

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TAXA DE CONCEPÇÃO E GESTAÇÃO DE EMBRIÕES  
PRODUZIDOS *IN VITRO*, TRANSFERIDOS A FRESCO OU  
CRIOPRESERVADO, EM VACAS E NOVILHAS NELORE**

**Guilherme Nogueira Borges Filho**

**Médico Veterinário**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TAXA DE CONCEPÇÃO E GESTAÇÃO DE EMBRIÕES  
PRODUZIDOS *IN VITRO*, TRANSFERIDOS A FRESCO OU  
CRIOPRESERVADO, EM VACAS E NOVILHAS NELORE**

**Guilherme Nogueira Borges Filho**

**Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

**Coorientadora: Profa. Dra. Marina Ragagnin de Lima**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária (reprodução  
animal)**

**2018**

Borges Filho, Guilherme Nogueira  
B732t Taxa de concepção e gestação de vacas e novilhas nelores na  
produção in vitro de embriões submetidos ou não por métodos de  
criopreservação / Guilherme Nogueira Borges Filho. -- Jaboticabal,  
2018  
xi, 33 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018  
Orientador: Joaquim Mansano Garcia  
Banca examinadora: Fabio Morato Monteiro, Luisa Cunha Carneiro  
Bibliografia

1. Vitrificação. 2. Congelação. 3. Bovinos. 4. Nelore. 5.  
Transferência direta. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** TAXA DE CONCEPÇÃO E GESTAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*, TRANSFERIDOS A FRESCO OU CRIOPRESERVADO, EM VACAS E NOVILHAS NELORE

**AUTOR:** GUILHERME NOGUEIRA BORGES FILHO

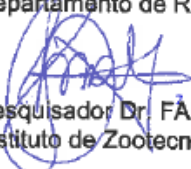
**ORIENTADOR:** JOAQUIM MANSANO GARCIA

**COORIENTADORA:** MARINA RAGAGNIN DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão **Examinadora**:

  
Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Dra. LUISA CUNHA CARNEIRO  
Departamento de Reprodução Animal / USP - Câmpus Pirassununga/SP

  
Pesquisador Dr. FÁBIO MORATO MONTEIRO  
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

Jaboticabal, 22 de junho de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Guilherme Nogueira Borges Filho – nascido em Uberaba – MG, aos 28 dias do mês de agosto de 1990. Concluiu o ensino médio no Colégio Marista Diocesano, na cidade de Uberaba – MG, em dezembro de 2007. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, em março de 2010. Participou do projeto de extensão CATI Leite. Realizou estágio curricular na Universidade de São Paulo – Câmpus São Paulo – SP, na área de reprodução animal sob orientação do Prof. Dr. Pietro Baruselli e na EMBRAPA Gado de corte, Campo Grande – MS, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Gomes. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2014. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Jaboticabal – SP, em março de 2016, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia.

“A sorte favorece os audazes. ”

- **Alexandre III da Macedônia**

Dedico este trabalho a meus pais Guilherme e Solange, por tudo que sempre fizeram por mim. Aos meus irmãos Bernardo e Mariana, pelo companheirismo. E a minha segunda mãe Marilda, que sempre cuidou e cuidará de mim.

***Ofereço e dedico.***

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por todo carinho, auxílio, confiança e sacrifício.

Ao Professor Dr. Joaquim Mansano Garcia, por todas orientações e ensinamentos, ajudas e esforço posto a este trabalho, sem o qual não seria possível a realização do mesmo.

À Professora Dra. Marina Ragagnin de Lima, por todo auxílio e coorientação, paciência e disponibilidade.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp Câmpus de Jaboticabal, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pelo acolhimento para a realização do curso.

À Bioklone Reprodução Animal, pela disponibilidade do laboratório e a todos funcionários que fizeram parte deste projeto.

À Fazenda São José do Cravo pela disponibilidade de execução do projeto, pelos animais e funcionários.

Aos membros da banca do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro, pelas sugestões.

Aos membros da banca da defesa de dissertação, Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro e Dra. Luísa Cunha Carneiro.

Ao professor Dr. Euclides Braga Malheiros pelo auxílio nas análise estatísticas.

Aos amigos de pós-graduação que fiz, aos de graduação que mantive e aos de república que sempre me acolheram.

À minha namorada Bruna Salles, por toda paciência, apoio, alegrias e carinho incondicional.

À CAPES pelo apoio financeiro na bolsa deste mestrado.

A todos que de certa maneira me ajudaram a concluir esta etapa.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	3
2.1.1. Obtenção dos oócitos.....	5
2.2. Criopreservação.....	6
2.2.1. Vitrificação.....	6
2.2.2. Congelação.....	7
2.3. Transferência de embrião em tempo fixo.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Local e animais.....	10
3.2. Aspiração folicular.....	10
3.3. Recuperação e classificação dos oócitos.....	11
3.4. Maturação <i>in vitro</i> .....	12
3.5. Fecundação <i>in vitro</i> .....	12
3.6. Cultivo e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> .....	13
3.7. Criopreservação dos embriões.....	14
3.7.1. Vitrificação dos embriões.....	14
3.7.2. Congelação dos embriões.....	14
3.8. Reaquecimento e descongelação dos embriões.....	15
3.8.1. Reaquecimento dos embriões vitrificados.....	15
3.8.2. Descongelação dos embriões congelados.....	16
3.9. Sincronização das receptoras.....	16

<b>3.10. Transferência dos embriões e diagnóstico de concepção e gestação.</b>	<b>17</b>
<b>3.11. Delineamento experimental.....</b>	<b>17</b>
<b>3.12. Análise estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>

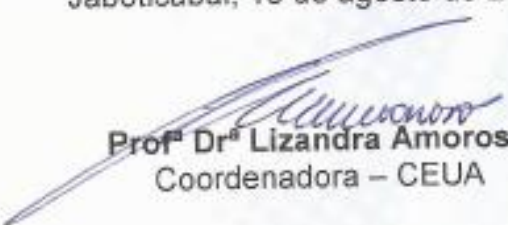
**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação das taxas de concepção e prenhez de embriões zebuino produzido *in vitro*, transferidos à fresco, congelado e vitrificados**", protocolo nº 11.355/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 18 de agosto de 2016.

Vigência do Projeto	01/09/2016 a 31/01/2018
Espécie / Linhagem	<i>Bos taurus indicus</i> / Nelore
Nº de animais	320
Peso / Idade	~350 kg / 18 – 35 m
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda

Jaboticabal, 18 de agosto de 2016.

  
Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso  
Coordenadora – CEUA

## TAXA DE CONCEPÇÃO E GESTAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*, TRANSFERIDOS A FRESCO OU CRIOPRESERVADO, EM VACAS E NOVILHAS NELORE.

