UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS EM ESTÁGIO DE BLASTOCISTO EM MEIO SEQUENCIAL, APÓS MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS "*IN VITRO*" DE NOVILHAS E VACAS VELHAS. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAMENTO LENTO COMPUTADORIZADO E ULTRA-RÁPIDO

JANE PORFÍRIO ROCHA

GOIÂNIA-GO

2004

JANE PORFÍRIO ROCHA

CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS EM ESTÁGIO DE BLASTOCISTO EM MEIO SEQUENCIAL, APÓS MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO DE OÓCITOS "*IN VITRO*" DE NOVILHAS E VACAS VELHAS. COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE CONGELAMENTO LENTO COMPUTADORIZADO E ULTRA-RÁPIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Fisiologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Eduardo Freneau

GOIÂNIA-GO

2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo pelo apoio e paciência, a meus filhos pela compreensão da minha ausência e a Deus que sempre está presente em minha vida.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Goiás e à Coordenação de apoio à pesquisa de ensino superior.

Ao Professor Dr. Tomás de Aquino Portes e Castro, Coordenador do curso de pós-graduação, pelo incentivo, amizade e orientação da dissertação.

Ao Professor Dr. Gustavo Eduardo Freneau, pela paciência, pelo convívio, pela confiança, amizade e pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Professora Dra. Maria Clorinda Soares Fioravante, pelo apoio inicial e amizade.

Aos demais Professores do curso de Mestrado de Biologia do ICB/UFGo.

Ao Professor Dr. Jaison Pereira de Oliveira pela elaboração e análise estatística dos dados.

Ao Dr. Marcos Messala, Diretor do Centro de Reprodução Assistida de Fêmina Maternidade, por ter cedido o laboratório para os experimentos.

Ao Frigorífico Goiás Carnes, pela concessão de parte do material estudado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS VI
LISTA DE TABELAS VII
RESUMO VIII
ABSTRACT IX
1 INTRODUÇÃO 7
2 MATERIAIS E MÉTODOS 10
2.1 COLETA DE OVÁRIOS E ASPIRAÇÃO FOLICULAR 10
2.2 MATURAÇÃO DOS OÓCITOS 10
2.3 LAVAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES 11
2.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* 11
2.5 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO 13
2.6 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO LENTO OU CONTROLADO 14
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA 15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 18
4 CONCLUSÃO 24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – O gráfico mostra as frequências dos estágios de maturação oocitária, maturação, fertilização e formação de blastocisto em vacas velhas, novas e o total (1-Oócito estágio VG; 2- Oócito estágio MI; 3- Oócito estágio MII; 4- Oócito fecundado; 5 Oócito fecundado com divisão celular; 7- Taxa de maturação; 8- Taxa de fertilização; 9-Taxa de formação de blastocisto) em oócitos bovinos, coletados em um frigorífico de Goiânia. 18

FIGURA 2 – O gráfico mostra o congelamento dos blastocisto pela técnica de congelamento ultra-rápido, usando o DMSO como crioprotetor (CE – congelamento dos embriões; DV – Descongelados viáveis; REB – Re-expansão dos blastocistos; HE – *Hatching* espontâneo). 20

FIGURA 3 – Relativa do congelamento dos blastocisto pelo método de congelamento lento computadorizado, usando como crioprotetor o glicerol (CE – congelamento dos embriões; DV – Descongelamento com células viáveis; REB – Re expansão de blastocisto; HE – *Hatching* espontâneo). 21

FIGURA 4 – O diagrama mostra o resultado total do congelamento com DMSO e Glicerol (1 – Embriões congelados; 2 – Taxa de sobrevida após descongelamento; 3 – Embriões viáveis após descongelamento; 4 – Re-expansão dos blastocistos; 5 – *Hatching* espontâneo). 22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Análise comparativa entre método de criopreservação (DMSO e Glicerol) de oócitos de bovinos, na fase de blastocisto, coletados em frigorífico de Goiânia. 22

RESUMO

Estudou-se neste trabalho a maturação de oócitos *in vitro*, coletados de ovários obtidos em abatedouro, sem qualquer tipo e estimulação hormonal, comparando estes dados em seus diferentes estágios de maturação entre novilhas e vacas velhas. O meio de cultura utilizado para a maturação foi o *In Vitro Fertilization* (Scandinavian IVF Science AB. Sweden), onde se observou resultados similares para as duas idades, apresentando uma correlação significativa ($r = 0,9991$ e $p < 0,0001$) para os estágios de maturação, apesar da taxa de maturação para as vacas novas se apresentarem melhores 50,5%, e para as vacas velhas de 31,3%, não houve diferença estatística. O mesmo se repete para a taxa de fertilização de 98,1% para vacas novas e 86% para vacas velhas. Para a taxa de formação de blastocisto, 17,14% para vacas velhas e 22,58% para vacas novas. Foram testados dois tipos de criopreservação para embriões em estágio de blastocisto, o congelamento ultra-rápido, usando o crioprotetor dimetil-sufóxido (DMSO), e o congelamento lento computadorizado com criocâmara - Australiana, usando glicerol como crioprotetor. Os embriões das vacas novas pelo DMSO apresentaram uma taxa de sobrevida de 14% e com glicerol de 73%, e para as vacas velhas foram de 31% com DMSO e 63% com glicerol. As taxas de reidratação de re-expansão do blastocisto pós-descongelamento foram de 15% com 15% com DMSO e 38% com glicerol para vacas velhas e 14% com DMSO e 55% com glicerol para vacas novas. O *Hatching* espontâneo foi observado apenas para os embriões descongelados do congelamento com glicerol para vacas novas. No calculo estatístico houve significância entre os resultados de sobrevida, para o total de embriões congelados e descongelados, entre os métodos de congelamento lento e o ultra-rápido método de criopreservação lento, usando o glicerol como crioprotetor.

Palavras-Chave:
Criopreservação, espermatozoides, fecundação, ovários, reprodução.

ABSTRACT

Studied in this work maturation in vitro oocytes collected from ovaries obtained from a slaughterhouse, without any hormonal stimulation and, comparing these data at different stages of maturation between heifers and old cows. The culture medium used for maturation was the In Vitro Fertilization (Scandinavian IVF Science AB. Sweden), where similar results were observed for the two age, presenting a significant correlation ($r = 0.9991$ and $p < 0.0001$) for stages of maturation, despite the maturing rate for new cows have better 50.5%, and for the old cows of 31.3%, there was no statistical difference. The same is repeated for the fertilization of young cows to 98.1% and 86% for old cows. For the blastocyst formation rate, 17.14% to 22.58% and old cows to young cows. We tested two types of cryopreservation for embryos in the blastocyst stage, the ultra-fast freezing, using dimethyl sulfoxide-cryoprotector (DMSO), and the computerized slow freezing with cryo chambers - Australian, using glycerol as cryoprotector. Embryos at the new cows DMSO showed a 14% survival rate and 73% glycerol, and the old cows were 31% DMSO and 63% glycerol. The rehydration rate of re-expansion of blastocysts after thawing was 15% with 15% DMSO and 38% glycerol for old cows and 14% DMSO and 55% glycerol for new cows. Spontaneous Hatching was observed only for the embryos thawed freezing with glycerol for young cows. In the statistical calculation was no significance between the results of survival, to total frozen and thawed embryos, between the slow freezing methods and the ultra-fast slow cryopreservation method using glycerol as a cryoprotector.

