folicular guiada por ultra-som em doadoras das espécies Brahman, Nelore e mestiças Brahman x Angus.

2.1. Local e animais

O trabalho foi desenvolvido em uma única propriedade, localizada no Sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul, no município de Ponta Porã. Foram utilizadas vacas e novilhas em idade reprodutiva, pertencentes às raças Brahman, Nelore e mestiças Brahman x Angus, que passaram a ser denominadas de Brangus. A idade média das novilhas era de 24 meses e, das vacas, 48 meses. Todos os animais tiveram escore corporal entre 3,5 a 4,0, em uma escala de 0 a 5,0 pontos. O experimento foi realizado durante os meses de primavera e verão.

2.2. Aspiração folicular guiada por ultra-som

As aspirações foliculares guiadas por ultra-som (ALOKA SSD500) foram realizadas por um único veterinário. A cada procedimento de aspiração, os animais eram submetidos a um bloqueio anestésico com 5 a 8 mL de xilocaína a 2% sem vaso constritor, aplicado entre a primeira e segunda vértebra coccígea. Em seguida, foi realizado o esvaziamento da ampola retal, lavagem da região do períneo e vulva com água corrente, secagem com papel toalha e antisepsia da parte externa da vulva com álcool 70%. O transdutor acoplado a guia de aspiração foi introduzido na vagina do animal e cada ovário aproximado ao raio de visibilidade ultrassonográfica para avaliação da população folicular e punção. Para isso, utilizou-se uma agulha hipodérmica de calibre 20G (BD), conectada a um tubo flexível de PVC (1,0 mm de diâmetro interno e 1,8 mm de diâmetro externo), como via de recuperação do líquido folicular e COCs aspirados. O conteúdo folicular aspirado era depositado em um tubo Falcon de 50mL, devidamente identificado. Como veículo para lavagem do sistema, cujo objetivo era impedir a coagulação do sangue aspirado junto com o líquido folicular, foi utilizada uma solução de PBS suplementado com 5 UI/mL de heparina. A pressão negativa produzida pela bomba de vácuo variou entre 60 a 80mmHg.

2.3. Recuperação, seleção e classificação dos oócitos

O conteúdo de cada tubo foi depositado em um filtro coletor (modelo Encon) de porosidade de 40 a 50 μm . Cada filtro foi lavado várias vezes com PBS até que o material retido na membrana de PVC estivesse bem claro. Em seguida, todo o sedimento retido foi transferido para uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro. A seleção e classificação dos COCs de cada animal foi realizada com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Os COCs foram transferidos para uma placa de poliestireno de 35mm contendo meio TCM199, suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 20 mM de HEPES, 10% de SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 $\mu\text{g/mL}$ de amicacina, sendo selecionados aqueles de grau I, II e III.

Os COCs foram classificados segundo Loos et al. (1991), quanto ao revestimento de células do *cumulus* e quanto ao aspecto do ooplasma, como abaixo especificado:

- a) Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;
- b) Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
- c) Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;
- d) Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus*-oócito escuro e irregular;
- e) Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

2.4. Transporte dos Oócitos

Os COCs selecionados para maturação foram depositados em criotubos (Corning) para o transporte até o laboratório, contendo 400 μL de meio de maturação recoberto com 150 μL de óleo silicone (Dow Corning 360 fluido grau médico 350 CST). O meio foi previamente equilibrado em atmosfera gasosa de 10% de CO_2 e temperatura

de 38,5°C. Em seguida, a atmosfera gasosa do tubo foi equilibrada com uma mistura gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂.

Os criotubos vedados foram colocados em um transportador de oócitos e embriões (MINITUB), e levados ao Laboratório da TECGENE, localizado no município de São José do Rio Preto, SP.

2.5. Maturação *in vitro*

O meio utilizado para o transporte e a MIV dos oócitos MIV foi o TCM199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio, 10% SFB (Crypion®), 1,0 µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50UI/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0 µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2 mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4 µg/mL de amicacina (Biochimico). A maturação foi completada para 24 horas em microgotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5°C e umidade relativa de 95%.

2.6. Fecundação *in vitro*

Para a fecundação, os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL Sêmen e uma vez em FIV gotas para remoção do SFB e parte das células do *cumulus*. Após realização do procedimento de lavagem dos oócitos de cada vaca individualmente, estes foram transferidos para gotas de 100 µL de meio FIV sob óleo mineral. O sêmen foi descongelado em água a 35-37°C por aproximadamente 20 segundos. O sêmen foi depositado em um tubo Falcon de 15 mL contendo um gradiente descontínuo de 45% 90% de Percoll. O sêmen foi submetido a uma força centrífuga de 780xg por 30 minutos e, após, o sedimento foi removido e transferido para um microtubo de 500 µL. Amostras de 5 µL de sêmen foram tomadas e diluídas em 95 µL de meio FIV gotas ou água para avaliação da motilidade e concentração, respectivamente. O volume do sedimento foi então ajustado para uma concentração final de 25x10⁶ espermatozoides vivos/µL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos, foram adicionados 4 µL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, sêmen e oócitos foram co-incubados por 18

a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

2.7. Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

O prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio TL Sêmen, onde tiveram parte das células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados em uma vez em meio de cultivo de desenvolvimento em SOFaa e transferidos para microgotas de 100 µL de meio SOFaa. Quarenta e oito horas depois foi avaliada a taxa de clivagem e acrescentado 50 µL de meio SOFaa fresco. Depois de mais 48 horas, foram removidos 50 µL do meio de cada gota e mais 50 µL de meio fresco foram acrescentados. Durante este procedimento foi feita uma avaliação quanto ao desenvolvimento e qualidade dos embriões, para se ter uma previsão do total de embriões disponíveis para a transferência no dia seguinte. Em alguns dos procedimentos, o número previsto de embriões previsto era maior que o número de receptoras disponíveis. Nestes casos os embriões excedentes foram vitrificados.