**RESUMO** - A necessidade de uma metodologia mais prática para transferência de embriões em tempo fixo em rebanhos de gado de corte, para que se torne mais proveitoso, tem aumentado ao longo dos anos. O presente estudo avaliou a taxa de concepção e gestação de embriões produzidos *in vitro* transferidos a fresco, vitrificados ou congelados em um rebanho nelore de corte. Doadoras Nelore (n= 20) de um mesmo rebanho foram previamente selecionadas para serem submetidas a *ovum pick up* em dia aleatório do ciclo estral. Oócitos foram recuperados e selecionados para maturação *in vitro* por 24 horas a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade do ar. Para fertilização *in vitro*, sêmen da mesma partida, de um touro pré-selecionado da raça Nelore foi utilizado. Após 6 dias de cultivo *in vitro*, os embriões na fase de blastocisto foram aleatoriamente selecionados para serem transferidos a fresco, vitrificados ou congelados. As transferências foram realizadas em novilhas e vacas do mesmo rebanho das doadoras. As taxas de concepção, aos 30 dias, para os embriões transferidos a fresco, vitrificados ou congelados e transferidos depois do reaquecimento foram, respectivamente, de 37,64 ± 11,20%, 24,09 ± 2,34% e 16,21 ± 10,23%. As taxas de concepção, aos 30 dias, considerando a categoria da receptora, novilha ou vaca foi de 23,02 ± 3,42% e 31,06 ± 4,62%, respectivamente. O estudo mostrou que o método de congelamento lento, para transferência direta utilizado, não consegue resultados similares aos transferidos à fresco (p= 0,0078) e que a vitrificação ainda deve ser o método para criopreservação de embriões em rebanho da raça Nelore. Foi usada uma significância de p<0,05.

**Palavras-chave:** Vitrificação, congelamento, bovinos, nelore, transferência direta.

**CONCEPTION AND PREGNANCY RATES OF *IN VITRO* PRODUCED EMBRYOS,  
TRANSFERRED FRESH OR CRYOPRESERVED, IN NELORE COWS AND  
HEIFERS.**

**ABSTRACT** - The necessity of a more practical fixed time embryo transfer method in beef cattle herds, in order to make it more usable, has grown over the years. The present study compared the conception and pregnancy rates of *in vitro* produced embryos transferred fresh, vitrified or slow frozen in an nelore beef herd. Nelore donors (n=20) were previously selected to be submitted to ovum pickup on a random day of estrous cycle. Oocytes were recovered and selected for *in vitro* maturation for 24 hours at 38,5°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air humidity. For *in vitro* fertilization, semen, from the same batch, of one pre-selected Nelore bull was used. After 6 days of *in vitro* cultivation, embryos on blastocysts stage were randomly selected to be transferred either fresh, vitrified or frozen. The transfer procedures were conducted on heifers and cows of the same herd of the donors. Conception rates, at 30 days, for fresh transferred, vitrified and frozen transferred embryos were, respectively, 37,64 ± 11,20%, 24,09 ± 2,34% and 16,21 ± 10,23%. Conception rates, at 30 days, considering animal category of the recipients, heifer or cow were 23,02 ± 3,42% e 31,06 ± 4,62%, respectively. This study showed that the slow freezing, for direct transfer method used, can't achieve similar results (p= 0,0078) as the fresh transferred on Nelore herds, and vitrification still has to be the cryopreservation method for embryos on Nelore herds. It was used a significance of p<0,05.

**Keywords:** Vitrification, freezing, bovine, Nelore, direct transfer.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões possui papel importante na seleção de animais geneticamente superiores e de cruzamentos entre raças para produção, tanto no gado leiteiro quanto no gado de corte. Estratégias que utilizam esta biotécnica são direcionadas para otimizar simultaneamente a seleção genética e melhorar as taxas reprodutivas em rebanhos com baixa fertilidade (HANSEN, 2006). O Brasil lidera a produção mundial de embriões PIV, sendo responsável por 57,7% desta produção (IETS, 2016).

A técnica de *Ovum pick-up* (OPU); aspiração folicular guiada por ultrassom tem por objetivo o uso de vacas geneticamente superiores para serem doadoras de oócitos, para posterior maturação, fecundação e cultivo de embriões *in vitro*, os quais podem ser transferidos de forma não cirúrgica, ou congelados (LEEUEW, 2006). A OPU pode ser feita até duas vezes por semana, resultando em elevada produtividade de embriões, comparada à uma vez por semana, sem que ocorra queda na fertilidade da doadora (LEEUEW, 2006; CHASTANT-MAILLARD et al, 2003).

A OPU já foi relatada em várias raças de bovinos, nas quais foi demonstrado que a taxa de recuperação oocitária e a PIV está diretamente relacionada com a raça da fêmea em que está sendo utilizada. Esta diferença pode ser desde o tamanho do oócito recuperado até a própria eficiência da PIV (RATTO et al, 2011).

Embora atualmente taxas relevantes de prenhez tenham sido alcançadas com a transferência de embriões PIV a fresco, 43,24% (SANCHES et al, 2016), a sua praticidade no campo é questionável, uma vez que o manejo de sincronização de receptoras as quais devem ser proporcionais ao número de embriões produzidos se torna mais difícil. Neste sentido, a criopreservação embrionária é uma ferramenta que torna o trabalho economicamente viável, não sendo necessário o descarte de embriões excedentes à transferência. Além disso, a criopreservação de embriões também proporciona uma série de outros benefícios, tais como: utilização de receptoras em cio natural, planejamento do período de nascimento dos bezerros de acordo com os interesses de manejo da propriedade, a formação de bancos de germoplasma (com preservação de espécies ou raças em extinção), e principalmente facilitar a comercialização de embriões (importação e exportação).

Assim, a criopreservação de embriões tem se tornado parte integrante da reprodução assistida em animais, especialmente de espécies domésticas (LEIBO et al., 1996; PALASZ e MAPLETOFT, 1996; KULESHOVA e LOPATA, 2002). Entretanto, ainda não foi estabelecido um protocolo ideal de criopreservação (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Rotineiramente são utilizadas duas metodologias para a criopreservação de embriões, a congelação e a vitrificação. Estas duas metodologias diferem basicamente na velocidade de resfriamento e da concentração de crioprotetores no meio (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A vitrificação utiliza elevadas concentrações de crioprotetores fazendo com que a água da célula se solidifica em estado vítreo não formando assim cristais de gelo como na congelação (VAJTA; NAGY, 2006). Uma vantagem da vitrificação é que não é necessário nenhuma máquina para a criopreservação do embrião, tornando esta metodologia mais útil e econômica (LAZAR et al, 2000).

A vitrificação de embriões é a técnica mais utilizada para criopreservação de embriões PIV, tanto pela rapidez quanto pelo menor custo (SANCHES et al, 2016). Embora taxas de prenhez variando entre 27% (BLOCK; BONILLA; HANSEN, 2010) a 31% (SANCHES et al, 2016), a necessidade de ter uma pessoa treinada, para o procedimento do reaquecimento dos embriões e posterior transferência, se torna um entrave para a utilização de larga escala comercial da vitrificação.

A congelação possui a vantagem de utilizar reduzida concentração de crioprotetores, sendo o risco de toxicidade menor em relação à vitrificação. No entanto, a possibilidade de formação de cristais de gelo é maior, neste caso, os mesmos podem causar danos mecânicos nas células embrionárias (ARAV, 2014; DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

Poucos dados relativos a transferência a campo de embriões criopreservados são encontrados na literatura, especificando a taxa de prenhez. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir embriões *in vitro* de vacas de corte da raça Nelore, com oócitos obtidos por OPU, e avaliar as taxas de concepção e gestação após a transferência dos embriões submetidos ou não a métodos de criopreservação.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A PIV permite a produção em larga escala de animais geneticamente superiores, o que a torna esta técnica altamente atrativa do ponto de vista comercial. Além disto permite estudos avançados em relação aos mecanismos de fertilização, embriogênese e clonagem de animais (HOSHI, 2003). O fato de que a produção do embrião viável pode ocorrer mesmo em fêmeas com problemas reprodutivos que não se reproduziriam de maneira convencional, ou até mesmo com outras biotecnologias, tendem a maximizar o potencial reprodutivo dos rebanhos e seus ganhos em produção (ANDRADE et al., 2012).

A produção *in vitro* de embriões bovinos envolve três etapas: a maturação oocitária (MIV), a fertilização (FIV) e o cultivo embrionário (CIV) (GONÇALVES, et al., 2008).