Keywords:
Cryopreservation, sperm, fertilization, ovary, reproduction.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de fecundação *in vitro* (FIV) têm sido desenvolvidas e aprimoradas devido às inúmeras aplicações, conforme evidencias fornecidas por Buttler e Biggers[1]. Dentre elas, destaca-se a maturação de oócitos bovinos, a fecundação desses *in vitro* e a utilização de embriões criopreservados, visando à produção de animais de elevado valor genético ou à preservação de animais em extinção. Outra aplicação seria a diminuição do intervalo entre gerações, que possibilitaria maior avanço e rapidez nos trabalhos de melhoramento genético. Consequentemente, são animadoras as possibilidades de utilização de embriões bovinos[2].

A maturação de oócito *in vitro* tem sido estudada em diferentes espécies de mamíferos, aplicado à comercialização, tais como o melhoramento da fertilidade em bovinos, com indução hormonal e transferência de embrião[3]. E ainda para resultados de desenvolvimento embrionário com fertilização *in vitro*[4].

De acordo com os mecanismos biológicos naturais na reprodução, no final do processo ovulatório, observamos o crescimento de um folículo dominante contendo um óvulo, sendo que este passou por várias fases que são essenciais para o óvulo se tornar competente para a fecundação, quando finalmente, estará apto à fecundação e o desenvolvimento do embrião[5]. A coleta de ovários em abatedourosproporciona uma maior quantidade de oócitos, porém, a heterogeneidade destes oócitos proporciona a uma capacidade subotima na produção de embrião comparado à situação natural[6].

Embriões bovinos derivados de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultura de oócitos podem ser usados para produção animal e outras propostas na biotecnologia. Sendo que economicamente, o uso da tecnologia pode interferir na influência da sazionalidade na reprodução animal[7].

Hiroyoshi[8], 2003, cita em seu trabalho a importância do tipo de meio de cultura usado para a maturação oocitária, contudo, Tesarik e Mendoza[9] apresentam em seus estudos que. para melhorar a taxa de maturação de oócitos, a adição de estradiol no meio de cultura pode ter influência direta na qualidade desse oócito, tendo este hormônio um receptor direto no RNAm, também sugerido por Wu et al.[10].

Estudos indicam que a baixa fertilidade dos oócitos maturados *in vitro* se deve à competência do citoplasma, indicando cinco fatores importantes para a avaliação

oocitária: morfologia do cumulus, tamanho folicular, aspecto do folículo, a estimulação ovariana e os procedimentos do manuseio (incluindo a aspiração folicular) antes da incubação[11, 12].

Há indícios de melhora na implantação de embriões em estágio de blastocisto desenvolvidos pelas técnicas de FIV[13,14]. A qualidade e desenvolvimento *in vitro* do blastocisto são determinados pelo sistema de cultura utilizado, podendo obter blastocistos a partir de meios como Earle's, Ham's F-10 ou MEM, como mostra os trabalhos de Scholtes e Zeilmaker[4], e Noda et al.[15]. Resultados encontrados com co-cultura também são satisfatórios[16]. Entretanto, a cultura em meio sequencial vem apresentando vantagens sobre a co-cultura em camadas de células, pois o risco de introduzir um contaminante patógeno aos embriões é bem menor[17].

A criopreservação de embriões tem mostrado considerável evolução desde o primeiro sucesso relatado por Trouson e Mohr[18], quando os autores congelaram embriões de 3 e 8 células com dimetil-sufóxido (DMSO). Posteriormente, métodos de criopreservação foram desenvolvidos para o congelamento de zigotos usando propanodiol como crioprotetor, e para o congelamento de blastocisto com glicerol. Entretanto, a maioria destas técnicas de criopreservação envolvem congelamento lento, que requer uso de equipamentos caros[19,20,21].

Tem aumentado a procura por criopreservação de embriões de mamíferos dentro da reprodução assistida em animais domésticos, especialmente em bovinos, tanto para melhoramento genético como para comercialização[22]. As técnicas de criopreservação têm sido melhoradas com o avanço dos estudos em congelamento convencional ou vitrificação[23,24,25].

Várias soluções têm sido usadas para a cripresevação de embriões de mamíferos: DMSO, 1,2-propanediol, propileno glicol e glicerol são os crioprotetores mais usados[26,27]. Kennedy et al.[28] sugerem que o sucesso do crioprotetor para o congelamento da qualidade da membrana celular do embrião, da velocidade de difusão desse crioprotetor na célula, é, em parte, em função do tamanho celular. O Crioprotetor como o 1,2-propanediol é usado para células com baixo peso molecular (76 mw). Já o glicerol é usado para o congelamento de células com alto peso molecular (92 mw), sendo este um dos mais escolhidos para o congelamento de blastocistos[25].

O objetivo deste trabalho foi comparar a maturação oocitária e taxa de sucesso do cultivo tardio, estágio de blastócito, de embriões bovinos produzidos *in*

vitro, em meio sequencial entre novilhas e vacas velhas. Avaliar os resultados de sobrevida na criopreservação destes blastocistos, com o método de congelamento ultra-rápido, usando o crioprotetor DMSO, e o congelamento lento computadorizado na Criocâmara – Freezer Control CL – 8000 – Cryologic, Austrália, usando como crioprotetor o glicerol.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DE OVÁRIOS E ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Foram utilizados oócitos aspirados de ovários de fêmeas mestiças, coletados em matadouro após o imediato sacrifício das vacas. Estes, no momento da coleta, foram identificados, de acordo com informação cedida pelo frigorífico, se eram de novilhas ou vacas velhas. Em seguida, foram transportados para o laboratório (Centro de Reprodução Assistida Fêmina Maternidade – Goiânia GO), em frascos de plástico contendo solução fisiológica (0.9% NaCl), acrescidas de antibiótico (0,l g/ml de gentamicina), entre 25 e 30°C, por um período de aproximadamente uma hora e trinta minutos[24,29].

Todos os folículos visíveis foram aspirados com agulhas 25 x 7, adaptadas a seringas de l0 ml, e o conteúdo aspirado, identificados no estereomicroscópio – *Nikon SMZ 2T*. Foram depositados em placas de petri de 60 x 30 contendo a solução Phosphate Buffered Saline (PBS) – *Irvine Scientific*, mantidas em placa aquecedora a 37°C para a classificação dos oócitos[30,31]. Em seguida à identificação, estes oócitos foram colocados imediatamente na incubadora a 37 °C, a 5% de CO2, umidade de 90%.

2.2 MATURAÇÃO DOS OÓCITOS

Os oócitos considerados viáveis são os que apresentaram células do *cumulus oophorus* compacto, com no mínimo três camadas de células e citoplasma homogêneo[2,32].

Posteriormente, os oócitos selecionados foram lavados por duas vezes em solução PBS, meio aquecido previamente em incubadora a 37 °C, a 5% CO2 com umidade de 90%, por aproximadamente três horas. Estes oócitos, após lavagem, foram depositados dois a dois em microgotas de 100µl de solução PBS, suplementada com Soro Sintético (SS) a 10%, numeradas e mantidas nesta incubadora por 22 a 24 horas, em placas de Petri 60x60 sob óleo mineral (Ovoil-100, Vitrolife), evitando a alteração do ph e osmoláridade com a evaporação do meio, para melhor identificação dos mesmos durante a maturação[2,33].