2.8. Envase e transporte dos embriões

No sétimo dia de desenvolvimento, os embriões foram individualmente envasados em palhetas de 0,25 mL, em meio SOFaa Hepes. Cada palheta foi cuidadosamente identificada quanto a doadora do embrião, a qualidade e a ordem do embrião produzido. As palhetas contendo os embriões de uma mesma doadora foram agrupadas em ordem numérica e embrulhadas em papel alumínio e identificados com uma etiqueta constando número da doadora e total de embriões envasados para a transferência. Os embriões de uma mesma propriedade ou destino de transferência foram colocados em uma embalagem de PVC transparente vedada nas extremidades. Até a saída dos embriões do laboratório, as palhetas foram mantidas em mesa aquecedora a 37°C. O transporte foi feito em caixa térmica de 5 L contendo uma bolsa de água aquecida no fundo. As palhetas contendo os embriões foram colocadas em

uma embalagem de PVC, colocada por cima da água aquecida e retiradas da caixa apenas no momento da transferência para as receptoras.

2.9. Vitrificação dos embriões excedentes

Os embriões excedentes foram destinados à criopreservação pelo método de vitrificação. Os embriões foram selecionados pela qualidade, sendo vitrificados somente embriões de qualidade um (blastocistos com boa massa celular interna, sem aparência de células extrusas). Estes foram lavados três vezes em meio de lavagem (SOFaa suplementado com 20% de SFB) e depois foram equilibrados por 3 a 5 minutos em meio de equilíbrio (meio de lavagem suplementado com 7,5% de etilenoglicol e 7,5% de DMSO). Foram então transferidos para uma gota de meio de vitrificação (meio de lavagem suplementado com 15% de Etilenoglicol e 15% de DMSO), posteriormente foram transferidos com uma gota de no máximo 5 μL e daí transferidos para uma gota de 1 μL para o anel da haste de vitrificação da marca Vitringa[®]. O tempo de permanência dos embriões no meio de vitrificação não deve ultrapassar 45 segundos. Os embriões foram imediatamente mergulhados no nitrogênio líquido até o momento do reaquecimento.

2.10. Reaquecimento dos embriões

A palheta contendo cada haste de vitrificação foi retirada do nitrogênio líquido e a haste foi imediatamente removida. A extremidade do anel contendo os embriões foi mergulhada em uma gota de meio de reaquecimento 1 (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB e 1,0 M de sacarose) para descongelamento e remoção dos crioprotetores, onde permaneciam por 1 minuto. Depois foram transferidos para uma gota de meio de reaquecimento 2 (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB e 0,5 M de sacarose) onde permaneciam por 1 minuto. Em seguida foram transferidos para uma gota de meio de reaquecimento 3 (meio SOFaa suplementado com 20% de SFB) onde permaneceram por 1 minuto. Desta gota foram transferidos para as gotas de cultivo de recuperação onde permaneciam por 24 horas. O cultivo de recuperação foi conduzido em meio SOFaa, sob óleo mineral. As placas foram mantidas em incubadora

com atmosfera controlada de 5% de CO₂ em ar, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C. Depois deste período os embriões foram avaliados quanto à reexpansão embrionária e taxa de eclosão. Os embriões reexpandidos foram envasados para transporte e transferidos em receptoras previamente sincronizadas.

2.11. Sincronização das receptoras

Foram sincronizados 500 animais entre novilhas e vacas mestiças (primeiro, segundo e terceiro parto), de uma mesma propriedade. O ciclo estral foi sincronizado com aplicação intra-muscular (IM) de 2,0 mL de D-Cloprostenol (Veteglan®¹), após avaliação da existência de corpo lúteo funcional com ajuda de um aparelho de ultra-som (ALOKA SSD500). Os animais foram mantidos em regime de pasto, na estação da primavera, em piquetes de capim *Braquiaria decumbes*, recebendo água e sal mineral *ad libidum*. As 450 receptoras que manifestaram cio, com 24 a 96 horas após a injeção do D-cloprostenol, foram separadas aleatoriamente em 3 lotes de 150 animais para inovulação dos embriões.

2.12. Transferência dos embriões produzidos *in vitro*

As receptoras que manifestaram cio até 48 horas antes e 48 horas depois da data base para a transferência dos embriões foram avaliadas quanto à presença do corpo lúteo funcional em um dos dois ovários com ajuda de um aparelho de ultra-som (ALOKA SSD500) e o tônus uterino. Os animais considerados aptos foram submetidos ao bloqueio epidural entre a primeira e segunda vértebra coccígea com lidocaína a 2% (Dorfin®²), sem vaso constritor. As palhetas de 0,25 mL contendo os embriões foram montadas no inovulador e bainha para TE, sendo ainda revestidos por uma camisa sanitária. A vulva e região de períneo foram limpas com papel toalha.

Foram inovulados 100 embriões por lote de receptoras, sendo 32 embriões da raça Nelore (16 blastocistos iniciais e 16 blastocistos), 34 embriões da raça Brangus (17

¹ Laboratórios Calier do Brasil LTDA

² Laboratórios Calier do Brasil LTDA

blastocistos iniciais e 17 blastocistos) e 34 embriões da raça Brahman (17 blastocistos iniciais e 17 blastocistos). Após introdução do inovulador no primeiro anel cervical a camisa sanitária foi perfurada e, em seguida, foi feita a transposição dos anéis cervicais. Ao atingir o corpo uterino a ponta do inovulador foi direcionada para o corno ipsilateral ao corpo lúteo funcional e, depois de transposta a bifurcação uterina no sentido da curvatura maior, procedeu-se com a deposição do embrião.

2.13. Diagnóstico de gestação

Após 42 dias da inovulação dos embriões, foi realizado o diagnóstico da gestação, a partir de avaliação ultrassonográfica (ALOKA SSD500) e um transdutor linear de 5 MHz. Foi avaliada a presença de líquido e envoltórios embrionários e dos batimentos cardíacos do embrião para o diagnóstico positivo de gestação.

V. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Experimento 1

A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1998). Os dados foram avaliados em amostras repetidas utilizando análise de variância, com aplicação de teste de comparação de médias ($P>0,05$) em um delineamento inteiramente casualizado. As porcentagens do número de células embrionárias foram avaliadas utilizando teste de Qui-quadrado (χ^2).

Experimento 2

Na análise estatística foi utilizado o programa SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1998), aplicando-se análise de variância, visando comparar as diferentes raças entre os grupos e dentro de cada grupo com as classificações embrionárias e suas respectivas taxas de gestações, em amostras repetidas, tendo como fonte de variação as raças e a morfologia embrionária, em um delineamento em blocos ao acaso. As diferenças observadas na análise de variância foram testadas utilizando-se teste de comparação de médias ($P>0,05$). Para análise das taxas de produção de embriões foi utilizado o teste Qui-quadrado (χ^2).

VI. RESULTADOS

EXPERIMENTO I

Neste experimento, um total de 437 embriões (351 blastocistos e 86 mórulas) foram produzidos *in vitro* e criopreservados pelo processo de congelação lenta.

No procedimento de congelação rápida, os embriões classificados em grau 1 foram divididos em 4 grupos experimentais de acordo com o agente crioprotetor utilizado: 1) Glicerol (G); 2) Glicerol + Sacarose (GS); 3) Etilenoglicol (E); 4) Etilenoglicol + Sacarose (ES). No grupo G foram criopreservados 96 blastocistos e 22 mórulas; no grupo GS foram criopreservados 86 blastocistos e 21 mórulas; no grupo E foram criopreservados 76 blastocistos e 23 mórulas; e no grupo ES foram criopreservados 93 blastocistos e 20 mórulas.

Após a descongelação dos embriões do grupo G, obteve-se 12 mórulas, 68 blastocistos grau 1, 2 e 3, onde neste mesmo grupo houve embriões com a zona pelúcida rompida, sendo 7 mórulas e 11 blastocistos. Nas primeiras 24 horas de cultivo pós-descongelação, todas as mórulas e 34 blastocistos degeneraram, ocorrendo o desenvolvimento de 2 embriões na fase de blastocisto para blastocisto expandido. Após 48 horas, os embriões foram reavaliados quanto ao seu desenvolvimento e grau, obtendo-se assim 27 embriões na fase de blastocistos, onde 2 embriões obtiveram grau 2 e 25 embriões grau 3. Obteve-se ainda 12 embriões na fase de blastocistos expandidos, 2 blastocistos grau 2 e 8 blastocistos grau 3. O número de embriões congelados, descongelados e cultivados após a descongelação, para o grupo G, estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de embriões criopreservados com glicerol e cultivados após por 48 horas após descongelação.

	Número de embriões (n)	Porcentagem de embriões desenvolvidos em relação ao total de embriões descongelados (%)
Estruturas congeladas		
Mórulas	22	-
Blastocistos	96	-
<i>Total</i>	<i>118</i>	
Estruturas descongeladas		
Mórulas	12	-
Blastocistos	68	-
<i>Total</i>	<i>80</i>	
Desenvolvimento após 24h de CIV		
Mórulas	0	0
Blastocistos	34	42,5
Blastocistos expandidos	2	2,5
Desenvolvimento após 48h de CIV		
Blastocistos	27	33,8
Blastocistos expandidos	12	15

No grupo GS, após a descongelação obteve-se 21 mórulas, 86 blastocistos grau 1, 2 e 3, onde neste mesmo grupo houve 15 embriões na fase de blastocistos com a zona pelúcida rompida. Nas primeiras 24 horas pós descongelação, os embriões na fase de mórula e 28 embriões na fase de blastocistos foram degenerados, ocorrendo o desenvolvimento de 8 embriões na fase de blastocisto para blastocisto expandido. Após 48 horas, os embriões foram reavaliados quanto ao seu desenvolvimento e grau, obtendo assim 41 embriões na fase de blastocistos, onde 2 embriões obtiveram grau 1 e 14 embriões obtiveram grau 2 e o restante grau 3. Obteve-se ainda 9 embriões na fase de blastocistos expandidos, onde 1 embrião grau 1, 4 embriões grau 2 e 4 embriões grau 3. O número de embriões congelados, descongelados e cultivados após a descongelação, para o grupo GS, estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Número de embriões criopreservados com glicerol e sacarose e cultivados após por 48 horas após descongelação.

	Número de embriões (n)	Porcentagem de embriões desenvolvidos em relação ao total de embriões descongelados (%)
Estruturas congeladas		
Mórulas	21	-
Blastocistos	86	-
<i>Total</i>	<i>107</i>	
Estruturas descongeladas		
Mórulas	9	-
Blastocistos	78	-
<i>Total</i>	<i>87</i>	
Desenvolvimento após 24h de CIV		
Mórulas	0	0
Blastocistos	42	48,3
Blastocistos expandidos	8	9,2
Desenvolvimento após 48h de CIV		
Blastocistos	41	47,1
Blastocistos expandidos	9	10,3

No grupo E, após a descongelação obteve-se 14 mórulas grau 2 e 3 e 70 blastocistos grau 2 e 3, onde neste mesmo grupo houve 14 mórulas com a zona pelúcida rompida. Os embriões foram descongelados e recultivados, sendo reavaliados após 24 e 48 horas. Nas primeiras 24 horas de cultivo, 26 embriões na fase de blastocistos degeneraram, ocorrendo o desenvolvimento de 4 embriões na fase de blastocisto para blastocisto expandido. Após 48 horas, os embriões foram reavaliados quanto ao seu desenvolvimento e grau, obtendo assim 48 embriões na fase de blastocistos, onde 2 embriões obtiveram grau 1, 18 embriões grau 2 e o restante grau 3. Obteve-se ainda 9 embriões na fase de blastocistos expandidos, onde 2 embriões grau 2, 5 embriões grau 3. O número de embriões congelados, descongelados e cultivados após a descongelação, para o grupo E, estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de embriões criopreservados com etilenoglicol e cultivados após por 48 horas após descongelação.