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos tem duração de aproximadamente 24 horas, durante esse período os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: a quebra da vesícula germinativa, desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  (WANG et al., 2003).

Considera-se que a etapa de maturação dos oócitos seja de fundamental importância para que haja adequada aquisição da competência oocitária. É neste período em que os gametas adquirem capacidade para serem fecundados, expressando o seu potencial máximo durante o desenvolvimento embrionário inicial até que ocorra a transição materno-zigótica quando o genoma embrionário é ativado (FERREIRA et al., 2009). A taxa de blastocistos produzidos está diretamente relacionada com o processo de maturação oocitária (RUSSELL et al., 2006).



Na fertilização, em geral os oócitos bovinos após a MIV são incubados com os espermatozoides por um período de 18 a 24 horas. A fecundação propriamente dita se dá quando ocorre a penetração do espermatozoide no oócito, este por sua vez retoma a meiose e completa a maturação, em seguida há a formação dos prónúcleos masculino e feminino, e a singamia restabelecendo-se o número de cromossomos (GORDON, 2003).

A terceira etapa da PIV consta no desenvolvimento ou cultivo embrionário, que ocorre após a singamia. Formam-se as novas estruturas chamadas zigotos que multiplicam suas células (blastômeros) por sucessivas divisões mitóticas. A partir desse momento ocorre a transição materno-zigótica quando há a ativação do genoma embrionário (com 8 a 16 células), compactação (mórula com 32 células), diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, e a blastulação com a formação do blastocisto (GONÇALVES, et al., 2008).

Embora a taxa de produção de blastocistos seja influenciada pela origem e qualidade dos oócitos utilizados na produção *in vitro*, sabe-se que a qualidade dos embriões produzidos está diretamente relacionada ao cultivo embrionário (RIZOS et al., 2002; LONERGAN, 2006).

O sistema de produção *in vitro* dos embriões não apresenta a mesma eficiência que *in vivo*. Embriões *PIV* apresentam algumas características morfológicas e moleculares diferentes dos embriões produzidos *in vivo*, dentre elas o excessivo acúmulo lipídico no citoplasma (ABE et al., 1999; CROSIER et al., 2001).

Um dos principais problemas da deposição lipídica são as alterações na fluidez e função da membrana plasmática das células embrionárias, que acarretam em complicações relacionadas à permeabilidade celular aos crioprotetores (desidratação e reidratação celular), bem como o isolamento térmico promovido pelos lipídios contra as baixas temperaturas que acabam interferindo na velocidade de perda do calor durante o processo de criopreservação (KIM et al., 2001; SUDANO et al., 2012).

Entretanto, a reserva lipídica deverá suprir as necessidades energéticas requeridas durante os processos de maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, através da oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP. Neste contexto, o uso de reguladores metabólicos, tais como a L-

carnitina, forskolina e os ácidos linoleicos conjugados (CLA), que estimulam a lipólise para produção de ATP intracelular tem sido utilizado com êxito na PIV de embriões bovinos, melhorando sua criosobrevivência à vitrificação (DE LIMA, 2015).

### 2.1.1. OBTENÇÃO DOS OÓCITOS

A OPU em sincronia com a PIV permite a maior produção de filhos de uma única doadora em certo período de tempo, e isto independente do estado reprodutivo da doadora (LEEUEW, 2006). Em 2015 foram produzidos um total de 671.111 embriões de PIV, desse total 612.709 foram de OPU, no qual o Brasil foi responsável por 57,7% dessa produção mundial (IETS, 2016).

A OPU tem como principal vantagem a não utilização de hormônios para seu procedimento, possibilitando a repetitividade de procedimentos, que pode chegar a até duas vezes por semana, em intervalos de 3 a 4 dias ou intervalos de 2 a 5 dias (LEEUEW, 2006). Essa repetição de procedimentos na mesma semana favorece a eficiência da OPU e posterior PIV, sendo que os oócitos aspirados são da fase de crescimento antes da dominância folicular na primeira onda (MATCHOVKA et al., 2004). Em fêmeas Nelore (*Bos indicus*) estes folículos são de diâmetro < 4 mm, fazendo com que a recuperação dos mesmos se faça de modo mais eficiente e em maior número que em fêmeas *Bos taurus* (SENEDA et al., 2001). Em fêmeas Nelore há uma grande variação individual de recuperação de oócitos e produção de embriões, portanto, uma base fisiológica para o número de oócitos aspirados de uma fêmea nelore ainda não foi definido (PONTES et al., 2011).

A pré-estimulação com gonadotrofinas na OPU em doadoras melhora a recuperação, em até 20% (GALLI et al, 2001), e qualidade dos oócitos imaturos, e por consequência a produção de embriões, porém o fato de introduzir uma aplicação hormonal no procedimento vai contra umas das principais vantagens da OPU em relação ao procedimento de múltipla ovulação (LEEUEW, 2006).

A OPU não representa nenhum problema de bem-estar nas fêmeas doadoras, estudos demonstram que o nível de cortisol não se altera em relação as vacas

controle, produção leiteira não tem decréscimo (CHASTANT-MAILLARD et al., 2003), e nem a função ovariana é afetada por ela (ALLER et al., 2010).

O objetivo da OPU via aspiração transvaginal guiada por ultrassom é a coleta de oócitos imaturos de fêmeas pré-selecionadas, geneticamente superiores, para a PIV de embriões e sua posterior transferência em receptoras (LEEUW, 2006).

## **2.2. CRIOPRESERVAÇÃO**

A criopreservação nos moldes da utilização das biotecnologias da reprodução visa especificamente a facilitação da transferência dos embriões e um maior comércio de genética animal até em mercado internacional.

O sucesso de um programa de criopreservação de embriões depende dos fatores, concentração e tipo de crioprotetores, o resfriamento e aquecimento dos mesmos e o estado de desenvolvimento que se encontra estes embriões. Sendo que estes fatores são variáveis entre espécies (SHIRAZI et al., 2009).

Existem basicamente dois tipos de metodologias para criopreservação dos embriões, a vitrificação e a congelação. E suas principais diferenças são a curva de resfriamento dos embriões e a concentração utilizada de crioprotetores para isto (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

### **2.2.1. VITRIFICAÇÃO**

O princípio da criopreservação através da vitrificação tem como principal característica a solidificação de líquidos em estado amorfo (vítreo), mantendo suas propriedades químicas e mecânicas, sem que haja a formação de cristais de gelo, o que previne as lesões celulares (MASSIP, 2001).

Para realizar a desidratação celular com rapidez, são utilizadas concentrações elevadas de crioprotetores podendo causar injúrias tóxicas e osmóticas aos embriões (Vajta, 2006). Na tentativa de reduzir estes efeitos indesejáveis, são utilizadas algumas estratégias como as associações de crioprotetores menos tóxicos, mais

permeáveis e com diferentes características de permeabilidade (VAJTA, 2000; VAJTA e KUWAYAMA, 2006), e aumentar ainda mais a velocidade de resfriamento e reaquecimento (VAJTA et al., 1998).

A constatação de que o aumento na velocidade de resfriamento melhora os resultados da vitrificação, levou ao desenvolvimento de algumas alternativas tais como: a vitrificação em superfície sólida que consiste numa superfície metálica superresfriada em contato com nitrogênio líquido onde são depositadas as gotas de solução de vitrificação contendo os embriões (DINNYÉS et al., 2000), ou através da eliminação do efeito de isolamento térmico produzido pelo vapor do nitrogênio através do super-resfriamento do nitrogênio através de vácuo (ARAV et al., 2000).