Foram coletados 432 oócitos de 50 ovários, sendo que 220 oócitos foram de vacas velhas, 212 oócitos de novilhas. Os estágios de maturação dos oócitos eram: para as novilhas – 185 em estado de vesícula germinativa (VG), 27 em metáfase I (MI), não sendo encontrado oócitos em metáfase II (MII). E para as vacas velhas – 166 em VG, 38 em MI, 16 em MII.

A maturação *in vitro* foi realizada também em placas de Petri 60 x 60 mantendo as microgotas de meio IVF numeradas sob óleo mineral, para melhor identificação dos oócitos, em incubadora à temperatura de 37 °C, com 5% de CO2 e 90% de umidade por 24 horas, quando foi realizada a inseminação[12,24,33]. Foram maturados *in vitro* 88 oócitos das novilhas e 64 das vacas velhas, os quais foram levados à fecundação *in vitro*.

2.3 LAVAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES

Para a fecundação *in vitro* utilizou-se sêmen congelado e descongelado de um único touro da raça Limosine. As concentrações espermáticas utilizadas para a fecundação foram de 200 a 400 mil espermatozoides móveis por ml e os períodos de incubação 12 a 18 horas[34]. O sémen foi descongelado em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e colocado em 1,0 ml de meio PBS, em tubo com tampa, centrifugado em centrífuga – *Fanem* por 15 minutos a 500g, o sobrenadante foi desprezado, nova solução PBS – 0.5 ml, foi depositado em cima do sedimento e levado à mesma incubadora acima citada[25]. Ao término de uma hora, tempo em que ocorreu a migração dos espermatozoides para esta camada de meio acima do mesmo, este processo e chamado de *swim up*[2,35,36]. Antes do *swim up* e após a centrifugação, foram realizadas contagens dos espermatozoides e avaliação da motilidade.

2.4 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100µl de meio IVF (Vitrolife-Scandinavian) cobertas com óleo mineral nas mesmas condições da maturação, por período de 12 a 18 horas após inseminação[2,35,37].

Depois do período em que se colocou os espermatozoides com os oócitos, os zigotos foram avaliados quanto à fecundação e recolocados em novas gotas de

meio IVF suplementada com 10% de SS, nas mesmas condições acima citada, em gotas de 100µl cobertas com óleo mineral, na mesma incubadora durante 72 horas após fecundação para avaliar a clivagem[38,39].

Considerou-se penetração quando os oócitos apresentaram dois pronúcleos ou após 24 horas da fecundação apresentaram clivagem celular[40].

Os embriões formados após a fecundação foram sendo avaliados, ao microscópio de lente invertida – *Nikon Diaphot 300*, segundo a qualidade e o estádio de desenvolvimento, descritos abaixo[28,41,42]. Sendo que após o terceiro dia todos os embriões foram transferidos para o meio de cultura específico para blastocisto (vitrolife)[43].

Foram utilizados cinco estádios de desenvolvimento: estádio 1 (mórula: aglomerado celular em cuja superfície blastómeros individuais podem ser distinguidos); estádio 2 (mórula compacta: blastômeros individuais não podem ser distinguidos na superfície do embrião); estádio 3 (blastocisto inicial: uma pequena cavidade, a blastocele, está visível e a massa celular interna começa a se formar); estádio 4 (blastocisto: o embrião ocupa a maior parte dentro da zona pelúcida, a massa celular interna começa a tornar-se mais distinta mas o diâmetro global do embrião, incluindo a zona pelúcida, permanece inalterado); e estádio 5 (blastocisto expandido: o diâmetro embrionário está aumentado e a espessura da zona pelúcida pode ser reduzida para aproximadamente 1/3 da espessura original)[35].

Os embriões foram mantidos em meio de cultivo para blastocisto até o oitavo dia pós-inseminação em incubadora com 5% de CO2, 90% de umidade a 37 °C[44]. Com 8 dias os embriões clivados chegaram a blastocisto, neste momento foram divididos aleatoriamente, de forma simples 18 para as novilhas e 21 para vacas velhas, onde foram submetidos aos processos de congelamento pelos 2 métodos: congelamento ultra-rápido, onde as paletas são colocadas diretamente no nitrogênio líquido, e o congelamento lento controlado computadorizado, usando criocâmara – freezer control (CL – 8000 – Cryologic, Austrália).

Foram utilizados dois crioprotetores no presente estudo: o dimetil-sulfóxido – DMSO – para o congelamento ultra-rápido e o glicerol para o congelamento lento na Criocâmara. Os ovários de cada coleta foram divididos aleatoriamente em números iguais para os dois tipos de congelamento, sendo que os oócitos e embriões formados destes, congelados pelos seus respectivos protocolos determinados no momento da divisão dos ovários por tratamento,

2.5 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO

O método de congelamento ultra-rápido utilizado foi com o crioprotetor dimetil-sulfóxido – DMSO 3,0 M (Sigma, St. Lous) e sacarose 0,25 M[21,45,46,47,48,49,50]. Inicialmente foram preparadas duas soluções: I – solução de cultura (SC), composta de meio de cultura IVF – 50 (Scandinavian IVF Science AB. Sweden), com 20% de soro sintético (Irvine); II – solução de DMSO, constituída de 3,935 ml de SC e DMSO (14,079M), no volume de 1.065 ml. Em seguida, preparou-se solução de congelamento (SCo) onde a concentração de sacarose (0,427g) foi adicionada ao volume final de 5,0 ml de solução de DMSO. A SCo possui DMSO 3,0M e sacarose 0,25M, foi filtrada através de membrana 0,22 µm, gaseificada com 5 % de CO2, 90% de umidade a 37 °C, por um período de uma a duas horas, e mantida à temperatura de 4 °C por período mínimo de 24 e máxima de 72 horas.

No procedimento de congelamento, 7 blastocistos de novilhas e 13 de vacas velhas, foram transferidos da SC à temperatura de 37 °C para a ACo em temperatura ambiente, introduzidos em paletas identificadas, que foram seladas de um lado com uma pinça aquecida no fogo, e na outra extremidade por algodão embebido pela SCo na temperatura ambiente. Estas paletas contendo os blastocistos foram colocadas no vapor, a 10 centímetros do nitrogênio líquido (NL_2), sendo em seguida mergulhados diretamente neste mesmo NL_2 à temperatura de -196 °C.

No procedimento de descongelamento, prepara-se solução de descongelamento (SD) com 0,4278g de sacarose a qual é diluída com SC para volume final de 5,0 ml, no dia do descongelamento. A SD possui 0,25M de sacarose, é filtrada através de membrana com 0,22, gaseificada com 5 % de CO2, 90% de umidade a 37°C, após a gaseificação esta solução foi mantida em temperatura ambiente, antes do congelamento.

As paletas contendo os embriões congelados são retiradas do N2L, mergu1hadas em banho-maria à 37°C, por seis segundos; depois de enxutas, corta-se urna de suas extremidades, e os embriões colocados na SD pelo período de dez minutos em temperatura ambiente. Os embriões sobreviventes são transferidos da SC à temperatura ambiente para solução a 37°C, em atmosfera de 5% CO2, e logo em seguida para o meio blastocisto, por período mínimo de 60 minutos, após este

período os embriões foram analisados e classificados de acordo com o descrito acima. Nova avaliação é feita após 24 horas, momento em que a re-expansão do blastocisto foi determinada e o *hatching* observado.

