

EMILIANO FRANCO RIBEIRO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES
BOVINO PRODUZIDOS *IN VITRO* :
ESTADO DA ARTE**

Trabalho de Conclusão de
Curso de Graduação
apresentado à Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de
Médico Veterinário.

Preceptor: Prof. Titular Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU

2009

EMILIANO FRANCO RIBEIRO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES
BOVINO PRODUZIDOS *IN VITRO* :
ESTADO DA ARTE**

Trabalho de Conclusão de
Curso de Graduação
apresentado à Faculdade
de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de
Médico Veterinário.

Área de concentração: Reprodução Animal

Preceptor: Prof. Titular Sony Dimas Bicudo

Coordenador de Estágios: Prof. Ass. Dr. Francisco José Teixeira Neto

BOTUCATU

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ribeiro, Emiliano Franco.

Criopreservação de embriões bovino produzidos *in vitro*: estado da arte / Emiliano Franco Ribeiro. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Medicina Veterinária) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Botucatu, 2009

Preceptor: Sony Dimas Bicudo

1. Bovino - Reprodução 2. Sêmen congelado

Palavras-chave: Congelação lenta; Criopreservação; PIV; Vitrificação

Essa monografia é dedicada...

À Deus.

À minha família, da qual fazem parte meu pai, minha mãe e meu irmão, serei eternamente grato por todo o amor, carinho e compreensão incondicionalmente despendidos e por todos os momentos de atenção, sacrifício e abdicção para zelar primariamente pela minha educação e consequentemente pela formação de meu caráter.

Aos meus amigos, partilhadores de alegrias e tristezas, sempre dispostos a ouvir e ajudar.

Aos meus educadores, cada um com sua respectiva parcela de contribuição para a formação de minha identidade, minha ideologia e meu caráter.

Ao Professor Sony Dimas Bicudo, meu orientador desde meados da graduação, sendo desde o primeiro momento atencioso, humilde e respeitoso. Pessoa admirável profissional e pessoalmente, que em momento algum me faltou com sua ajuda.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Campus de Botucatu pelo ensino oferecido durante o curso de graduação em Medicina Veterinária.

À todos os professores e funcionários dessa instituição que contribuíram para minha formação profissional.

Aos colegas de turma, “bixos” e veteranos.

Ao Professor Sony Dimas Bicudo pela orientação no projeto de iniciação científica, nos estágios do 5º ano e na monografia.

Ao Cnpq pela bolsa cedida para o desenvolvimento do meu projeto de iniciação científica.

Ao coordenador dos estágios do 5º ano, Prof. Francisco José Teixeira Neto pela paciência e atenção.

Aos locais de estágio que me receberam durante a graduação, possibilitando a complementação do ensino e a conscientização sobre a realidade prática do mercado de atuação do Médico Veterinário.

*"Toda mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões em todas as espécies domésticas e principalmente na bovina alcançou nos últimos anos *status* de notoriedade. Essa biotécnica reprodutiva associada à aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU), crescentemente vem sendo incorporada e difundida em nossos rebanhos bovinos, classificando o Brasil já no topo da lista em número de embriões produzidos *in vitro*. Algumas vantagens significativas proporcionadas, como a possibilidade de utilização de oócitos de animais pré-púberes ou prenhes, não requerer necessariamente o uso de tratamento hormonal, possibilitar um menor intervalo de tempo para gerar prenhez, racionalização na utilização do sêmen e otimização do uso de sêmen sexado foram determinantes para que a OPU/PIV ocupasse essa posição de destaque. Contudo, a possibilidade de criopreservação de embriões bovino PIV, ainda constitui o grande entrave para a utilização maximizada desta biotecnologia, seja pela falta de método eficaz e/ou pela baixa criotolerância dos embriões produzidos em laboratório. Atualmente, os métodos de criopreservação de embriões PIV mais utilizados são: a congelação lenta e a vitrificação. Tradicionalmente, a congelação lenta é ainda o método de maior emprego na criopreservação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Por outro lado, mais recentemente a vitrificação, embora ainda não utilizada em larga escala de forma comercial, vem demonstrando, em pesquisas, resultados satisfatórios na criopreservação de embriões PIV.