Dessa forma surgiram novas tecnologias de vitrificação, chamadas de metodologias abertas que visam reduzir o volume de solução crioprotetora usada tradicionalmente na palheta de 0,25 microlitros, aumentando assim a velocidade de vitrificação dos embriões. Essas metodologias diferem principalmente pelo uso de diferentes suportes para acondicionamento dos embriões, tais como: a *Open Pulled Straw* (OPS) (VAJTA et al., 1997), as grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996), as micropipetas de vidro (KONG et al., 2000), os *cryoloops* (LANE et al. 1999), *crytops* (KUWAYAMA e KATO, 2000) e *cryotips* (KUWAYAMA et al, 2005).

As principais vantagens da metodologia de vitrificação giram em torno de uma técnica econômica, de rápida aplicação e de resultados satisfatórios de sobrevivência embrionária pós-reaquecimento (VAJTA, 2006). Porém quando se trata de transferência de embriões em um projeto de larga escala, a sua principal desvantagem é a necessidade de um técnico capacitado para o reaquecimento e envase dos embriões no momento da transferência (SANCHES et al., 2016).

### **2.2.2. CONGELAÇÃO**

Na metodologia de congelação os embriões são submetidos às concentrações mais baixas de crioprotetores e velocidade de resfriamento mais lenta. As palhetas contendo os embriões são colocadas na máquina de congelação e a curva de congelação inicia com a velocidade de resfriamento de 1°C/min, até que seja atingida

a temperatura de  $-7^{\circ}\text{C}$  em que é realizada a indução da cristalização. Logo após a velocidade de resfriamento varia entre 0,3 e  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir a temperatura de  $-32^{\circ}\text{C}$ , quando a palheta contendo o embrião é submersa no nitrogênio líquido (DODE et al., 2013).

Devido à baixa concentração de crioprotetores na metodologia de congelação lenta a formação de cristais de gelo não é totalmente evitada, o que pode lesionar membranas e organelas, diminuindo a taxa de concepção pós transferência (SANTIN et al., 2009). O embrião de congelação lenta tem menor choque osmótico no processo de resfriamento, em razão do processo em si, que se dá de forma mais lenta (VAJTA, 2006).

O embrião PIV criopreservado pelo método de congelação lenta permite a transferência direta em receptoras, isto possibilita viabilizar o manejo em larga escala, eliminando a necessidade do técnico capacitado no momento do reaquecimento e envase por não necessitar de avaliação da viabilidade embrionária antes da transferência (Sanches et al., 2016).

### **2.3. TRANSFERENCIA DE EMBRIÃO EM TEMPO FIXO (TETF)**

Transferência de embrião é uma ferramenta que otimiza o ganho genético, de rebanhos leiteiros ou de corte, aumentando sua produção e melhorando as taxas reprodutivas (PELLEGRINO et al., 2016). Fêmeas repetidoras de cio classificadas como sub férteis por problemas de perda embrionária ou baixa taxa de concepção, podem ser melhores aproveitadas com a TE evitando os efeitos do ambiente uterino nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, diminuindo assim as baixas taxas reprodutivas (RODRIGUES et al., 2010).

Vários são os fatores que afetam a taxa de prenhez dos embriões bovinos, como o tipo de receptora, sendo as novilhas melhores do que as vacas (HASLER 2001), a concentração sérica de progesterona no dia da transferência (REMSEN; ROUSSEL, 1982) a qualidade do embrião, a qualidade do corpo lúteo (CL) e a sincronia da receptora (ANDRADE et al 2012).

Para que um procedimento de transferência tenha taxas aceitáveis de concepção, é necessário que se tenha uma eficiente detecção de cio das receptoras.

Portanto, assim como na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), protocolos para a TE em tempo fixo são propostos, para que o erro de detecção seja compensado e a TE se faça de maneira satisfatória (BARUSELLI et al., 2000).

Embriões de PIV necessitam de maior número de receptoras sincronizadas para transferência, pelo fato de que a maioria dos embriões são transferidos a fresco (SIQUEIRA et al., 2009). Para compensar essa necessidade, se faz uso das técnicas de criopreservação.

Existem poucos trabalhos em que se é avaliado a taxa de concepção depois da transferência dos embriões criopreservados, a grande maioria avaliaram apenas as taxas de reexpansão e eclosão, e os poucos que são feitos as transferências para receptoras, são baixos os números de embriões utilizados, não tendo assim resultados concisos (DODE et al., 2013) (SANCHES et al., 2016).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi realizado na Fazenda São José do Cravo, no município de Prata/MG, durante as estações de monta de janeiro a abril dos anos de 2016 e 2017.

Para doadoras de oócitos foram selecionadas vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) (n=20), com idade média de 5 anos, com escore de condição corporal (ECC)  $\geq 3$  (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994), gestantes e não gestantes, livres de doenças infecciosas ou reprodutivas, de alto valor genético. Para as receptoras forma utilizadas novilhas e vacas multíparas (n=153), com idade média de 3 anos livres de doenças infecciosas e reprodutivas, com ECC  $\geq 2,5$  (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994) e apresentando ciclicidade reprodutiva. Todos os animais foram mantidos na mesma propriedade, tendo recebido o mesmo manejo alimentar, a pasto com sal mineral a vontade e livre acesso a água.

#### 3.2. ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Todas as doadoras foram submetidas a técnica de aspiração folicular para PIVE, com um total de 3 a 5 procedimentos por doadora. As doadoras prenhes que não foi possível as aspirações foram excluídas do projeto.

O procedimento de OPU foi realizado em dia aleatório do ciclo estral com auxílio de ultrassom (MINDRAY, DP-2200 VT), com transdutor vaginal micro convexo acoplado a guia para aspiração folicular, na frequência de 5 MHz. Antes do procedimento, foi feito o bloqueio regional por anestesia epidural, entre a última vertebra lombar e primeira caudal, da cauda e períneo (3 mL de 2% lidocaína; Bloc<sup>®</sup>, J.A. Saúde Animal, Patrocínio Paulista, SP, Brasil), com posterior esvaziamento do reto e higienização da região perineal. Para aspiração dos folículos foi utilizado agulhas hipodérmicas descartáveis 38 mm X 20G (TERUMO<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil).

### 3.3. RECUPERAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS OOCITOS

Os complexos cúmulus oócitos (COCs) juntamente com o fluido folicular recuperado no tubo de aspiração, foram transferidos para um filtro de colheita de embriões e lavados com PBS, várias vezes, até que o material ficasse translúcido e os COCs pudessem ser visualizados e recuperados sob estereomicroscópio.

Os COCs foram transferidos para uma placa de poliestireno de 35 mm contendo meio TCM199, com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10mM de bicarbonato de sódio, 15mM de hepes (7,5mM de hepes sódico e 7,5mM de hepes ácido), 10% de SFB, 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg de amicacina/mL de meio (Meio de Lavagem).

Os COCs foram classificados segundo LEIBFRIED E FIRST (1979).

Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente;

Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;

Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose;

Grau IV ou atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus* oócito escuro e irregular;

Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Foram selecionados para transporte e maturação, COCs classificados como de grau I, II e III.



### **3.4. MATURAÇÃO *IN VITRO***

O meio base utilizado para a MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco 31.100; Grand Island, NY, EUA) suplementado com 25mM de bicarbonato de sódio, 10% SFB (Crypion®). 1,0µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) (Pluset®, Calier), 50UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Vetecor®), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Sigma® P-4562), 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico®) (Meio de Maturação). A maturação foi completada em 24 horas em microgotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%.