2.6 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO LENTO OU CONTROLADO

No método de congelamento lento o crioprotetor utilizado foi o glicerol (Sigma G-5516). Para a criopreservação foram preparadas três soluções: 1 – Meio crioprotetor (MC): contendo PBS suplementado com 10% de SS; 2 – Solução I: contendo 9,5 ml de MC mais 0,5 de glicerol; 3 – Solução 2: contendo 9,1 ml de MC mais 0,9 ml de glicerol mais 0,69g de sacarose[51,52].

Após o preparo destas soluções, e a gaseificação das mesmas na incubadora a 37°C, a 5% de CO2, com 90% de umidade por um período de 12 horas, esses mesmos meios foram colocados à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, quando então se efetuaram os banhos dos blastocistos, 11 das novilhas e 8 das vacas velhas, nestas soluções, num volume de 1 ml de MC colocados na placa de poço central 60x30 por 10 minutos, passando por mais duas placas de cultura contendo as soluções 1 e 2[33].

Em seguida esses embriões foram colocados em paletas estéreis, devidamente identificadas, com no máximo dois embriões por paleta, e colocadas na Criocâmara (CL – 8000 – Cryologic, Austrália) programada para o congelamento com a curva de -1°C/min iniciando o congelamento a 20°C para -7°C e depois a -90°C, quando foram removidos da Criocâmara – CL – 8000 e submergidos no nitrogênio líquido.

Quando a curva de congelamento alcançou a temperatura de -7°C foi induzida à cristalização, formação de cristais de gelo, o chamado *seeding*, foi realizado manualmente depois de 30 segundos do inicio do programa de congelamento[53]. Este *seeding*, consiste em segurar à paleta, contendo o embrião, com uma pinça e com outra pinça toca no menisco superior provocando a cristalização imediata do material no interior da paleta. Após o *seeding*, os embriões foram congelados lentamente de -7°C até -90°C com uma média de -0,3°C/min e então colocados no nitrogênio líquido. Os blastocistos foram mantidos a -196°C dentro do nitrogênio líquido até o momento do descongelamento.

Para o descongelamento, as paletas contendo os blastocistos foram retiradas do nitrogênio líquido e colocadas em banho-maria a 37°C por 6 segundos[30]. Em sequência, as paletas foram cortadas em uma das extremidades, e os embriões depositados dentro das soluções preparadas previamente, ficando 30 segundos em cada uma delas, em temperatura ambiente. Após esse período foram transferidos para o meio blastocisto, mantidos na incubadora a 37°C, 5% CO2, quando foram analisados morfologicamente.

As soluções do descongelamento foram preparadas da seguinte forma:

a) glicose 6°/o com 0,3M de sacarose;
b) glicose 4,5% com 0,3M de sacarose
c) glicose 3% com 0,3M de sacarose;
d) glicose 1,5 % com 0,3M de sacarose;
e) 0,3M de sacarose;
f) 0,15M de sacarose;
g) meio PBS suplementado com 20% de SS.

Após submeter os embriões a esta série de diluições à temperatura ambiente, os mesmos foram transferidos para a diluição n° 7, porém equilibrada à temperatura de 37°C, 5% CO2. Logo em seguida, esses embriões foram transferidos para meio de blastocisto. Então foram analisados morfologicamente, sendo observado novamente após um período de 24 horas, momento em que a re-expansão do blastocisto foi determinada e o *hatching* espontâneo observado.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística, vários testes e modelos foram utilizados na estimativa dos parâmetros. Para as variáveis ovários coletados, oócitos identificados, oócitos estágio VG, oócitos estágio MI, oócitos estágio MII, oócitos fecundados com divisão celular e blastócito, foram analisados pela frequência relativa (%) da ocorrência, através da estatística descritiva[54,55,56].

A variável blastócito, foi submetida a dois tipos de criopreservação (DMSO e glicerol) entre vacas novas e valhas. Neste caso, a comparação entre os dois métodos foi através das variáveis congelamento, descongelamento, sobrevivência,

pós-descongelamento, re-expansão blastocisto e hatching espontâneo, procedimento esperado para o estágio embrionário de blastocisto. Na determinação do melhor método, utilizou-se o teste de Qui-quadrado e o teste exato de Fisher.

Para as comparações entre a criopreservação através do DMSO e glicerol no que se diz respeito a variável sobrevivência pós-descongelamento, re-expansão blastocisto utilizou-se o teste Qui-quadrado (X^2), onde o modelo matemático,

$$X^2 = \frac{(f_{o1} - f_{e1})^2}{f_{e1}} + \frac{(f_{o2} - f_{e2})^2}{f_{e2}} + \cdots + \frac{(f_{ok} - f_{ek})^2}{f_{ek}} = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

(f_0: frequência observada e f_e: frequência esperada), resulta na estatística $X^2_{calculado}$ que é comparado com um valor tabelado $(X^2.05(GL))$ ao nível ∝ de 5% [56].

No caso da variável re-expansão blastocisto entre vacas velhas e novas, devido ao valor zero na frequência observada, os pressupostos do teste Qui-quadrado (X^2) não foram atendidas. Neste caso, o melhor teste foi o teste exato de Fisher, onde o modelo matemático,

$$p = \frac{[(A+B)!\,(C+D)!\,(A+C)!\,(B+D)!]}{N!\,A!\,B!\,C!\,D!}$$

(A, B, C, D: são frequências observadas e N: total de observações) resulta na probabilidade p que expressa a distribuição dos comportamentos, vacas novas e velhas nos tratamentos testados, distribuírem igualmente[56].

Foi utilizado a correlação de Spearman onde o coeficiente de correlação é dado por,

$$r_s = 1 - \left(\frac{(6 \times S(d^2)}{(N^3 - N)}\right)$$

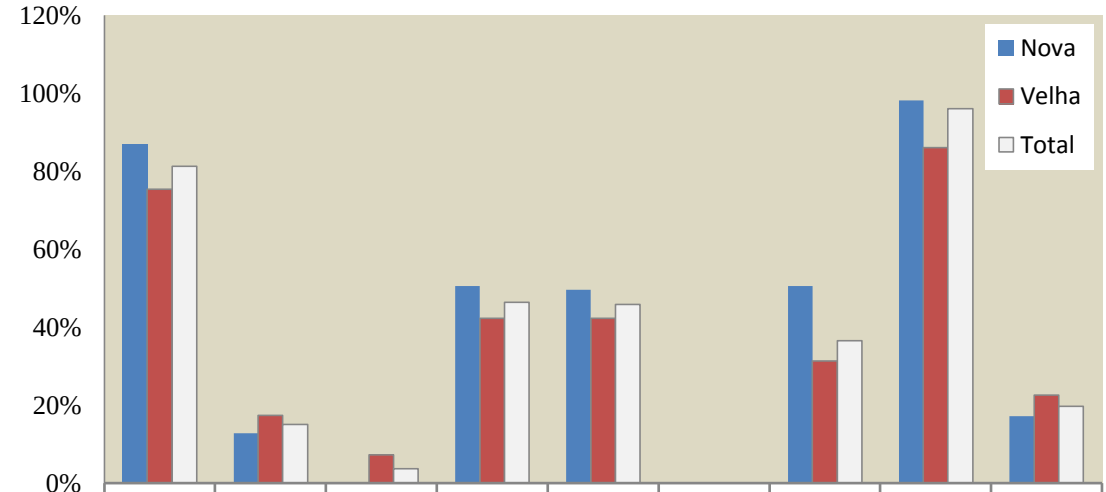
para a comparação entre novilhas e vacas velhas com relação as variáveis estágios de maturação, oócitos fecundados com divisão celular, formação de blastocisto e as variáveis taxa de maturação, taxa de fertilização e taxa de formação de blastocisto. Neste caso a significância é dada por,