Palavras chave: PIV, criopreservação, congelação lenta e vitrificação

ABSTRACT

In the last years, the embryo *in vitro* production for every domestic species and mainly for bovine has attained a notorious status. This reproductive biotechnical procedure associate with ultrasound-guided ovum pick up (OPU) has been more and more incorporated and spread in our cattle herds, ranking up Brazil already at the top of the list in number of *in vitro* embryo produced. Some significant advantages provided, such as the possibility of using the premature or pregnant animals oocytes, without necessarily requiring the use of hormonal treatment, to make it possible to generate pregnancy at a shorter period of time, the rationalization in the use of semen and optimization in the use of sexed semen were determinant factors for OPU/IVP to reach this outstanding position. Nevertheless, right now the possibility of IVP embryo cryopreservation, just now is the biggest impediment for maximizing the use of this biotechnology, due to both lack of efficient methods and low laboratory produced embryo cryotolerance. Nowadays, the most used methods of IVP embryo cryopreservation are: slow freezing and vitrification. Traditionally, slow freezing is still the most used methods for *in vivo* and *in vitro* produced embryo cryopreservation. However, more recently vitrification - although still not commercially used in large scale - has been presenting satisfactory results in IVP embryo cryopreservation, according to searches.

Keywords: IVP, criopreservation, slow congelation and vitrification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Diferenças entre embriões produzidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	7
2.2. Fatores que influenciam a criopreservação dos embriões PIV.....	8
2.3. Estratégias de pesquisa.....	10
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	12
4. REFERÊNCIAS.....	13

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil aparece em posição de destaque com quase 50% do total de embriões produzidos mundialmente (VARAGO et al., 2008). Em recente relatório, o Brasil foi ranqueado como o segundo colocado na produção mundial de embriões produzidos *in vivo*, e ocupa o topo da lista em embriões produzidos *in vitro* (THIBIER, 2006).

Na década de 90, um inventário mundial revelou que mais de 50% do total de embriões transferidos (produzidos *in vivo* e *in vitro*) eram provenientes de descongelamentos (THIBIER, 1997). No entanto, enquanto as taxas de prenhez com embriões produzidos *in vivo* criopreservados estão em torno de 40-60%, os resultados com embriões bovinos PIV criopreservados tem sido variáveis e consideravelmente mais baixos (NIEMANN, 1991; HASLER et al., 1995; KAJIHARA et al., 1992; MASSIP et al., 1995; NIEMANN, 1995; DAMIANI et al., 1997).

Há tempos, o tema criopreservação de embriões PIV vem sendo objeto de inúmeras pesquisas e especulações por parte de instituições públicas e privadas. Até o momento, o principal obstáculo associado ao uso intensivo da criopreservação são a falta de métodos eficazes para preservar os embriões produzidos *in vitro* e/ou a baixa criotolerância desses embriões, supostamente devido a inadequação dos meios de cultivo a que os mesmos são submetidos (NEDAMBALE, 2004; MUCCI et al., 2006).

Constantemente, uma série de alterações são propostas na composição dos meios de cultivo e/ou criopreservação uma vez que seus componentes são determinantes da qualidade dos embriões (RIZOS et al., 2001; MASSIP & LEIBO, 2002).

O aprimoramento dos métodos de criopreservação disponíveis e/ou o desenvolvimento de outros mais eficientes também são medidas plausíveis buscando melhorar a sobrevivência dos embriões PIV após a

criopreservação (HOCHI et al., 1996) disponíveis atualmente são a congelação lenta e a vitrificação.

Apesar da congelação lenta ainda ser o método de maior emprego na criopreservação de embriões PIV, provavelmente relacionado à tentativa inicial de extrapolação dessa técnica há tempos consagrada em embriões produzidos *in vivo*, o método de maior fomento atual, que tem sido apontado como alternativa rápida e econômica à congelação lenta (CAMPOS-CHILLÒN et al., 2006) e mostrado ser mais benéfico para embriões PIV (AGCA et al., 1994) é a vitrificação.