	Número de embriões (n)	Porcentagem de embriões desenvolvidos em relação ao total de embriões descongelados (%)
Estruturas congeladas		
Mórulas	23	-
Blastocistos	76	-
<i>Total</i>	99	
Estruturas descongeladas		
Mórulas	14	-
Blastocistos	70	-
<i>Total</i>	84	
Desenvolvimento após 24h de CIV		
Mórulas	0	0
Blastocistos	40	47,6
Blastocistos expandidos	4	4,8
Desenvolvimento após 48h de CIV		
Blastocistos	48	57,1
Blastocistos expandidos	9	10,7

No grupo ES, obteve-se 13 mórulas grau 2 e 66 blastocistos grau 1, 2 e 3, onde neste mesmo grupo houve embriões com a zona pelúcida rompida, sendo 13 mórulas. Nas primeiras 24 horas de cultivo pós-descongelação, os embriões na fase de mórula e 25 embriões na fase de blastocistos degeneraram, ocorrendo o desenvolvimento de 4 embriões na fase de blastocisto para blastocisto expandido. Após 48 horas, os embriões foram reavaliados quanto ao seu desenvolvimento e grau, obtendo-se assim 35 embriões na fase de blastocistos, onde 2 embriões obtiveram grau 1, 14 embriões grau 2 e o restante grau 3. Obteve-se ainda 6 blastocistos expandidos, onde 1 blastocisto grau 2 e 5 blastocistos grau 3. O número de embriões congelados, descongelados e cultivados após a descongelação, para o grupo ES, estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Número de embriões criopreservados com etilenoglicol e sacarose e cultivados após por 48 horas após descongelação.

	Número de embriões (n)	Porcentagem de embriões desenvolvidos em relação ao total de embriões descongelados (%)
Estruturas congeladas		
Mórulas	20	-
Blastocistos	93	-
<i>Total</i>	<i>113</i>	
Estruturas descongeladas		
Mórulas	13	-
Blastocistos	66	-
<i>Total</i>	<i>79</i>	
Desenvolvimento após 24h de CIV		
Mórulas	0	0
Blastocistos	37	46,8
Blastocistos expandidos	4	5,1
Desenvolvimento após 48h de CIV		
Blastocistos	35	44,3
Blastocistos expandidos	6	7,6

Após 48 horas da descongelação, a percentagem de blastocistos de grau 1 (G1) foi maior no grupo ES ($P < 0,05$). Embriões dos grupos G e GS apresentaram pior qualidade (maior percentual de embriões G3 e menor número de células). No entanto, o número total de células de embriões do grupo GS foi semelhante aos grupos E e ES, indicando um efeito benéfico da associação de sacarose com glicerol. A eclosão de blastocistos do grupo G, avaliada as 72 horas de cultivo pós-descongelação, foi baixa, embora não diferiram estatisticamente dos demais grupos. Todas as mórulas utilizadas no experimento entraram em degeneração. A comparação entre os resultados de todos os grupos encontra-se resumida na Tabela 5.

Tabela 5. Desenvolvimento e qualidade de embriões cultivados *in vitro* após congelação com diferentes crioprotetores. Os resultados são expressos em % média \pm desvio padrão da média, correspondendo a três repetições.

Grupo	Blastocistos (n)	Blastocistos (48 horas)			Eclosão (72 horas)	Total células % (n)
		grau 1	grau 2	grau 3		
G	75	0.0 \pm 0.0 ^b	0.0 \pm 0.0 ^a	100.0 \pm 0.0 ^a	19.3 \pm 7.1 ^a	85.1 (7.1) ^b
GS	69	0.0 \pm 0.0 ^b	20.0 \pm 34.6 ^a	80.0 \pm 24.6 ^{ab}	44.7 \pm 22.6 ^a	95.1 (2.4) ^{ab}
E	60	4.8 \pm 11.7 ^{ab}	10.6 \pm 12.9 ^a	69.3 \pm 18.4 ^{ab}	42.2 \pm 17.3 ^a	108.8 (4.7) ^a
ES	59	20.1 \pm 8.2 ^a	46.7 \pm 22.2 ^a	48.6 \pm 17.2 ^b	46.9 \pm 20.0 ^a	95.9 (5.7) ^{ab}

G: Glicerol; GS: Glicerol com sacarose; E: Etilenoglicol; ES: Etilenoglicol com sacarose. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças entre os tratamentos (P<0,05).

EXPERIMENTO 2

Foram vitrificados 300 embriões nos estágios de Bi e Bl que não foram transferidos a fresco e apresentavam boa qualidade morfológica. Cento e cinquenta Bi e 150 Bl foram transferidos aleatoriamente para os 3 grupos de receptoras, grupo I, II e III após a desvitrificação.

Nos grupos I, II e III de receptoras foram inovulados 16, 17 e 17 embriões blastocistos iniciais e 16, 17 e 17 embriões blastocistos das raças Nelore, Brangus e Brahman, respectivamente, e em relação aos grupos (Tabela 6 e 7). Após 42 dias foi realizado o diagnóstico de gestação por exame ultrassonográfico, onde a taxa de concepção entre os grupos não tiveram diferenças estatísticas, sendo que no grupo I obteve 6 gestações (18,75%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 9 gestações (26,47%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e 12 gestações (35,3%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman. No grupo II, foi observado 3 gestações (9,38%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 7 gestações (20,6%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e

9 gestações (26,5%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman. No grupo III, foi observado 8 gestações (25,0%) de receptoras que receberam embriões da raça Nelore, 10 gestações (29,41%) de receptoras que receberam embriões da raça Brangus e 10 gestações (29,41%) de receptoras que receberam embriões da raça Brahman.