$$t = r_S \left[\frac{(N-2)}{(1-r_s^2)}\right]^{\frac{1}{2}}$$

($S(d^2)$: é a soma dos desvios e N: é o número de observações).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito analisar a qualidade oocitária entre vacas velhas e novilhas (novas), bem como taxa de maturação, fertilização e formação de blastocisto, foi realizado um teste de correlação de *Spearman*. Pelo teste verifica-se que houve uma correlação significativa (r = 0,9991 e p < 0,0001) entre a idade das vacas, velhas e novas, que apesar da pré-maturação *in vivo* dos oócitos nas vacas velhas ser maior (7,27% de MII) do que das vacas novas (0% de MII); para os oócitos em estágio de MI e VG, de 17,27% e 75,45% para as vacas velhas e 12,74% e 87,26% para vacas novas, respectivamente, podemos observar que as taxas de maturação se apresentou, com resultados melhores para as vacas novas, com 50,50% e 31,30% para as vacas velhas (Figura 1).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nova	87%	12,74%	0%	50,48%	49,52%	0%	50,50%	98,10%	17,14%
Velha	75,40%	17,27%	7,27%	42,27%	42,27%	0%	31,30%	86,00%	22,58%
Total	81,20%	15,05%	3,70%	46,30%	45,83%	0,00%	36,50%	96,00%	19,70%

FIGURA 1 – O gráfico mostra as frequências dos estágios de maturação oocitária, maturação, fertilização e formação de blastocisto em vacas velhas, novas e o total (1-Oócito estágio VG; 2- Oócito estágio MI; 3- Oócito estágio MII; 4- Oócito fecundado; 5 Oócito fecundado com divisão celular; 7- Taxa de maturação; 8- Taxa de fertilização; 9-Taxa de formação de blastocisto) em oócitos bovinos, coletados em um frigorífico de Goiânia.

A taxa de maturação total dos oócitos foi de 36,50 % dos oócitos imaturos após 24 horas em meio IVF (Vitrolife), 31,30% para as vacas velhas e 50,50% para as vacas novas, com taxa total de formação de blastocisto foi 19,70%, para as vacas

velhas e 22,58% e para as vacas novas 17,14%. Estas oscilações de valores entre vacas velhas e novas podem ser explicadas pela qualidade oocitária. As vacas velhas houve uma pré-maturação ainda *in vivo*, como descreve Merton et al.[57] o que delegaria uma maior competência na fertilização para o oócito, como mostra na Figura 1.

As taxas de formação de blastocisto, citadas acima, são similares aos apresentados por Fonseca et al.[58] que foi de 22,5%. Porém, resultados diferentes foram apresentados por De Vos et al.[32] onde a taxa de formação de blastocisto foi de 52,5%, tendo o mesmo resultado os trabalhos de Bergère et al.[59], Cobo et al.[60] e Ber et al.[61] meio utilizado nestes trabalhos para a maturação oocitária foi o M-199.

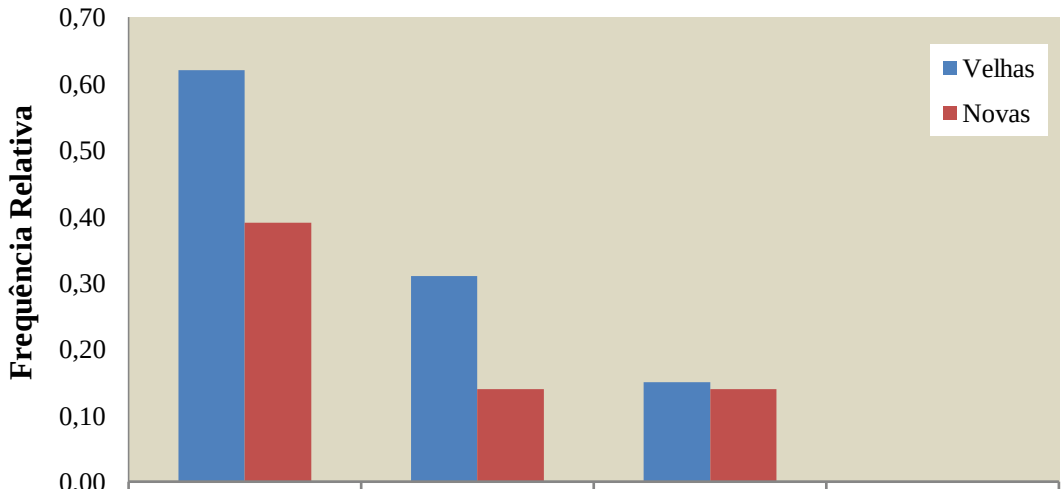
Avery et al.[38] apresenta uma taxa de 69% em meio M-199 Sigma Co num período de 24 a 48 horas de cultivo, com 19 % de formação de blastocisto.

A coleta dos oócitos fbi realizada em ovários obtidos em abatedouro, sem estímulo hormonal prévio, portanto, os oócitos se apresentavam em vários estágios de maturação, requerendo dessa forma um longo período de incubação para chegarem ao estágio de metáfase II – MII, o que acarretaria urna baixa capacidade de fertilização[60,62,63,64].

No trabalho apresentado por Merton et al.[57] apresenta dados próximos aos apresentados no presente estudo, utilizando o meio M-199, dando ênfase na diferença de dados entre vários trabalhos com maturação oocitária, com taxas de fertilização e formação de blastocistos, referindo uma média de diferença entre 15 a 60 % dos valores entre uma trabalho e outro, essa diferença é observada na maturação, na taxa de fertilização e na formação de blastocisto, justificando tal fato à diferenças entre os laboratórios, manuseio das amostras, estresse das vacas no momento do abate, meios de cultura, suplementação com hormônios entre outros[60,65,66,67].

Na criopreservação foram utilizadas duas técnicas o congelamento ultra-rápido, usando o crioprotetor DMSO, e o congelamento lento computadorizado com criocâmara, tendo como crioprotetor o glicerol. Para o congelamento usando o DMSO, verificou-se que a correlação de *Sperman* foi significativa ($r = 0,9920$ e $p = 0,0015$), mostrou que a idade das vacas tende a resultados semelhantes com relação à sobrevida do blastocisto. Esta condição também, foi observada no congelamento com glicerol, ou seja, existe correlação significativa ($r = 0,9775$ e $p = 0,0072$) em relação às idades. Neste caso, nota-se que para congelamento com o

DMSO, as vacas velhas iniciam com um número maior de embriões. Porém, para re-expansão dos blastocistos foram similares, com uma melhor sobrevida para as vacas velhas, como mostra na Figura 2.