### **3.5. FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

No procedimento de fecundação, os oócitos foram lavados duas vezes em meio BOK-TL, comercial (BOKLONE<sup>®</sup>) e duas vezes em meio BOK-FIV, comercial (BOKLONE<sup>®</sup>) para remoção da fonte proteica utilizada na maturação e parte das células do cúmulus. Realizado o procedimento de lavagem os oócitos foram transferidos para gotas de 100uL de meio BOK-FIV, sob óleo mineral.

Foi utilizado o sêmen de um mesmo touro, com capacidade reprodutiva testada, de uma mesma partida, para a fecundação de todos os oócitos do experimento. O sêmen foi descongelado em água a 35-37<sup>o</sup>C por aproximadamente 20 segundos. As palhetas secas em gaze estéril, e a extremidade selada cortada, com o auxílio de uma haste de aço inox, o lado de vedação com algodão e álcool polivinílico foi utilizado como êmbolo para liberação do sêmen em um tubo ependorff de 1,5mL contendo gradiente descontínuo de 45% (250µL) e 90% (250µL) de Percoll.

O sêmen foi submetido a uma força centrífuga de 3.620G por 7 minutos, o sobrenadante removido e o sedimento ressuspensado com 1mL de meio BOK-FIV. Nova sedimentação por centrifugação com uma força 1.110G durante 5 minutos foi realizada. Foram coletados 30µL do sedimento e colocados em outro tubo ependorff contendo 30 µL de meio BOK-FIV, previamente equilibrado. Amostras de 5µL de

sêmen foram tomadas e diluídas em 95µL de meio BOK-FIV ou água para avaliação da motilidade e concentração espermática, respectivamente.

O volume do sedimento foi então ajustado para uma concentração final de  $25 \times 10^3$  espermatozoides vivos/µL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos foi adicionado 8µL da suspensão de sêmen. Para a fecundação, sêmen e oócitos foram co-incubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

### 3.6. CULTIVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO*

Os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação e lavados em três diferentes gotas de meio BOK-TL, onde parte das células do cumulus foram removidas por sucessivas pipetagens. Logo após, foram lavados em meio de cultivo e transferidos para microgotas de 100uL de meio BOK-SOF comercial Bioklone®.

A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas depois dos zigotos serem colocados em cultivo. As trocas de meio (feed) foram realizadas no quarto e sexto dia de cultivo, onde foram retirados 50µl de meio de cada gota de cultivo e acrescentados 50µL de meio BOK-SOF fresco suplementado com ácido linoleico conjugado *trans*-10 *cis*-12 (CLA) na concentração de 150 µM. No sétimo dia de cultivo foi realizada a contagem dos embriões formados e as classificações quanto ao estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e somente embriões nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido foram transferidos à fresco ou criopreservados (vitrificado ou congelado) para posterior transferência a receptoras previamente sincronizadas.

### **3.7. CRIOPRESERVAÇÃO DOS EMBRIÕES**

#### **3.7.1. VITRIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES**

Os embriões foram vitrificados, seguindo a metodologia descrita por VAJTA et al., 1997, com algumas modificações.

Foi utilizado no máximo, cinco embriões por vez (por haste de vitrificação). Após retirar os embriões das gotas de cultivo, estes foram lavados três vezes em meio de Manutenção (TCM199 suplementado com 15mM de HEPES (7,5mM de HEPES sódico e 7,5mM de HEPES ácido), 10mM de Bicarbonato de sódio e 20% de SFB a 37°C). Posteriormente, os embriões foram levados para a gota (de aproximadamente 200µL) contendo meio de equilíbrio (meio de Manutenção, suplementado com 7,5% de etileno glicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C) por 3 minutos. Transcorrido o tempo, os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação (meio de Manutenção suplementado com 0,5M de sacarose, 16,5% de EG e 16,5% de DMSO a 37°C), após 30 segundos pipetados, totalizando o volume máximo de 2µL (embriões e meio de vitrificação) para a extremidade da haste de vitrificação (WTA®) e ao se completar 40 segundos de exposição, a haste foi imediatamente imersa em nitrogênio líquido. Logo em seguida uma meia palheta de 0,5mL adaptada foi resfriada também em nitrogênio e colocada como bainha protetora na haste. Os embriões foram mantidos em nitrogênio líquido até o momento do reaquecimento.

#### **3.7.2. CONGELAÇÃO DOS EMBRIÕES**

Os embriões selecionados para a congelação foram transferidos para o meio de congelação, salina em tampão fosfato (PBS) suplementado com 0,6 mg de *bovine serum albumin* (BSA)/mL e 20% de Soro Fetal Bovino e 1,5M de Etileno Glicol, onde foram mantidos por até 20 minutos em temperatura ambiente. Durante este período os embriões foram envasados individualmente em palhetas fina (de 0,25 mL).

A palheta de envase foi formada por uma coluna de aproximadamente 5cm, com meio de reidratação (PBS suplementado com 0,6 mg de BSA/mL, 20% de SFB e 0,3 M de sacarose); uma coluna de ar de aproximadamente 1,0 cm; uma coluna com

meio de congelação de aproximadamente 1,0 cm, contendo o embrião; uma segunda coluna de ar de aproximadamente 1,0 cm; uma coluna final contendo o meio de reidratação.

Os embriões envasados foram transferidos para uma máquina de congelação (TK® - TK100). Ao final de dois minutos de permanência na temperatura de  $-6,5^{\circ}\text{C}$  as palhetas foram submetidas à cristalização “*seeding*” mediante contato de uma pinça recém mergulhada em nitrogênio líquido nas colunas contendo ar acima ou abaixo da coluna de embrião até visualizar a cristalização.

Terminado o procedimento de “*seeding*” foi liberado a rampa de congelação com  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ , até atingir a temperatura de  $-32,5^{\circ}\text{C}$ , na qual as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido, onde permaneceram até a descongelação para transferência.

### **3.8. REAQUECIMENTO E DESCONGELAÇÃO DOS EMBRIÕES**

#### **3.8.1. REAQUECIMENTO DOS EMBRIÕES VITRIFICADOS**

Retirou-se as hastes de vitrificação do botijão de estocagem e colocou-se em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. As bainhas foram removidas e a extremidade da haste contendo os embriões foi imersa na primeira solução de reaquecimento (meio de Manutenção suplementado com 0,3 M de sacarose, a  $37^{\circ}\text{C}$ ) durante 1 minuto para iniciar o processo de remoção dos crioprotetores. Logo após, estes embriões foram transferidos para a segunda solução de reaquecimento (meio de manutenção suplementado com 20% de SFB e 0,15 M de sacarose, a  $37^{\circ}\text{C}$ ) onde permanecerão por 5 minutos. Em seguida foram transferidos para solução final de reaquecimento (meio Manutenção) por 10 minutos. Após a diluição dos crioprotetores os embriões reaquecidos foram envasados em palhetas de 0,25 mL em meio BLOK-HSOF, comercial Bioklone®, para a transferência em receptoras previamente sincronizadas.

### 3.8.2. DESCONGELAÇÃO DOS EMBRIÕES CONGELADOS

Os embriões congelados pelo método de transferência direta foram descongelados utilizando a seguinte metodologia: remoção da palheta do nitrogênio líquido, em seguida exposição ao ar por 12 segundos e depois mergulhada em água na temperatura de 37C° por 30 segundos;

Depois de descongelada a palheta foi agitada ao ar para mistura da gota contendo o embrião (gota central) com as demais gotas para a remoção do crioprotetor e reidratação do embrião.