Tabela 6. Taxa de gestação de vacas após a inovulação de embriões vitrificados em receptoras

Grupo	Raça	Embriões inovulados(n)	Gestações n (%)
G1	Nelore	32	6 (18,8) ^a
G1	Brangus	34	9 (26,5) ^a
G1	Brahman	34	12 (35,3) ^a
G2	Nelore	32	3 (9,4) ^a
G2	Brangus	34	7 (20,6) ^a
G2	Brahman	34	9 (26,5) ^a
G3	Nelore	32	8 (25,0) ^a
G3	Brangus	34	10 (29,4) ^a
G3	Brahman	34	10 (29,4) ^a

G1: Grupo 1 G2: Grupo 2 G3: Grupo 3

Letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente (P>0,05).

Tabela 7. Taxa de gestação entre raças após a inovulação de embriões vitrificados em receptoras

Raça	Embriões Inovulados (n)	Gestações (%)
Nelore	96	17 (16,3%) ^b
Brangus	102	26 (26,52%) ^a
Brahman	102	31 (31,62%) ^a

Letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente (P>0,05).

VII. DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1

Após 48 horas, a descongelação dos embriões pelo método de criopreservação lenta, a percentagem de embriões grau 1 (G1) blastocistos foi maior no grupo etilenoglicol e sacarose ($P < 0,05$). Embriões criopreservados com glicerol ou glicerol e sacarose apresentaram a pior qualidade (maior percentual de embriões G3 e menor número de células), no entanto, o número total de células de embriões glicerol e sacarose foi semelhante à etilenoglicol e embriões etilenoglicol e sacarose, indicando um efeito benéfico da associação da sacarose com glicerol. A eclosão de blastocistos G 72 horas foi baixa, embora não diferiram estatisticamente dos demais grupos ($P > 0,05$, CV = 46,5). Todas as mórulas utilizadas no experimento entraram em degeneração, onde segundo TROUNSON *et al.* (1976) constataram que blastocistos bovinos são menos sensíveis do que mórulas, ao resfriamento até 0°C, por 24 horas, concordando com SERAPIÃO *et al.* (2005) que argumentam que quanto menor o estágio de desenvolvimento do embrião, menor a taxa de sobrevivência após a descongelação. Sendo assim, os blastocistos iniciais são mais sensíveis do que os de estágio mais avançados. De fato, embriões bovinos contem uma grande quantidade de gotas lipídicas nos estágios mais precoces de desenvolvimento e medida que os embriões se desenvolvem e alcançam o estágio de blastocisto, o teor de lipídios diminui, conferindo menor sensibilidade a criopreservação para os estágios mais avançados (MOHR & TROUNSON, 1981). Quando comparou o índice de sobrevivência e desenvolvimento, nos diferentes estágios embrionários pós-descongelação, CHUPIN (1986) obteve 17,3% (n=75) de viabilidade para blastocistos iniciais e 56,4% (n=78) para blastocistos expandidos, utilizando o 2,8M de glicerol + 0,25M de sacarose em PBS, onde estes resultados corroboram com os resultados do experimento. Logo, o etilenoglicol tem a vantagem de ser menos tóxico do que outros crioprotetores, devido ao seu baixo peso molecular, sendo demonstrado que a criopreservação de embriões de produção *in vitro*

com etilenoglicol e sacarose ou etilenoglicol tende a produzir embriões de melhor qualidade após a descongelação.

HASLER et al. (1997) argumentam que quanto menor o estágio de desenvolvimento do embrião, menor a taxa de sobrevivência após a descongelação. Sendo assim, os blastocistos iniciais são mais sensíveis do que os de estágio mais avançado. A zona pelúcida funciona como uma proteção para o embrião a qual qualquer dano que venha a sofrer. Partindo deste princípio, os blastocistos eclodidos se tornam muito mais vulneráveis aos processos de criopreservação. RODRIGUES et al. (2000) demonstraram que embriões PIV oriundos do 7º e 8º dias pós-fecundação, apresentaram uma taxa de sobrevivência pós descongelamento maior comparada à dos dias 6, 9 e 10, utilizando etilenoglicol 1,8M, e sugeriram que o aumento da sensibilidade destes embriões a crioinjúrias pode estar relacionado com a morfologia, metabolismo e fisiologia celular.

NICACIO, (2008) utilizando etilenoglicol e glicerol como crioprotetores obteve resultados variáveis, sendo que a congelação lenta apresentou índices de re-expansão de 58,58%, quando os embriões foram cultivados no meio TCM 199, enquanto o método rápido apresentou 1,61% e a vitrificação 13,65%. Já no seu grupo controle o método lento apresentou índices de eclosão de blastocistos de 44,65%, quando os embriões foram cultivados no meio TCM 199. O método rápido e a vitrificação apresentaram índices de eclosão de 0% e 9,43%, respectivamente.

DONNAY, et al. (1998) vitrificaram blastocistos em solução de 25% de etilenoglicol e 25% de glicerol, obtendo 53% de eclosão após 72 horas de co-cultivo no meio TCM 199.

Os resultados do presente trabalho não corroboram com a literatura, pois houve diferença entre os índices de re-expansão, conforme o protocolo, sendo que a congelação lenta apresentou resultados mais satisfatórios em relação à vitrificação. Então, o etilenoglicol tem a vantagem de ser menos tóxico do que outros crioprotetores, devido ao seu baixo peso molecular, sendo demonstrado que a criopreservação de embriões de produção *in vitro* com etilenoglicol e sacarose ou etilenoglicol tende a produzir embriões de melhor qualidade após o descongelamento.

EXPERIMENTO 2

Segundo SANTIN et al. (2009), os principais fatores limitantes da vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade química do crioprotetor, os quais causam danos às células embrionárias; porém o equilíbrio é buscado por meio de rápidas taxas de resfriamento, que reduzam a toxicidade dos crioprotetores e diminuam o tempo de exposição da célula às temperaturas críticas.