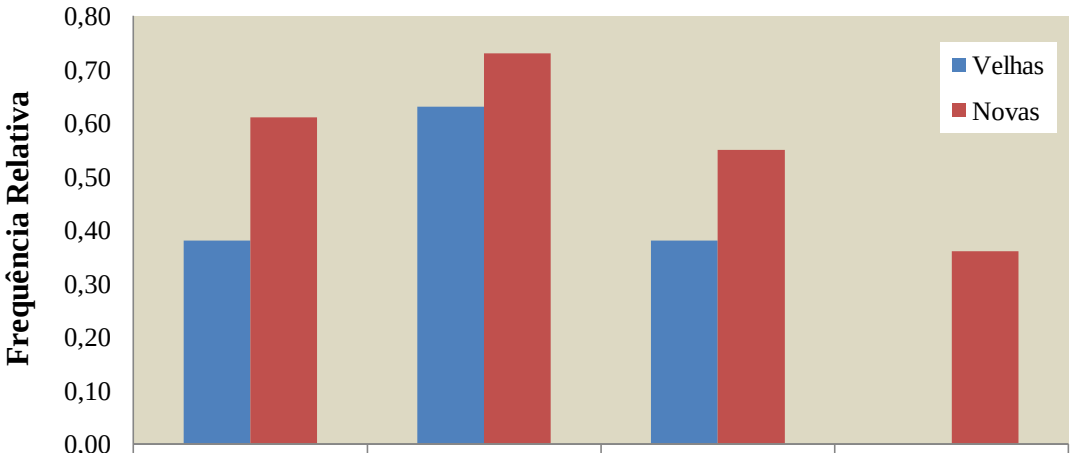


	CE	DV	REB	HE
Velhas	0,62	0,31	0,15	0,00
Novas	0,39	0,14	0,14	0,00

FIGURA 2 – O gráfico mostra o congelamento dos blastocisto pela técnica de congelamento ultra-rápido, usando o DMSO como crioprotetor (CE – congelamento dos embriões; DV – Descongelados viáveis; REB – Re-expansão dos blastocistos; HE – *Hatching* espontâneo).

Para o congelamento com (licerol, se observa um comportamento melhor dos embriões das vacas novas chegando até ao *hatching* espontâneo, o que nos leva a pensar em melhores resultados de prenhez, após transferência de embriões para vacas receptoras[28].

A viabilidade do blastocisto após o descongelamento, em relação ao *hatching* espontâneo foi de 0,0% com o congelamento feito com DMSO para vacas velhas e novas. E para o descongelamento dos embriões, que foram congelados pelo protocolo lento usando o glicerol, das vacas velhas foi 0,00% e de 36,00 % para vacas novas. Tais variáveis serviram para indicar qual o melhor método de criopreservação, se com o DMSO, congelamento ultra-rápido, ou com o glicerol, congelamento lento computadorizado na Criocâmara. Os resultados dessa comparação podem se visualizados na Figura 3.



	CE	DV	REB	HE
Velhas	0,38	0,63	0,38	0,00
Novas	0,61	0,73	0,55	0,36

FIGURA 3 – Relativa do congelamento dos blastocisto pelo método de congelamento lento computadorizado, usando como crioprotetor o glicerol (CE – congelamento dos embriões; DV – Descongelamento com células viáveis; REB – Re expansão de blastocisto; HE – *Hatching* espontâneo).

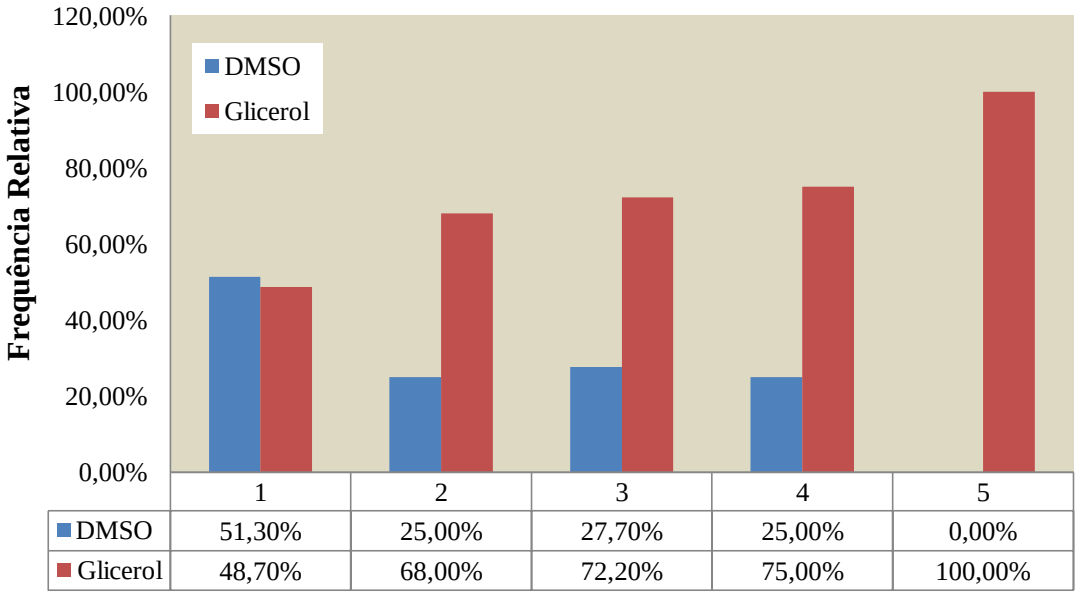
Para o resultado total de criopreservação de blastocistos, observamos uma sobrevida de 25% congelados com DMSO e 68% com glicerol após descongelamento, houve significância pelo teste de *Fisher* (p = 0,05), Tabela 1. Estes valores encontrados foram semelhantes aos apresentados no trabalho de Camargo et al.[35] sem congelamento. Virant-Klun et al.[43] apresentam em seu estudo com congelamento e descongelamento utilizando meio sequencial, a taxa de 81% de sobrevida de blastocisto após congelamento lento com a Planer, equipamento equivalente ao utilizado em nosso estudo, mostrando mesma velocidade e curva de congelamento computadorizado, com mesmo crioprotetor, o glicerol. Da mesma forma apresenta Keskintepe e Brackett[25]; Khurana e Niemann[29] que trabalharam com congelamento e descongelamento.

TABELA 1 - Análise comparativa entre método de criopreservação (DMSO e Glicerol) de oócitos de bovinos, na fase de blastocisto, coletados em frigorífico de Goiânia.

Método	Sobrevivência pós-descongelamento		Total
	Sobrevida	Atresia	
DMSO	5,00[1] (11,02)[2]	15,00 (14,35)	20,00
Glicerol	13,00 (12,82)	6,00 (11,79)	19,00
Total	18,00	21,00	39,00
$X^2 = 6,68$ ($p = 0,05$)			

Nota - [1]: Valores Observados; [2]: Valores Esperados

Os resultados do congelamento do total de embriões mostram claramente que os embriões congelados com o método lento computadorizado com a criocâmara, usado o glicerol corno crioprotetor, obteve melhor sobrevida independente da idade, vacas velhas ou novas. Estes dados podem ser observados na Figura 4.