O objetivo deste trabalho é expor os atuais conhecimentos envolvendo a criopreservação de embriões PIV, as limitações que ainda persistem e as estratégias das pesquisas para reverter-las.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diferenças entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*

Há tempos, a criopreservação constitui-se em um método consagrado e eficiente de armazenamento de embriões em inúmeras espécies de mamíferos (FUKU et al., 1992) e é considerada um passo crucial para a disseminação e conservação do material genético animal (PEREIRA & MARQUES, 2008). Todavia, sabe-se também que embriões PIV não sobrevivem a criopreservação tanto quanto seus equivalentes produzidos *in vivo* (HASLER et al., 1995; FAIR et al., 2001; MARTINEZ et al., 2006). Segundo Pereira e Marques (2008), todos os embriões sofrem considerável dano morfológico e funcional durante a criopreservação, porém a extensão das injúrias, assim como diferenças na sobrevivência e taxas de desenvolvimento embrionário após a descongelação podem ser altamente variáveis, na dependência entre outros fatores, de terem sido produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

Comparativamente ao embrião produzido *in vivo*, o embrião PIV apresenta citoplasma mais escuro e de menor densidade (POLLARD & LEIBO, 1994), como consequência do maior conteúdo lipídico (FAIR et al., 2001); maior fragilidade da zona pelúcida (DUBY et al., 1997); menores taxas de crescimento e maior fragilidade térmica (LEIBO & LOSKUTOFF, 1993); menor expressão de dispositivos de comunicação intercelulares (BONI et al., 1999); diferenças no metabolismo (KHURANA & NIEMANN, 2000a); resultam em menores taxas de prenhez (FARIN & FARIN, 1995) e maior incidência de anormalidades cromossômicas (Viuff et al., 1999; SLIMANE et al., 2000). Adicionalmente, muitas diferenças ultraestrutural tem sido relatadas (CROSIER et al., 2000, 2001; FAIR et al., 2001; RIZOS et al., 2002b), assim como relativo à expressão gênica (RIZOS et al., 2002a; LONERGAN et al., 2003; WRENZYCKI et al., 2005, 2007). Todas essas diferenças morfológicas especialmente ultraestruturais, entre embriões produzidos *in vivo* vs *in vitro*, e mais particularmente os efeitos dos diferentes sistemas de cultivo sobre aqueles produzidos *in vitro* permitem em parte explicar a variação da criotolerância observada (FAIR et al., 2001; FARIN et al., 2001; RIZOS et al., 2002). De acordo com Abe et al. (2002) e Seidel (2006) o principal fator correlacionado com a maior dificuldade de congelamento de embriões PIV está em seu maior número e tamanho de gotas citoplasmáticas de lipídeo, levando a uma redução em sua criotolerância.

2.2. Fatores que influenciam a criopreservação dos embriões PIV

- **Meio de cultivo embrionário**

O maior conteúdo lipídico apresentado pelos embriões PIV é associado a alguns dos componentes presentes no meio de cultivo a que os mesmos são submetidos (PEREIRA & MARQUES, 2008). Alguns autores comprovaram haver um aumento significativo do conteúdo lipídico

em forma de gotas de lipídeos em embriões bovinos cultivados em meio, cuja fonte protéica foi o soro fetal bovino (FBS) (ABE et al., 2002; LEROY et al., 2005). Em contrapartida, observou-se que embriões cultivados na ausência de FBS reduziram o acúmulo de lipídeos e também melhoraram sua resistência a criopreservação (ABE et al., 2002; PEREIRA et al., 2007). Admite-se ainda que o FBS esteja relacionado às alterações no metabolismo embrionário (KHURANA & NIEMANN, 2000b) e na estrutura mitocondrial (FARIN et al., 2001).