Para os embriões da raça Nelore, o grupo 2 apresentou a menor taxa de concepção (9,38%). Quando comparada ao grupo 1, foi 9,37% maior. Porém o grupo 3, com o maior valor (25%), apresentou uma taxa 15,6% mais elevada. Para os embriões da raça Brangus, o grupo 2 apresentou a menor taxa de concepção (20,6%). Quando comparada ao grupo 1 foi 5,87% mais elevada. Porém o grupo 3 com o maior valor (29,41%), apresentou uma taxa 8,81% mais elevada. Para os embriões da raça Brahman, o grupo 2 apresentou a menor taxa de concepção (26,5%). Quando comparada ao grupo 3, foi 2,91% maior. Porém o grupo 1 com o maior valor (35,3%), apresentou uma taxa 8,8% mais elevada. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Quando as taxas gestacionais são comparadas entre raças, o Nelore apresentou uma menor taxa de gestação, 16,3%, comparada entre as raças Brahman (31,62%) e Brangus (26,52%)

DATTENA et al. (2004) realizando estudos em vitrificações de embriões ovinos PIV com crioprotetores glicerol, etilenoglicol e DMSO chegaram a resultados que demonstraram que diferentes protocolos de vitrificação testados não tiveram diferenças significativas sobre o número de gestações ou taxas de nascimento de um PIV.

DONNAY et al. (1998), realizando estudos de diferentes concentrações de diluentes crioprotetores utilizados na vitrificação de embriões bovinos, observou que os resultados foram melhores quando o crioprotetor foi diluído em 0,85 M de galactose, da mesma forma MAHMOUDZADEH et al., 1995, usando várias concentrações de sacarose como diluente, 0 a 0,5M, não observaram uma diferença significativa nas taxas de sobrevivência embrionária após a descongelação.

MAHMOUDZADEH et al., 1993, realizou experimentos para estudar a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* utilizando diferentes soluções para criopreservação. Mórulas e blastocistos nas soluções de DMSO (2,6M), acetamina (2,6M), propileno glicol (1,3M) e polietilenoglicol (7,5M), onde apenas um embrião na fase de blastocisto expandiu após uma exposição de 30 segundos nas soluções.

Como as condições experimentais e os protocolos de criopreservação de embriões variam muito entre os trabalhos, é difícil comparar os índices de prenhez (VANWAGTENDONK-DELEEUW, et al., 1995). Segundo SCHIEWE et al. (1991), o processo de vitrificação merece mais atenção no molar adequado da solução crioprotetora a ser utilizado durante a criopreservação dos embriões.

. De acordo com NICACIO 2008, considera-se a viabilidade *in vitro* um método importante para analisar os embriões. Em virtude dos resultados do presente trabalho, a influência do meio de cultivo após a descongelação deve ser considerada, pois um mesmo protocolo de criopreservação, realizado sobre as mesmas condições experimentais, apresentou índices de gestações inferiores ao apresentado neste trabalho. Para tornar esta análise mais precisa, acredita-se que mais trabalhos possam ser executados. Uma das maneiras de analisar a influência do meio de cultivo é avaliar a expressão gênica dos embriões nos diferentes meios, não apenas antes, mas também após a criopreservação. A criopreservação de embriões produzidos *in vitro* é o objetivo final, porém ainda existem muitos fatores a serem estudados até que seja encontrado um protocolo adequado.

MAKAREVICH et al. (2010), trabalharam no procedimento de descongelação de embriões bovinos vitrificados na fase de blastocisto, onde após o descongelamento dos embriões foram cultivados por 48 horas isoladamente, sem IGF-I ou na presença de IGF-I. Embriões não cultivados serviram como controle. Após 48 horas de cultivo dos embriões na presença de IGF-I, observou-se aumento no desenvolvimento embrionário de 41% dos embriões em comparação ao grupo controle, indicando que o IGF-I durante a cultura pós-descongelamento pode melhorar a qualidade dos embriões bovinos vitrificados, proporcionando maior taxa de gestação.

Grande desafio para os pesquisadores é o de melhorar e estabilizar as taxas de gestações de processos de vitrificação, que pode ser bem sucedida para criopreservação de óocitos e embriões de diferentes espécies e de diferentes estágios de desenvolvimento (VAJTA et al., 2000).

VII. CONCLUSÕES

EXPERIMENTO 1

- Todas as mórulas criopreservadas sofreram regeneração no desenvolvimento após 24 horas de cultivo *in vitro*
- Grupo E apresentou um maior número de células
- Grupo G apresentou um menor número de células

EXPERIMENTO 2

- Não houve diferença estatística entre gestações e raças dentro do mesmo grupo e entre grupos.
- Nelore apresentou uma menor taxa gestacional comparado entre as raças Brahman e Brangus

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N.V. **Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol e trealose**. 2001. 26f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

ALVARENGA, M.A.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Criopreservation of equine embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl 3), 799-809,2007.

ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, F.B.; BERNARDI, M.L.; DEZEN, D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCMhpes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.40, p.279-286, 2003.

ALVES, N.G. **Estação do ano e tipo de luteólise sobre as características do proestro e estro de vacas da raça Gir e Guzerá (*Bos taurus indicus*)**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 93p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.248, 2000.

ARNOLD, K., PRATSCH, L., GAWRIS, H.K. Effect of poly (ethylene glycol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochem Biophys Acta**, v.782, p.121-128, 1983.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU (ABCZ) A raça Gir. **Revista ABCZ** nº 8, p.30-35, 2002.

BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; COSTA, C.P.D. *et al.* Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos: primeiro terneiro obtido no Brasil. VI Reunião Anual da SBTE, 2426 de agosto 1991, Curitiba, PR. **Anais...**p.51, 1991.