	1	2	3	4	5
DMSO	51,30%	25,00%	27,70%	25,00%	0,00%
Glicerol	48,70%	68,00%	72,20%	75,00%	100,00%

FIGURA 4 – O diagrama mostra o resultado total do congelamento com DMSO e Glicerol (1 – Embriões congelados; 2 – Taxa de sobrevida após descongelamento; 3 – Embriões viáveis após descongelamento; 4 – Re-expansão dos blastocistos; 5 – *Hatching* espontâneo).

Guerif et al.[68] apresentam uma taxa de 42% de sobrevida após descongelamento, com glicerol. Observamos que outros estudos confirmam estas taxas de sobrevida de embriões na fase de blastocisto, com resultados de prenhez, porém os resultados à fresco ainda são melhores, ou seja, sem passar pelo processo de congelamento e descongelamento, como é mostrado nos trabalhos de Camargo et al.[35], Agca et al.[69], Leibo et al.[70] e Myers et al.[71].

O congelamento ultra-rápido usando o crioprotetor DMSO, com o resultado de sobrevida acima citado, apresentou uma sobrevida menor ao apresentado por Aigner et al.[49] de 69 % de sobrevida. Da mesma forma Feichtinger et al.[50] descreve melhores resultados deste congelamento, ultra-rápido, usando oeste mesmo crioprotetor, para congelamento de embrião em estágio de 4 células até estágio de mórula com 16 células, com resultado de 61 % de sobrevida, acentuando ainda o baixo preço da criopreservação pelo método ultra-rápido, justificando o custo-beneficio da metodologia[45].

No trabalho apresentado por Emiliani et al.[27] onde faz um estudo comparativo entre vários crioprotetores, mostra que a re-expansão do blastocisto apresentou diferença estatística entre o glicerol e o DMSO, obtendo melhores resultados com o glicerol, justificando estes dados a alta toxicidade do DMSO, sendo este o mais tóxico dentre os crioprotetores. Faz ainda uma ressalva colocando que os resultados são melhores com este crioprotetor na vitrificação, o que seria sugerido também por outros pesquisadores[24,26,72,73].

A sacarose adicionada nos crioprotetores, nos dois tipos de congelamento, tem a função de aumentar a osmolaridade e retirar a água de dentro da célula evitando dessa fòrrna a formação de cristais de gelo, preparando a célula para o aumento da pressão osmótica dada pela água do meio de congelamento[74]. Os crioprotetores, inclusive o glicerol, são geralmente tóxicos, suas concentrações, tempo de equilibrarão, estabilização da temperatura são usualmente mantidas com temperatura baixa na sala, Virant-Klun et al.[43] diminuindo dessa forma a toxicidade, porém não influenciando nas alterações osmóticas.

4 CONCLUSÃO

Este estudo mostra que a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, coletados de ovários de abatedouro, sem estímulo prévio, com fertilização *in vitro* é possível, com resultado de embriões com capacidade de se desenvolverem a blastocisto. Estes blastocistos podem efetivamente ser congelados pelo método de congelamento lento e ultra-rápido, com resultados mais satisfatórios para o congelamento lento computadorizado na Criocâmara.

Os resultados mostram haver uma correlação significativa entre os estágios de maturação entre novilhas e vacas velhas, porém não apresentaram diferenças estatísticas

entre os resultados das taxas de maturação, fertilização e formação de blastocisto. Nota-se que para os estágios de VG, oócito fecundado, oócito fecundado com divisão celular e óvulo maduro, uma maior frequência de valores para as vacas novas, enquanto que as vacas velhas apresentaram uma maior frequência nas fases de MI, MII e na formação de blastocistos.

Foram descritas diferenças de valores dos que aqui foram apresentados, porém, são justificados por variáveis como: estimulação hormonal prévia à coleta, estresse da vaca provocado pelo transporte, manuseio e abate; diferentes meios de cultura, suplementos usados nos meios, como: hormônios, soro albumina bovina, soro de cordão, entre outros.

Constatou-se que houve diferença estatística entre os métodos de congelamento ultra-rápido, usando como crioprotetor o DMSO, com o congelamento lento computadorizado com a criocâmara, usando o glicerol como crioprotetor onde o congelamento lento computadorizado obteve melhore resultado de sobrevida dos embriões. Dados comprovados por outros autores, que encontraram também diferença estatística para o congelamento de embriões em estágio de blastocisto por estes dois métodos, corn os mesmos crioprotetores. Outros autores mostram resultados melhores do congelamento ultra-rápido, com DMSO, para embriões em estágios de 4 a 8 células ou vitrificação, justificando a alta toxicidade deste crioprotetor, melhor suportado por este estágio embrionário. Para conseguirmos transportar os resultados *in vitro* dos ocorrem *in vivo,* serão necessários maiores estudos para entendermos melhor os mistérios da reprodução animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buttler JE, Biggers JD. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. Theriogenology, 1989; 31: 115-26.

2. Ramos AA, Camargo LSA, Sá WF, Ferreira AM, Costa EP. Fecundação 'in vitro' com sêmen de bovinos da raça Gir. Arq. Bras. Med. Vet. Zooíec. 2000; 52.

3. Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. Commercial aspects of oocyte retrivel and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology, 1994; 41: 67-72.

4. Scholtes MCW, Zeilmaker GH. Prospective randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in-vitro fertilization. Fertil. Steril. 1996; 65: 1245-8.

5. Lussier JG, Lamonthe P, Pacholet X. Effects of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. Theriogenology. 1995; 43: 270.

6. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OP. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fertil. 1992; 94: 177-88.

7. Van Wagtendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, Roos APW, Merton JS, Daas JHG, Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. Theriogenology. 2000; 53: 575-97.

8. Hiroyoshi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology. 2003; 59: 675-85.

9. Tesarik J, Mendoza C. Nongenomic effects of 17β-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. J Clin. Endocr. Metab. 1995; 80: 1438-43.

10. Wu TC, Wang L, Wan YJ. Detection of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Fertil. Steril. 1993; 59: 54-9.

11. Lu KH, Shi DS, Jiang HS, Goulding D, Boland MP, Roche JF. Comparison of the development capacity of bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers. Theriogenology. 1991; 35: 235.

12. Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. Ani. Reprod. Sci. 1996; 42: 417-26.

13. Jones GM, Trounson A, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil. Steril. 1998; 70: 1022-9.

14. Pantos K, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T. Influence of advanced age on blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology. Fertil. Steril. 1999; 71: 1144-46.

15. Noda Y, Goto Y, Umaoka Y, Shiotani M, Nakayama T, Mori T. Culture of human embryos in alpha modification of Earle's medium under low oxygen tension and low illumination. Fertil. Steril. 1994; 62: 1022-27.

16. Ménézo Y, Veiga A, Benkhalifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture. Hum. Rep. 1998; 13: 256-64.

17. Langendonckt AV, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J. Comparison of G.12/G2.2 and Sydney ivf cleavage/blstocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. Fertil. Steril. 2001; 76: 1023-31.

18. Traunson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embrvo. Nature. 1983; 305: 707-9.

19. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. Fertil. Steril. 1985; 44: 645-51.

20. Cohen J, Simons RF, Fehilly CB, Edwards RG. Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. J. In. Vitro. Fertil. Emb. Trans. 1986; 3: 46-52.

21. Petersen CG, Mauri AL, Baruffi RLR, Ferreira RC, Franco JJG. Método ultra-rápido efetivo para criopreservação de embrião humano. J. Bras. Repr. Assist. 1997; 1: 71-4.