### 3.9. SINCRONIZAÇÃO DAS RECEPTORAS

O total de 242 fêmeas, entre novilhas (139) e vacas (103), durante todo experimento foram utilizados na estação de monta de 2016 e posterior em 2017.

O protocolo de sincronização das receptoras foi realizado da seguinte forma: Dia 0 foi administrado 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Pfizer, Brasil) e colocado dispositivo intravaginal de progesterona (Primer®, Tecnopec, Brasil), de primeiro uso em vacas e segundo uso em novilhas. No Dia 7 foi administrado 7,5 mg de análogo de prostaglandina F2α (Prolise®, Tecnopec, Brasil) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000 UI, MSD, Brasil). No Dia 9 foi administrado 7,5 mg de análogo de prostaglandina F2α novamente, 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer, Brasil) para vacas e 0,7 mg para novilhas e feita a retirada o dispositivo de progesterona (Figura 1).

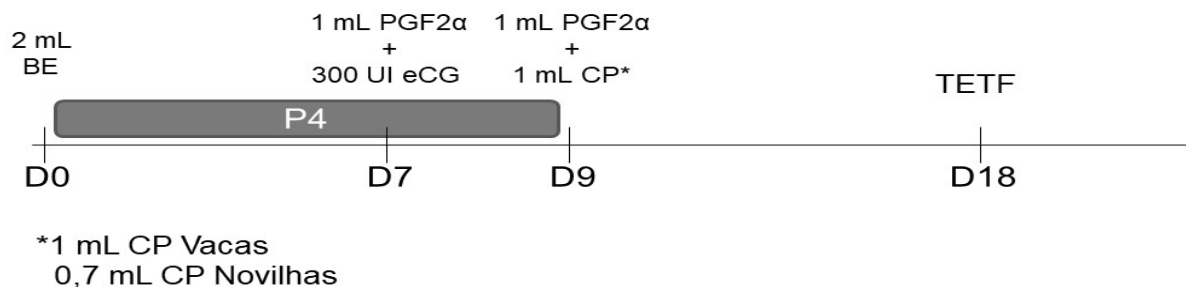


Figura 1. Protocolo de sincronização utilizado para a transferência em tempo fixo de embriões em vacas de corte. BE: benzoato de estradiol, PGF2α: prostaglandina, eCG: gonadotrofina coriônica equina, ECP: estradiol cipionate, P4: progesterona, TETF: transferência de embriões em tempo fixo.

### **3.10. TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES E DIAGNOSTICO DE CONCEPÇÃO E GESTAÇÃO**

A transferência dos embriões foi realizada 8 dias após o término do protocolo de sincronização.

Foi feita a transferência apenas em receptoras que possuem no mínimo um CL. Para esta avaliação fez-se a confirmação com ultrassonografia. O embrião foi transferido no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, na presença de dois ou mais, o embrião era depositado no corno com a presença do maior corpo lúteo.

Um total de 242 transferências nas receptoras sincronizadas, durante todo experimento foi realizado.

A taxa de concepção foi avaliada aos 30 dias após transferência dos embriões pelo método de ultrassonografia e aos 70 dias após transferência foi avaliada a taxa de gestação e a perda gestacional entre 30 - 70 dias nas receptoras.

### **3.11. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

O experimento foi feito em blocos casualizados, com três grupos de embriões produzidos *in vitro*. Sendo o grupo controle embriões transferidos à fresco e os grupos vitrificado ou congelado, tiveram os embriões transferidos depois do reaquecimento ou descongelação. Durante as transferências dos embriões mantivemos o equilíbrio entre os grupos de embriões, sendo transferido pelo menos dois grupos em uma mesma rotina, para as duas categorias de receptoras, novilhas ou vacas.

As receptoras utilizadas foram da raça Nelore, das categorias Novilhas (n=139) ou Vacas (n=103), demonstrando atividade cíclica reprodutiva e ECC  $\geq$  2,5. Foi avaliado a taxa de prenhez aos 30 e 70 dias após transferência.

### **3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As taxas de concepção ao trigésimo dia e de gestação septuagésimo dia para os tratamentos com os embriões (transferidos a fresco, vitrificado e congelado) e categoria de receptoras (novilhas ou vacas) foram comparados em uma tabela de contingencia e analisado pelo teste de  $\chi^2$  ao nível de 5% de significância pelo método Statistical Analysis System, versão 9.4.

#### 4. RESULTADOS

Dos 242 embriões selecionados para transferência, foram transferidos a fresco (n= 85), vitrificados (n=83) ou congelados (n= 74). Entre as categorias animais de vacas e novilhas foram transferidos 38 embriões à fresco, 34 vitrificados e 31 congelados em vacas (n=103) e 47 fresco, 49 vitrificados e 43 congelados em novilhas (n=139).

As taxas de prenhez aos 30 e 70 dias pós transferência para as categorias de receptoras vacas foi de 31,06% aos 30 e 70 dias e para a categoria novilhas foi de 23,02% e 20,86% aos 30 e 70 dias, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados não mostraram diferença entre as categorias para a taxa de prenhez aos 30 dias ( $p > 0,05$ ) e nem a perda embrionária aos 70 dias ( $p > 0,05$ ), embora tenha ocorrido perda embrionária somente na categoria de novilhas, conforme a tabela 1.

Quando os embriões frescos, vitrificados e congelados foram submetidos em duplicatas aos 30 dias teve diferença significativa entre os embriões transferidos a fresco e congelados ( $p < 0,05$ ) e não foi observado diferença entre os embriões transferidos a fresco e os depois de vitrificados ( $p > 0,05$ ) e entre os transferidos depois de vitrificados ou congelados ( $p > 0,05$ ). Da mesma forma, a taxa de prenhez aos 70 dias foi diferente entre os embriões transferidos a fresco e os transferidos depois de congelados ( $p < 0,05$ ) (tabela 2). As taxas de prenhez dos embriões a fresco ou depois de vitrificados ou congelados para transferência direta, no diagnóstico realizado aos 30 dias, apresentaram diferença entre si ( $p < 0,05$ ) e, aos 70 dias, no grupo de embriões transferidos a fresco na categoria de novilhas a taxa de prenhez teve diferença quando comparado com a taxa de vacas (tabela 3). As taxas de prenhez sofreram efeito da interação de categoria animal (vaca ou novilha) e tipo de embrião transferido (fresco, vitrificado ou congelado), aos 30 dias ( $p < 0,05$ ), sem, contudo, causar efeito aos 70 dias ( $p > 0,05$ ) (tabela3).



**Tabela 1.** Taxas de concepção aos 30 e gestação aos 70 dias após transferência de embriões em vacas e novilhas da raça Nelore.

Categoria	Embriões Transferidos (n)	Prenhez em 30 dias n (%)	Prenhez em 70 dias n (%)
Vaca	103	32 (31,06 ± 4,62%)	32 (31,06 ± 4,62%)
Novilha	139	32 (23,02 ± 3,42%)	29 (20,86 ± 4,34%)
Valor de p		0,16	0,07

**Tabela 2.** Taxas de concepção aos 30 e gestação aos 70 dias após transferência de embriões, em comparação dois a dois de embriões frescos, vitrificados e congelados em fêmeas de corte Nelore.