- **Congelação lenta e vitrificação**

Segundo Nedambale et. al (2004) embriões PIV tem sido preservados com sucesso pelo uso de métodos de congelação lenta convencional (RALL, 1992; SOMMERFIELD & NIEMANN, 1999), ou padrão (RALL, 1992; FAHY et al., 1984), ou métodos de vitrificação modificada, tais como *open pulled straw* (OPS) (VAJTA et al., 1998) e micropipetas de vidro (GMP) (KON et. al, 2000).

A congelação lenta é ainda hoje a técnica mais amplamente utilizada para criopreservação tanto de embriões produzidos *in vivo* quanto de embriões PIV (PEREIRA & MARQUES, 2008), e apresenta como vantagem o uso de baixas concentrações de crioprotetores, além de permitir a transferência direta após a descongelação (VOLKEL & HU, 1992).

No entanto, em embriões PIV reduz as taxas de sobrevivência após a descongelação, principalmente devido a sua maior susceptibilidade à formação de cristais de gelo (KASAI et al., 2002).

Um avanço significativo na criopreservação de embriões nos últimos anos foi o desenvolvimento da criopreservação “ice-free”, chamada de vitrificação (RAIL & FAHY, 1985).

A vitrificação consiste na solidificação de uma solução, não acarretando na sua cristalização, mas sim na elevação extrema da sua viscosidade durante uma refrigeração rápida. Embora a vitrificação

elimine as crioinjúrias, as elevadas concentrações de crioprotetores que permitem alcançar o estado de cristal, aumentam os riscos de danos osmóticos e tóxicos (KUWAYAMA, 1994).

Segundo Agca et al. (1998) as altas concentrações de agentes crioprotetores produzem efeitos potencialmente tóxicos especialmente quando expostos por um tempo prolongado. Esse efeito é também termodependente (SCHNEIDER & MAZUR, 1984; RAIL, 1987). De acordo com Arav et al. (2002) a toxicidade as altas concentrações de crioprotetores é tamanha que as células somente podem ser expostas a essas soluções por um curto período de tempo e/ou a um volume mínimo da mesma. Portanto, a otimização da exposição ao tempo e a temperatura prévia a vitrificação podem reduzir o potencial efeito danoso dos crioprotetores, fornecendo dessa forma, uma melhor criosobrevivência (AGCA et al., 1998).

Comparações diretas entre congelação lenta e vitrificação demonstram diferentes resultados, mas tem-se observado que o procedimento de vitrificação é mais apropriado para os embriões produzidos *in vitro* (DYNNEŚ, 1996). Segundo Vajta et al. (1998); Berthelot et al. (2000) e Martinez et al. (2006), apesar da congelação lenta continuar sendo a técnica mais largamente usada na criopreservação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* na última década, a vitrificação tem sido testada em diferentes espécies com bons resultados, sendo considerada por Campos-Chillón et al. (2006) uma alternativa econômica e com potencial aplicação rotineira na prática laboratorial. De acordo com Garcia et al. (2005), embora a vitrificação seja objeto de inúmeras pesquisas, ainda não tem sido adotada amplamente na prática comercial.

2.3. Estratégias de pesquisa

Grande parte dos esforços, objetivando uma maior taxa de sobrevivência de embriões criopreservados, estão direcionados principalmente na melhoria das condições de cultivo e na modificação ou aprimoramento das tecnologias de criopreservação (CHO et al., 2002; IMAI et al., 2002).

A composição dos meios de cultivo é em grande parte mais empírica do que propriamente baseada no conhecimento preciso dos requerimentos embrionário (RIZOS et al., 2008).

O período de cultivo embrionário, compreendido pelos períodos pós-fertilização e pré-implantação, requer um ambiente adequado no qual o embrião recém formado possa realizar as clivagens, resultando na formação do blastocisto (THOMPSON, 1997; RIZOS et al., 2002; LONERGAN, 2007). Sendo assim, qualquer modificação no ambiente de cultivo, pode afetar alguns ou todos os processos do desenvolvimento embrionário, influenciando diretamente a qualidade dos embriões (RIZOS et al., 2008).