22. Costa EP, Sá WF, Ferreira AM, Viana JHM, Freitas C. Cultivo "in vitro" de oócitos bovinos em diferentes sistemas: II- aspectos ultra-estruturais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 1997; 49: 561-73.

23. Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. J.Repr.Fertil. 1988; 83: 753-8.

24. Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. Cryobiology. 1999; 38: 95-105.

25. Keskintepex L, Brackett BG. Criopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology. 2000; 53: 1041-52.

26. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J. Repr. Fertil. 1981; 63: 173-8.

27. Emiliani S, Bergh MVD, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. Hum. Rep. 2000; 15: 905-10.

28. Kennedy LG, Boland MP, Gordon I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. Theriogenology. 1983; 19: 823-32.

29. Khurana NK, Niemann H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. Theriogenology. 2000; 54: 313-26.

30. Han YM, Yamashina H, Koyama N, Lee KK, Fukui Y. Effects of quality and developmental stage on the survival of IVF - derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. Theriogenology. 1994; 42: 645-54.

31. Takagi M, Sakonju I, Otoi T, Hamana K, Suzuki T. Postthaw viability of the inner cell mass of in vitro-matured/in vitro- fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants. Cryobiology. 1994; 31: 398-405.

32. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase- II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hurn. Rep. 1999; 14: 1859-63, 1999.

33. Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K. Development of In Vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different crvoprotectants. Theriogenology, 1999; 51:1303-10.

34. Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire, T'heriogenology. 2002; 57: 2105-17.

35. Camargo LSA, Sá WF, Ferreira, AM, Viana JHM, Freitas C. Concentração espermática na fecundação ‘in vitro’, com sêmen de touro da raça Guzerá. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2000; 52.

36. Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish J.L. Effect of bovine eperm separation by either swim-up or percoll methods on success of in vitro fertilization and early embryonic development. Theriogenology. 1995; 44: 859-69.

37. Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-inbation time on in vitro Fertilization of bos indicus oocytes. An. Rep. Sci. 2002; 69: 15-23.

38. Avery B, Strobech L, Jacobsen T, Bogh IB, Greve T. In vitro maturetion of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronúcleos formation and embryo development. Theriogenology, 2003; 59: 987-99.

39. Viana JHM, Camargo LSA, Ferreira AM, Sá WF, Marques Jr AP. Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular e fertilização ‘in vitro’ no estado de Minas Gerais. Arq. Bras. Méd. Vet. .Zootec. 2001; 53.

40. Xu KP, Greve T. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. J. Rep. Fert. 1998; 82: 127-34.

41. Lindner GM, Whright Jr RW.; Bovine embryo morfhology and evaluation. Theriogenology, 1983; 20: 407-41.

42. Pinto Neto A, Silva Filho JM, Fonseca JF, Palhares MS, Costa EP. Taxa de gestação e morfologia de embriões bovinos da raça Nelore resfriados por 24 horas a 5°C em contêiner modelo celle modificado. Arq. Bras. Med. Vet.. Zootec. 1999; 51.

43. Virant-Klun I, Tomazevic T, Kermavner LB, Mivsek J, Gruden BV, Vrtovec HM. Successful freezing and thawing of blastocysts cultured in sequencial media using a modified method. Fertil. Steril. 2003; 79: 1428-33.

44. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. Theriogenology. 1991; 35: 109-24.

45. Trouson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertil. Steril. 1987; 48: 843-6.

46. Kim EY, Uhm SJ, Kim SE. ICM-trophectoderm cell numbers of bovine IVM/IVF/IVC blastocysts. Kor. J. Anim. Reprod. 1996; 20: 27-34.

47. Trouson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. Fertil. Steril. 1988; 49: 822- 6.

48. Trouson A, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. Fertil. Steril. 1988; 50: 373-6.

49. Aigner S, Elst JVD, Siebzehnrubl E, Wildt L, Lang N, Steirteghem ACV. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum. Repr. 1992; 7: 857-64.

50. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryos. Hum. Repr. 1991; 6: 735-6.

51. Ménézo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing co-cultured human blastocysts. Fertil Steril. 1992; 58: 977-80.

52. Desai N, Lawson J, Goldfarb J. Assessment of growth fator effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. Hum. Repr, 2000; 15: 410-18.

53. Gardner DK, Phil D, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Changing the start temperature and cooling rate in a slow-freezing protocol increases human blastocyst viability. Fertil. Steril. 2003; 79: 407-10.

54. Cochran WG, Cox GW. Experimental designs. New York: Wiley; 1968, 466p.

55. Pimentel-Gomes, F. Curso de estatística experimental. 11 ed. Piracicaba: Nobel; 1985.

56. Centeno AJ. Curso de estatística aplicada à biologia. Goiânia: Centro Editorial e Gráfica/UFG; 1999, 188p.

57. Merton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factrs affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology. 2003; 59: 651-74.

58. Fonseca JF, Silva Filho JM, Pinto Neto A, Palhares MS. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. Arq. Bras. Med. Zoot., 53: 2001.

59. Bergère M, Pfeffer J, Schwab J, Selva J. ICSI on metaphase I oocytes matured in vitro. Hum. Repr. 1997; 12: 1980-84.

60. Cobo AC, Requena A, Neuspiller F, Aragonés M, Mercader A, Navarro J, Simon C, Remohí J, Pellicer A. Maturation 'in vitro' of human oocytes from unstimulated cycles: selection of the optimal day for ovum retrieval based on follicular size. Hum. Rep. 1999; 14: 1864-8.

61. Ber B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasig D. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. Hum. Rep. 1999; 14: 454-7.

62. King WA, Bouquest D, Greve T. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and in vivo. Acta Vet Scand. 1986; 27: 267-79.

63. Lim, JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K. Development of In Vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different crvoprotectants. Theriogenology, 1999; 51:1303-10.

64. Machatkova 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, 2004; 61: 329-35.

65. Blodin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmentar competence in bovine oocytces. Mol. Reprod Dev. 1995; 41: 54-62.

66. Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovu1atory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology, 1986; 25: 71-86.

67. Hendriksen, PJM, Vos PL, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine folicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. Theriogenology. 2000; 53: 11-20.

68. Guerif F, Cadoret V, Poindron J, Lansac J, Royere D. Overnight incubation improves selection of frozen-thawed blastocysts for transfer: preliminary study using supernumerary embryos. Theriogenology, 2003; 60: 1457-66.

69. Agca Y, Monson RL, Northey DL, Mazni AO, Schaeffer DM, Rutledge JJ. Transfer of fresh and crvopreserved IVP bovine embryos: normal calving. birth weight and gestation lengths. Theriogenology. 1998; 50: 147-62.

70. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology, 1993; 39: 81-94.

71. Myers MW, Rocha A, Denniston RS, Broussard, J.R, Thibodeaux, J.K. Pos-thaw survival of bovine embryos following in vitro maturation, fertilization and culture. Theriogenology. 1996; 45: 176.

72. Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of Embryos. J.Repr. Fertil. 1993; 99: 471-7.

73. Yokot AY, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. Hum. Repr. 2000; 15: 1802-3.

74. Széll A, Shelton JN, Széll K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. Cryobiology. 1989; 26: 297-301.