Embrião	Embriões transferidos (n)	Concepção em 30 dias n (%)	Prenhez em 70 dias n (%)
Fresco	85	32 (37,64 ± 11,20%)	29 (34,11 ± 8,91%)
Vitrificado	83	20 (24,09 ± 2,34%)	20 (24,09 ± 2,34%)
Valor de p		0,06	0,15
Fresco	85	32 (37,64 ± 11,20%)	29 (34,11 ± 8,91%)
Congelado	74	12 (16,21 ± 10,23%)	12 (16,21 ± 10,23%)
Valor de p		0,002	0,04
Vitrificado	83	20 (24,09 ± 2,34%)	20 (24,09 ± 2,34%)
Congelado	74	12 (16,21 ± 10,23%)	12 (16,21 ± 10,23%)
Valor de p		0,22	0,22

**Tabela 3.** Taxas de concepção aos 30 e gestação aos 70 dias após transferência de embriões frescos, vitrificados ou congelados em vacas e novilhas de corte Nelore.

Tipo do embrião	Categoria animal	Embriões Transferidos (n)	Prenhez em 30 dias n (%)	Prenhez em 70 dias n (%)
Fresco	Novilha	46	15 (32,60 ± 6,16%)	12 (26,08 ± 0,88%)
	Vaca	39	17 (43 ± 17,14%)	17 (43 ± 17,14%)
Vitrificado	Novilha	48	10 (20,83 ± 4,37%)	10 (20,83 ± 4,37%)
	Vaca	35	10 (28,57 ± 3,36%)	10 (28,57 ± 3,36%)
Congelado	Novilha	45	7 (15,56 ± 9,65%)	7 (15,56 ± 9,65%)
	Vaca	29	5 (17,24 ± 7,96%)	5 (17,24 ± 7,96%)
Valor de p			0,03	0,053

Interação tipo de embrião X categoria animal

## 5. DISCUSSÃO

Para que a transferência de embrião produzido *in vitro* seja uma biotecnologia amplamente utilizada na produção de bovinos, tanto em corte quanto leite, metodologias que melhorem sua eficiência em proporcionar gestação a termo são de grande importância para sua disseminação. Neste contexto a sincronização de receptoras e a criopreservação de embriões são pontos importantes para o incremento do ganho genético dos rebanhos aumentando a exploração das fêmeas de maior mérito genético.

Neste experimento foi realizado a sincronização de novilhas e vacas nelore, para serem utilizadas como receptoras de embriões produzidos *in vitro* após OPU de vacas Nelore de alto mérito genético. Embora, as categorias de vacas e novilhas não tenham apresentado diferença na taxa de prenhez aos 30 dias ( $p>0,05$ ) e aos 70 dias ( $p>0,05$ ), rotineiramente as novilhas apresentam melhores resultados de prenhez do que as vacas, por estarem com o ambiente uterino hígido em relação a vacas com múltiplos partos. Entretanto verificou-se taxa de concepção nas novilhas (23,02%) menor que a das vacas (31,06%) e também as três perdas embrionárias que ocorreram entre os diagnósticos com 30 e 70 dias foram de embriões transferidos a fresco tendo como receptora a categoria novilha, apesar de apresentarem ECC adequado (FERGUSON; GALLIGAN; THOMSEN, 1994) e terem sido avaliadas quanto a ciclicidade reprodutiva por método ultrassonográfico. Entre os mecanismos que garantem uma gestação, além da condição hígida do ambiente uterino é importante ressaltar a qualidade do embrião, mesmo tendo sido utilizado embriões com avaliação morfológica de boa qualidade em todos os tratamentos. Os erros de expressão gênica ou outros fatores que possam levar ao menor reconhecimento da gestação ou a morte embrionária precoce não foram objetos do presente estudo.

Remsen e Roussel (1982) observaram que novilhas apresentando concentração sérica de progesterona abaixo de 2,0 ng/mL são menos aptas a desenvolver gestação do que as que apresentam entre 2,0 a 5,0 ng/mL. Hasler (2001) observou que a transferência não cirúrgica de embriões criopreservados pelo método de congelamento proporciona menor taxa de gestação, podendo este fator ter

contribuído para a menor taxa de gestação nas novilhas neste experimento, uma possível baixa concentração de progesterona.

A determinação do número de receptoras para um programa de TE seja de embriões obtidos *in vivo* ou *in vitro* para que se tenha bom aproveitamento, depende da determinação do número de embriões obtidos (REICHENBACH et al, 2002; BELTRAME et al, 2010). Assim sendo, o total de oócitos obtidos no mesmo programa de OPU e a capacidade de fecundação do sêmen a ser utilizado e a taxa de conversão em embriões são os principais fatores que predirão o número de receptoras necessário para aquele programa (BÓ et al, 2004).

Entretanto os embriões excedentes e falta de receptoras nos meses de menor disponibilidade de alimentos e a necessidade de comércio externo de embriões foram os pontos que mais pressionaram o desenvolvimento de métodos para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro*.

Entres os métodos de criopreservação a vitrificação tem sido mais utilizado por sua maior eficiência nas taxas de prenhez, embora sendo um método mais prático no momento da criopreservação e menos no momento do reaquecimento. Por outro lado, o método de congelação lenta para transferência direta seja mais dificultoso no momento da criopreservação é extremamente prático no momento da transferência, por este motivo tem sido o método de maior expectativa para os veterinários que atuam na transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Em relação a capacidade dos embriões vitrificados, a taxa de concepção não foi diferente dos transferidos a fresco ( $p>0,05$ ) e nem dos congelados ( $p>0,05$ ) (tabela 2). Esta taxa de prenhez demonstrou que a vitrificação ainda é o método mais seguro de criopreservação de embriões PIV, principalmente pelo uso de altas concentrações de crioprotetores, a qual previne a formação de cristais de gelo dentro e extracelular, sendo a água solidificada em estado vítreo (MASSIP, 2001; VAJTA; NAGY, 2006).

Os resultados deste experimento reforçam ainda mais que a vitrificação de embriões PIV continua sendo o método mais utilizado para a criopreservação, devido a sua rapidez de produção, custo reduzido (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013) e maiores taxas de concepção e prenhez, quando comparados com os embriões

congelados mesmo sendo a sua principal desvantagem a necessidade de um técnico treinado para o reaquecimento dos embriões, e a alta concentração de crioprotetores utilizados, o que já foi demonstrado possui um efeito tóxico para embriões de PIV (FAHY, 2010; SANCHES et al, 2016).

Estudos já relataram que a alta concentração de crioprotetores tem sido tóxica para os embriões, (FAHY, 2010) e, com isso, requer pessoa treinada para a sua realização, para evitar que o embrião permaneça neste crioprotetores por tempo acima do recomendado, para evitar este efeito. Quanto aos embriões congelados observou-se baixa taxa de prenhez (16,21%), quando comparados com os transferidos a fresco. A formação de cristais de gelo extra e intracelular e consequentemente a ruptura da membrana e extravasamento dos constituintes celulares, que é o processo de maior ocorrência na congelação (GUPTA et al 2016), pode ter contribuído para uma menor taxa de concepção. Para minimizar estes efeitos e alterar a velocidade de entrada e saída dos crioprotetores da célula, neste experimento adicionamos o ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 (CLA) na concentração de 150  $\mu$ M, que além de modulador de metabolismo tem a capacidade de alterar a fluidez de membrana celular e proporcionar maior sobrevivência embrionária no processo de criopreservação conforme verificado por De Lima (2015) nos procedimentos de vitrificação.

A formação de cristais de gelo intracelulares na criopreservação de embriões é encontrada nas metodologias de congelação lenta, onde utiliza menor concentração de crioprotetores, que diminui o efeito tóxico dos mesmo ao embrião, o que pode favorecer a viabilidade depois da descongelação do embrião para transferência direta, porém não previne a formação dos cristais levando a lesões de organelas e membrana celular (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013), reduzindo a taxa de concepção dos embriões. Entretanto, a reduzida concentração de crioprotetores, também previne o choque osmótico do embrião, permitindo uma reidratação ideal pós descongelação (ARAV, 2014) não tem sido o suficiente para melhorar os resultados de prenhez.