BERTHELOT, F.; VENTURE, E.; COGNIÉ, J.; FURSTOSS, V.; MARTINAT-BOTTÉ, F. Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. **Theriogenology** V.68 p.78–185, 2007

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts. **Theriogenology**, New York, v.25, n.1, p.147, 1986.

DATTENA, M, PTAK, G, LOI, P, CAPPAL, P. Vitrification of in vivo derived (IVD) ovine embryos in two different devices: open pulled-straws and French mini-straws. Proc ICAR 2000, Sandnes-Norway.

DATTENA, M., ACCARDO, C., PILICHI, S., ISACHENKO, V., MARA, L., CHESSA, B., CAPPAL, P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v.62, p.481-493, 2004.

DINNYES, A.; NEDAMBALE, T.L. Cryopreservation of manipulated embryos: tack-ling the double jeopardy. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p. 45-59, 2009.

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

DOCHI, O., IMAI, K., TAKAHURA, H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. **Animal Reproduction Science** v.38, p.179-185, 1995.

DONNAY, I.; AUQUIER, P.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. Vitrification of in vitro produced blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Animal Reproduction Science** v. 52, n. 2, p. 93-104, 1998.

DUBBY, R.T.; HILL, J.L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E.W.; BOLAND, M.P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, v.47, p.332, 1997.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FAHY, G.M., LEVY, D.I., ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.24, p.196-213, 1987.

FERNANDES C.B., SIQUEIRA-PYLES E.S.C., LANDIM-ALVARENGA. Viabilidade pós vitrificação de embriões bovinos cultivados em diferentes meios. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, p.161-163, 2002.

FRIEDLER S., GIUDICE L.C., LAMB E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertil. Steril.**, v.49, p.743-64, 1988.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

HAMANO, S., KOIKEDA, S., KUWAYAMA, M., NAGAI, T. Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v.38, p.1085-1090, 1992.

HANADA A., NAGASE H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.60, p.247-252, 1980.

HASLER J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN P.J.; JIN, Z.Q.; MACCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, 141-152, 1995.

HASLER, J.F., HURTGEN P.J., JIN Z.Q., STOKES J.E. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v.48, p.563-579, 1997.

HOCHI, S., KOZAWA, M., FUJIMOTO, T., HONDO, E., YAMADA, J., OGURI, N. *In vitro* maturation and transmission electron microscope observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v.33, p.300-310, 1996.

HOTAMISLIGIL, S., MEHMET, T., POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and development potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v.55, n.1, p.161-168, 1996.

IM, K.S., KANG, J.K., KIM, H.S. Effects of *cumulus* cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.881-891, 1997.

ISHIMORI H., SAEKI K., INAI M., NAGAO Y., ITASAKA J., MIKI Y., *et al.* Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v.40, p.427-439, 1993.

IWASAKI, S.; YOSIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in-vitro and in-vivo **Journal Reproduction Fertility**, v.90, p.279-284, 1990.

KAIDI, S. *et al.* Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.52, n. 3, p. 515-525, 1999.

KAIDI, S. et al. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1127-1134, 2001.

KASAI, M., KOMI, J.H., TAKAKAMO, A., TSUDERA, H., SAKURAI, T., MACHIDA, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal Reproduction Fertility**, v.89, p.91-97, 1990.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive Biomedicine online**. v. 9, p. 164-170, 2004

KHURANA N.K., NIEMANN H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenology**, v.54, p.313-326, 2000.

KULESHOVA, L.L.; MACFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.119-130, 1999.

KULESHOVA L.L., LOPATA A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertil. Steril.**, v.78, p.449-454, 2002.

LANDIM-ALVARENGA F.C. **Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos**. 1995. 95p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

LEIBO S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, p.767-790, 1984.

LEIBO S.P., MARTINO A., KOBAYASHI S., POLLARD J.W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.45-53, 1996.

LONERGAN, P. et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology Reproduction** v.69, p. 1424-31, 2003.

MAHMOUDZADEH A.R., VAN SOOM A., VAN VLAENDEREN I., DE KRU A. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on in vitro survival of vitrified bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.1291-1302, 1993.

MAHMOUDZADEH, A.R., VAN SOOM, A., BOLS, P., YSEBAERT, M.T., KRUIF, A., 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. **Journal Reproduction Fertility** 103, 33–39.

MAKAREVICH, A.V.; KUBOVI, E.; HEGEDUSOVA, Z.; PIVKO, P.; LOUDA, F. Post-thaw culture in presence of insulin-like growth factor I improves the quality of cattle cryopreserved embryos **Zygote**, v. 10, p. 1-6, 2010

MARTÍNEZ A.G., VALCÁRCEL A., de las HERAS M.A., MATOS D.G., FURNUS C., BROGLIATTI G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.11-21, 2002.

MARTINO, A., POLLARD, J.W., LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.503-512, 1996a.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996b.

MASSIP A, VAN DER ZWALMEN P., ECTORS F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v.27, p.69-79, 1987.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction** , v.10, p. 3004-3011, 1995.

MAZUR P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939-949, 1970.

MAZUR, P., LEIBO, S.P., CHU, H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, n.71, p.345-355, 1972.

Mc GRATH J., SOLTER D. Nuclear transplantation in the mouse embryo using microsurgery and cell fusion. **Science**, v.220, p.1300-1302, 1983.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; SILVA, L.F.A. *et al.* Congelamento ultrarrápido de embriões bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v.24, p.259 (abstract). 1996.

MEZZALIRA, A., MEZZALIRA J.C., MORAES A.N., THALER NETO A., VIEIRA A.D., BARRETA M.H.; DAMIANI. Vitrification of bovine embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. **Archives of Veterinary Science**. V.9, p.107-111, 2004.

MOHR, L.R.; TROUNSON, A.O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biology of Reproduction**., Madison, v.25, p.1009-1025, 1981.