Para se ter uma idéia da influência do meio de cultivo sobre a qualidade do embrião, Galli e Lazzari (1996), Enright et al. (2000) e Rizo et al. (2002) demonstraram que cultivando embriões bovino PIV, em oviduto de ovelhas, é possível aumentar drasticamente sua criotolerância a um nível similar aos embriões produzidos totalmente *in vivo*.

Dentre as propostas dos novos estudos envolvendo o ambiente de cultivo está a remoção e substituição do FBS, em razão dessa substância ser considerada responsável por alterações embrionárias (MCEVOY et al., 2001; RIZOS et al., 2003) como já citadas anteriormente e também devido aos riscos sanitários oferecidos por ser de origem animal (LE TALLEC et al., 2001; HASLER, 2003; STRINGFELLOW et al., 2004).

A adição de macromoléculas e suplementos no meio de maturação (MINGOTI et al., 2002; CASTRO et al., 2003), a utilização de inibidores da maturação nuclear (BARRETO et al., 2003), o efeito de co-

cultivo (ANCIOTO et al., 2004) são exemplos de outras linhas de pesquisas desenvolvidas.

Em relação à modificação e aprimoramento dos métodos de criopreservação, um dos focos dos estudos concentra-se na identificação da composição ideal de soluções de vitrificação, visando aumentar a eficiência desse procedimento (KULESHOVA et al., 1999). A adição de macromoléculas e açúcares às soluções de vitrificação e a combinação de crioprotetores são exemplos de modificações na tentativa de minimizar a toxicidade dessas soluções (NICACIO et al., 2006)

Outra variável estudada é a taxa de resfriamento, que também tem sido modificada constantemente para contornar a sensibilidade térmica de oócitos e embriões (PUGH et al., 2000).

Diferentes ferramentas são aplicadas à vitrificação visando minimizar o volume e submergir rapidamente a amostra no interior do nitrogênio líquido, como: grades de microscopia eletrônica de transmissão (MARTINO et al., 1996), *open pulled straw* (OPS) (VAJTA et al., 1998), *cryoloops* (FUCHINOUE et al., 2004), *cryotops* e *cryotips* (KUWAYAMA et al., 2005).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da PIV de embriões bovinos no Brasil ter alcançado nos últimos anos números expressivos, esse cenário ainda poderia ser melhorado imensamente com a consolidação da criopreservação desses embriões. Contudo, a criopreservação de embriões PIV protagoniza hoje como a principal barreira à utilização maximizada dessa biotecnologia, limitando assim a sua completa expansão.

Quanto aos entraves relacionados à criopreservação de embriões PIV, diversos trabalhos tem sido desenvolvidos no sentido de buscar um meio de cultivo que forneça de maneira adequada os requerimentos

necessários ao desenvolvimento embrionário, refletindo favoravelmente na sua tolerância durante e na capacidade de sobrevivência após o processo de criopreservação. Outra linha de pesquisa visa melhorar a eficiência dos métodos de criopreservação através do aprimoramento dos já existentes e do desenvolvimento de outros novos. Até o momento, a vitrificação tem demonstrado ser o procedimento mais adequado devido aos melhores resultados apresentados, no entanto, ainda há a necessidade de padronização de um protocolo eficiente que possibilite o seu maior emprego na prática comercial.

4. REFERÊNCIAS

- 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. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.57–66, 2002.
- AGCA Y, MONSON RL, NORTHEY DL, MAZNI OA, RUTLEDGE JJ. Post-thaw survival and pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification. **Theriogenology**, v.41, p.154, 1994.
- AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; ABAS MAZNI, O.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v.50, p.147–162, 1998.
- ANCIOTO, K.L.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Influência das células do *cumulus* e do meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência do desenvolvimento embrionário. **Acta Sci Vet**, v.32, supl., p.114, 2004.

ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol Cell Endocrinol**, v.187, p.77–81, 2002.

BARRETTO, L.S.S.; CASTRO, V.S.D.C.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Efeito de inibidores da maturação nuclear sobre a maturação citoplasmática de oócitos bovinos. **Acta Sci Vet**, v.31, supl., p.242-243, 2003.