Dentre as estratégias para melhorar os resultados de sobrevivência dos embriões criopreservados têm-se utilizado dos modificadores do metabolismo e fluidez de membrana dos embriões produzidos *in vitro* (DE LIMA, 2015). A taxa de

prenhez ao 30º dia, dos embriões PIV, transferidos a fresco (37,64%, tabela2) neste experimento está dentro dos observados na literatura (ANDRADE et al 2012), demonstrando que a suplementação com o ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 (CLA) na concentração de 150 µM, não interferiu na capacidade de proporcionar gestações com os embriões transferidos a fresco.

## **6. CONCLUSÃO**

As categorias de receptoras vacas e novilhas não interferiram na taxa de prenhez de transferência não cirúrgica de embriões de PIV a fresco ou criopreservado.

Os embriões transferidos depois de criopreservados apresentam menor taxa de prenhez em relação ao fresco.

Os embriões submetidos a congelamento lento para transferência direta, proporcionam menor taxa de prenhez em relação aos transferidos a fresco.

## REFERÊNCIAS

ABE, H., YAMASHITA, S., T. SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p.325-335. 1999.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, p. 57-66, 2002.

ALLER, J.F., MUCCI, N.C., KAISER, G.G., RIOS, G., CALLEJAS, S.S., ALBEIRO, R.H., 2010. Transvaginal follicular aspiration and embryo development in superstimulated early postpartum beef cows and subsequent fertility after artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 1–8, 2010.

ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.

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

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 96-102, 2014.

BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., CARVALHO, N.A.T., VALENTIM, R., BERBER, R.C.A., CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H., COSTA NETO, W.P., 2000. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “ovsynch” com inovulação em tempo fixo. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, UFRGS 28 (Suppl. 2), 216 (abstract).

BELTRAME, R. T.; BARIONI, L. G.; QUIRINO, C. R.; DANTAS, O. D. Modelagem bioeconômica da transferência de embriões bovinos. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 32-41, 2010.

BÓ, G. A.; MORENO, L.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L. Manipulação do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 1-22, 2004.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 11, 2010.

CHASTANT-MAILLARD, S.; QUINTON, H.; LAUFFENBURGER, J.; CORDONNIER-LEFORT, N.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; MORMEDE, P.; RENARD, J. P. Consequences of transvaginal follicular puncture on weel-being in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 555-563, 2003.

CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J., ALEXANDER, J.E., FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

DE LIMA, M. R., **Estudo comparativo entre fontes de macromoléculas na produção *in vitro* de embriões bovinos e seus reflexos na criopreservação**, Dissertação, 2011, 83p.

DE LIMA, M. R., **Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação**. 2015, 74p.

DINNYÉS, A., DAI, Y., JIANG, S., YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cells nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.513-518, 2000.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, p. 145-150, 2013.

DUQUE, P., HIDALGO, C.O., GOMEZ, E., PINTADO, B., FACAL, N., DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects



on bovine in vitro embryo development and quality. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 487–496, 2003.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p. 45-53, 2010.

FERGUSON, J. D., D. T. GALLIGAN, N. THOMSEN. Principal descriptors of body condition in Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 77 p. 2695–2703, 1994.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A. Cytoplasmatic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C., TURINI, P., DUCHI, R., LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**. V. 55, p. 1341-1357, 2009.

GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISINTIN, J.A., COSTA, L.F.S. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2nd. Ed. 2008. São Paulo, Rocca, p. 261- 291.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**, 2nd Edition, CAB International, University Press, Cambridge, 548 p. 2003.

GUPTA, A.; SINGH, J.; ANZAR, M. Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v.164, p. 162-168, 2016.

HANSEN, P. J.; BLOCK, J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction, Fertility and Development**, v, 19, p. 1-14, 2004.

HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1401-1415, 2001.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675-685, 2003.

IETS 2016: 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm. Australia: **IETS**, 2017.

KIM, J.Y., KINOSHITA, M., OHNISHI, M., FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131–138, 2001.

KONG I.K., LEE, S.I., CHO, S.G., CHO, S.K., PARK, C.S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1817-1826, 2000.

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

KUBELKA, M., MOTLIK, J., SCHULTZ, R.M., PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p.292-302, 2000.

KUWAYAMA M, KATO O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.17, p. 477, 2000.

KUWAYAMA, M., VAJTA, G., IEDA, S., KATO, O. Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containersless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**. v.17, p. 1234- 1236, 1999.

LAZAR, L.; SPAK, J.; DÁVID, V. The vitrification of *in vitro* fertilized cows blastocysts by the open pulled straw method. **Theriogenology**, v. 54, p. 571-578, 2000.

LEEuw, A. M. VAN WAGTENDONK-DE. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914:925, 2006.

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.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. , 1979.

LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p.137-152, 2006.

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

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals (review). **Reproduction in Domestic Animals**, v 36, p. 49-55, 2001.

MATCHOVKA M, KRAUSOVA K, JOKESOVA E, TOMANEK M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 16, p. 329–335, 2004.

MORATÓ, R.; MOGAS, T. New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryos. **Cryobiology**, v. 68, p. 288–93, 2014.

NEDAMBALE, T. L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in vitro defined medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 61-75, 2006.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E., MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p.183-188, 2001.

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

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 2, p. 127-149, 1996.

PELLEGRINO, C. A. G.; MOROTTI, F.; UNTURA, R. M.; PONTES, J. H. F.; PELLEGRINO, M. F. O.; CAMPOLINA, J. P.; SENEDA, M. M.; BARBOSA, F. A.; HENRY, M. Use of sexed sêmen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v. 86, p. 888-893, 2016.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 164-1646, 2011.

PYLES, E. S. C. S. **Criopreservação de embriões bovinos**. 2003 Monografia (Disciplina "Seminários II") Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2003

RATTO, M. H.; PERALTA, O. A.; MOGOLLON, G.; STROBEL, P.; CORREA, J. Transvaginal ultrasound-guided cumulus oocyte complexes aspiration and *in vitro* embryo production in suckled beef and lactating dairy cattle on pasture-based management conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 1-6, 2011.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões de bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, U. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 127-178.

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M. P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., et al. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v. 66 p. 589-95, 2002.

RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo

transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 110-117, 2010.

RUSSELI, D.F., BAGIR, S., BORDIGNON, J., BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF Embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SANTIN, T. R.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 561-574, 2009.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.

SENEDA M. M.; ESPER C. R.; GARCIA J. M.; OLIVEIRA J. A.; VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37– 43, 2001.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v.49, p.483-497, 1998.

SHIRAZI, A.; SOLEIMANI, M.; KARIMI, M.; NAZARI, H.; AHMADI, E.; HEIDARI, B. Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. **Criobiology**, v. 60, p. 204-210, 2010.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO JR., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958, 2009.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., SOTOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P.B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation:

correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

STURMEY, R.G., REIS, A., LEESE, H.J., MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44(3), p. 50–58, 2009.

SUDANO, M.J., PASCHOAL, D. M., CAIXETA ES, SANTOS VG, TATA A, FERREIRA CR, MARTINS A JR, MACHADO R, EBERLIN MN, BURATINI JJ, LANDIM-ALVARENGA FC. Cryotolerance of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro and in vivo produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 677, 2012.

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, 1997.

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

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

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

WANG, W., DAY, B.N., WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? **Microscopy Research Techniques**, v.61, p.335-341, 2003.