NICACIO, A.C.; **Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2008. 110p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

O'NEIL, L., PAYNTER, S., FULLER, B., SHAW, R. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. **Cryobiology**, v.34, p.295-301, 1997.

OTOI, T., TACHIKAWA, S., KONDO, S., SUZUKI, T. Development capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.40, p.801-807, 1993.

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., SUZUKI, T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

OTOI, T., YAMAMOTO, K., KOYAMA, N., TACHOKAWA, S., SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v.37, p.77-85, 1998.

PALASZ A.T., MAPLETOFT R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1996.

PAPIS, K., SHIMIZU, M., IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.173, 1999.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation **Cell Tissue Bank**, v.9, p. 267-77, 2008.

PICKETT B.W. Principles of cryopreservation. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS**, 4, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins:USA, 1986.

POMAR, F.J, TEERDS, K.J; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study **Theriogenology**, v.63, p.2254-2268, 2005.

RALL, W. F. Cryopreservation of oocyte and embryos: Methods and applications. **Animal Reproduction Science.**, v.28, p.237-245, 1992.

REIS E SILVA, A.R.; DE LOS REYES, A.; GAMBARINI, M.L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C.C.; DIAS DE OLIVEIRA FILHO, B. Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** V. 13, p. 51-55, 2005.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOUPOLOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro* **Mol. Reprod. Dev.** V.62, p.320-327, 2002.

RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos In: Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, n.7, Jaboticabal, 1992 **Anais**, Jaboticabal, p. 55-79, 1992.

RODRIGUES, J.L. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6 M Ethylene glycol on the survival of day 7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution **Theriogenology**, v.45, p.168, 1996.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação "in vitro" em bovinos; aplicação comercial. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 186-187, 2000.

SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreserções de embriões – Metodologias de Vitrificação Revista Veterinária e Zootecnia v.16, n.4, p. 561-574, 2009.

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.9-15, 2008

SAITO N., IMAI K., TOMIZAWA M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1053-1060, 1994.

SCHNEIDER V. MAZUR P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v.21, p.68-79, 1984.

SCHNEIDER, U. Cryobiological principles of embryo freezing. **Journal of *in vitro* fertilization and embryo transfer**, v.3, n.1, p.3-9, 1986.

SEIDEL, G.E. Jr., G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS**, 6, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins:USA, 1986.

SEIDEL, G.E.Jr. Criopreservação de equine embryos. **Veterinary Clinics of North America: Equine Pract.**, v.12, n.1, p.85-99, 1996.

SERAPIÃO, V.R.; SÁ, F.W.; FERREIRA, M.A.; CAMARGO, A.S.L.; GILARDI, T.G.S.; VIANA, M.H.J.; RAMOS, A.A.; NOGUEIRA, G.A.L. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v.12, n. 1/3, p.58-61, Jan./Dez. 2005.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFFSON, H.; GUSTARI, S.; BARTOLOME, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vitro* produced bovine embryos. **International Congress on Animal Reproduction**. v.3, p.1333-35, 1992.

SIQUEIRA-PYLES E.S.C., FERNANDES C.B., LANDIM-ALVARENGA F.C. Desenvolvimento de embriões bovinos cultivados em diferentes meios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.156-159, 2002.

SOMMERFELD, V., NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.

STACHECKI, J.J., COHEN, J. Symposium: Cryopreservation and assisted human conception. **Reprod BioMed Online**, v.9, p.152-163, 2004.

STOREY K.B., STOREY J.M. Frozen and Alive. **Sci. Am.**, December, p.62-67, 1990.

SUCCU, S.; LEONI, G.G.; BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; BEBBERE, D.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, L.; NAITANA, S. Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes **Theriogenology**, v.68, p.107-114, 2007.

SZELL, S., SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal Reproduction Fertility**, v.78, p.699-703, 1986.

TROUNSON, A.O.; WILLADSEN, S.M.; ROWSON, L.E.A. The influence of *in vitro* culture and cooling on the survival and development of cow embryos. **Journal Reproduction Fertility**, Colchester, v.47, p.367-370,1976.

VAJTA G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter**, v.15, p.12-18, 1997.

VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-letters**, v.18, p.191-195, 1997a.

VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T., CALLESEN H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998a.

VAJTA, G., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.176, 1998b.

VAJTA, G, HOLM, P, KUWAYAMA M, BOOTH PJ, JACOBSEN, H, GREVE Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev** 1998;51:53–8.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAN SOOM, A.; VAN VLAENDEREN, I; MAHMOUDZADEH, A.R.; DELUYKER, H; KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage **Theriogenology**, v.38, p. 905-919, 1992.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; KRUIP, T.H.G.M.; RALL, W.F. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos **Cryobiology**, v.32, p. 157-167, 1995.

VARAGO, F.C., SALIBA, W.P., ALVIM, M.T.T., VASCONCELOS, A.B., OLIVEIRA,C.H., STAHLBERG, R., LAGARES, M.A. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. **Animal Reproduction Science**, v.3, n.3, p. 353-358, 2006.

VICENT, C., JOHNSON, M.H. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocytes. **Oxf. Rev. Reprod. Biol.**, v.14, p.73-100, 1992.

VIEIRA, A.D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine *In Vitro*-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 314-318, 2008.

VOEKEL, A., HU, Y.X. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.23-37, 1992.

WERLICH, D.E., BARRETA M.H., MARTINS, L.T., VIEIRA, A.D., MORAES, A.N. & MEZZALIRA, A. 2006. **Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super resfriado.**

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**. v.11, p.1071-1079, 1972.

WHITTINGAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125-126, 1971.

WHITTINGAM, D.G., LEIBO, S.P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -296C. **Science**, v.178, p.411-414, 1972.

WOLFE, J. & BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.

YOUNG, E., KENNY, A., PUIGDOMENECH, E., VAN THILLO, G., TIVERON, G., PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. **Fertil. Steril. Suppl.**, 70:S16, 1998.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p. 35-42, 1999.