BERTHELOT, F. ; MARINAT-BOTTE, F. ; LOCATELLI, A. ; PERREAU, C. ; TERQUI, M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. **Cryobiology**, v.41, p.116–124, 2000.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. **Biol Reprod**, v.61, p.1050–1055, 1999.

CAMPOS-CHILLÒN, L.F.; WALKER, D.J., TORRE-SANCHEZ, de la J.F.; SEIDEL Jr, G.E. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v.65, p.1200-1214, 2006.

CASTRO, V.S.D.C.; BARRETTO, L.S.S.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos bovinos. **Acta Sci Vet**, v.31, supl., p.272-273, 2003.

CHO, S.K.; CHO, S.G.; BAE, I.H.; PARK, C.S.; KONG, I.K. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produces bovine blastocysts vitrified by glass micropipette. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.151-158, 2002.

CROSIER; A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol Reprod**, v.62, p.1459–1465, 2000.

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*. **Biol Reprod**, v.64, p.1375–1385, 2001.

DAMIANI, P.; WALSTRA, M.; KROPP, B.; BELLOW, M.; LOONEY, C. R.; DUBY R. T. *In vitro* development and pregnancy rates of bovine embryos cocultured with buffalo rat liver cells in serum free medium. **Theriogenology** v.47, p.363, 1997.

DUBY, 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.

DYNNE'S, A.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MASSIP, A.; MERMILLOD, P. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. **Theriogenology**, v.46, p.1425–39, 1996.

ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659-673, 2000.

FAHY, G.M.; MCFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology** v.21, p.407–26, 1984.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186–195, 2001.

FARIN, P.W., FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biol. Reprod.**, v.52, p.676–682, 1995.

FARIN, P.W.; CROSIER, A.E. ; FARIN, C.E.. INFLUENCE OF *IN VITRO* SYSTEMS ON EMBRYO SURVIVAL and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, p.151–70, 2001.

FUCHINOUE, K.; FUKUNAGA, N.; CHIBA, S.; NAKAJO, Y.; YAGI, A.; KYONO, K. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. **J Assist Reprod Genet**, v.21, p.307–309, 2004

FUKU, E.;KOJIMA, T.; SHIOYA,Y.; MARCUS, G.J.; DOWNEY, B.R. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v.29, p.485–492, 1992.

GALLI, C. & LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. *In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada*, 1, 2005, Londrina, PR. *Biotecnologia da reprodução em bovinos*. Londrina, PR: UEL, p.201, 2005.

GEORGE, F. ; VRANCKEN, A, M.; VERHAEGHE, A, B.; VERHOEYE, A, F.; SCHNEIDER, B, Y-J.; MASSIP, B, A.; DONNAY, I. Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones, 2006.

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

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v.79, p.245–264, 2003.

HOCHI, S.; SEMPLE, E.; LEIBO, S.P. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos.

Theriogenology, v.46, p.837–47, 1996.

IMAI, K. ; MATOBA, S. ; DOCHI, O. ; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance *in vitro* produced bovine embryo. **J. Vet. Med. Sci.**, v.64, p.887–891, 2002.

KASAI, M.; ITO, K.; EDASHIGE, K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury.

Hum Reprod v.17, p.1863–74, 2002.

KAJIHARA, Y.; KOMETANI, N.; SHITANAKA, Y.; SAITO, S.; YAMAGUCHI, Y.; HISHIYAMA, K.; ENDO, M. Pregnancy rates and birth after the direct transfer of frozen-thawed bovine IVF embryos.

Theriogenology, v.37, p. 233, 1992.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biol Reprod**, v.62, p.847–856, 2000a.

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, 2000b.

KON, I.K.; LEE, S.I.; CHO, S.G.; CHO ,S.K.; PARK, C.S. Comparison of open pulled straw vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1817–26, 2000.

KULESHOVA, L.L.; MACFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O.; SHAW, J.M. 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.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol and 1,2-

propanediol using 2 step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v.31, p.415–22, 1994.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reprod Biomed Online**, v.11, p.608–614, 2005.

LE TALLEC, B.; PONSART, C.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B. . Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.41, p.439–450, 2001

LEIBO SP, LOSKUTOFF NM. Cryobiology of in-vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.

LEROY, J.L.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOMA. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reprod Domest Anim**, v.40, p.76–78, 2005.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A.M.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v.126, p.337–346, 2003a.

MARTINEZ, A.G.; VALCÁCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos. **Small Rum Res**, v.63, p.288–296, 2006

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

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

MASSIP, A. LEIBO, S.P.. Factors influencing cryopreservation of domestic animal embryos. In: Van Soom A, Boerjan M, editors. Assessement of mammalian embryo quality: invasive and non invasive techniques. Dordrecht, **The Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, p. 121–33, 2002.

MCEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE, J.A.; SINCLAIR, K.D. Feed and forage toxicants affecting embryo survival and fetal development. **Theriogenology**, v.55, p.113–129, 2001.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A.M.. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocytecomplexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. **Anim Reprod Sci**, v.69, p.175- 186, 2002.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBEIRIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, p.1551–1562, 2006.

NEDAMBALE, T.L.; DINNYÉS, A.; GROEN, J.R.; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.62 p.437–449, 2004.

NICACIO, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; CAETANO, H. V. A.; GERGER, R. P. C.; MARQUES, M. G.; MELLO, M. R. B.; MENDES, C. M.; MILAZZOTTO, M. P.; OLIVEIRA, V. P.; SIMÕES, R.; YAMADA, C.; VISINTIN, J. A. Criopreservação e desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 51-56, 2006.

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

NIEMANN, H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived *in vitro* and *in vivo*. In “Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategies” (G. Enne, G. F. Greppi, and A. Lauria, Eds.), 15 Symposium Int. Di Zootecnica, pp. 117– 128, Elsevier, Biofutur, 1995.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). ***Anim Reprod Sci.***, v.98, p.293–301, 2007.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation Cell Tissue Banking v.9, p.267–277, 2008.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. ***Theriogenology***, v.41, p.101–107, 1994.

PUGH, P. A.; TERVIT, H. R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in strawdilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. ***Animal Reproduction Science***, v. 58, n. 1, p. 9-22, 2000.

RAIL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. ***Nature***, pp.313:573-575, 1985.

RAIL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. ***Cryobiology***, v.24, p.387-402, 1987.

RALL, W.G. Cryopreservation of oocytes and embryos methods and applications. ***Anim Reprod Sci***, v.28 p.237–245, 1992.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1–16, 2001.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCIA, R.; PINTADOB, DE LA FUENTE, J.; GUTIERREZ-ADAN, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biol Reprod**, v.66, p.589–595, 2002a.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, 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, 2002b.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol Reprod**, v.68, p. 236–243, 2003.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *In vitro* Culture Conditions on Embryo Development and Quality. **Reprod Dom Anim**, v.43 (Suppl. 4), p.44–50, 2008.

SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228–235, 2006.

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

SLIMANE, W.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; HUMBLLOT, P.; RENARD, J.P. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine *in vitro*-

fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. **Biol Reprod**, v.62, p.628–635, 2000.

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

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.; WALDROP, J.G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reprod. Fertil. Dev.** v.16, p.93–102, 2004.

THIBIER, M. Transfers of both *in vivo*-derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. IETS Embryo Transfer Newsletter, v.24, p.11–9, 2006.

THOMPSON, J.G. ; GARDNER, D.K. ; PUGH, P.A. ; MCMILLAN, W.H. ; TERVIT, E.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilised during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biol Reprod**, v.53, p.1385–91, 1995.

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

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J.L.; CALLESEN, H.; THOMSEN, P.D. A high proportion of bovine blastocysts produced *in vitro* are mixoploid. **Biol Reprod**, v.60, p.1273–1278, 1999.

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

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSWE, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reprod Fertil Dev**, v.17, p.23–35, 2005.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v.68, S77–83, 2007.