



Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação

Alessandra de Almeida Ramos¹, Juliana Polisseni², Wanderlei Ferreira de Sá², Ademir de Moraes Ferreira², Luis Sérgio de Almeida Camargo², Danielle da Silva Folhadella³, Luiz Altamiro Garcia Nogueira³

¹ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – MG, Brasil.

² Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora – MG, Brasil.

³ Universidade Federal Fluminense – RJ, Brasil.

RESUMO - Avaliou-se a viabilidade de embriões bovinos cultivados *in vitro*, a fresco ou reaquecidos após vitrificação, depois detransportados por 6 ou 12 horas. Oócitos obtidos de folículos de ovários coletados em matadouro foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Após sete dias de cultivo, blastocistos com grau de qualidade I e II (segundo o manual da IETS-1998) foram selecionados, envasados em OPS (*open pulled straws*) e vitrificados em nitrogênio líquido. O reaquecimento foi realizado a 39°C pela passagem em soluções de HM com concentrações decrescentes de sacarose (0,25M - 0,15M) por cinco minutos em cada solução. Foram avaliados três tratamentos – V0: embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados *in vitro* (n=25); V6: embriões vitrificados, transportados por 6 horas (simulação em palhetas), reaquecidos e cultivados *in vitro* (n=29); e V12: embriões vitrificados, transportados por 12 horas, reaquecidos e cultivados *in vitro* – comparados, cada um, a um tratamento controle, com embriões a fresco – C0: embriões a fresco cultivados *in vitro* (n=26); C6: embriões a fresco cultivados *in vitro* após 6 horas de transporte (n=30); e C12: embriões a fresco cultivados *in vitro* após 12 horas de transporte (n=30). Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa em microgotas de TCM 199 acrescido de SFB. Foram avaliadas as taxas de re-expansão e eclosão após 48 horas de cultivo. A análise foi realizada pelo teste do qui-quadrado. As taxas de re-expansão entre os grupos V0, V6 e V12 não diferiram, assim como as taxas de eclosão entre os embriões vitrificados e os controles. As taxas de eclosão, no entanto, diferiram entre os embriões submetidos à vitrificação e os controles. Embriões bovinos produzidos *in vitro* podem ser transportados a fresco ou vitrificados por períodos de até 12 horas, pois possibilitam taxas de eclosão satisfatórias.

Palavras-chave: criopreservação, DMSO, produção *in vitro* de embriões

Effect of transportation on development of fresh or vitrified-warmed bovine embryos

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the viability of *in vitro* produced bovine embryos, fresh or warmed, after submitted to different periods of transportation (6h-12h). Oocytes obtained from ovaries collected from slaughterhouse were matured, fertilized and cultured *in vitro*. After seven days, grades I and II blastocysts (according to IETS manual) were selected and vitrified after exposition to PBS solution with 5% fetal calf serum (HM), added with 10% ethylene glycol (EG) and 10% of dymetil sulfoxide (DMSO), for one minute, followed by HM solution with 20% EG and 20% DMSO, for 20 seconds. Embryos were loaded into open pulled straws (OPS) and plunged into liquid nitrogen. Warming was performed at 39°C by embryo exposure to decreasing concentration of sucrose (0.25 and 0.15M), for five minutes in each step. The warmed embryos were distributed in three groups: V0: *in vitro* cultured after warmed; V6: embryos loaded into straws and kept for 6 hours at 35°C, before *in vitro* culture; and V12: embryos loaded into straws and kept for 12 hours at 35°C, before *in vitro* culture. Each group was evaluated by control groups of fresh embryos (C0, C6 and C12, respectively). The embryos were co-cultured with *cumulus* cells in TCM-199 micro droplets added with SFB. Re-expansion and hatching rates after 48 hours in culture were evaluated and results were compared by the Chi-square test. Re-expanded rates among groups V0, V6 and V12 as well as hatching rates among vitrified groups and among control groups did not differ. However, hatching rates were different between vitrified groups and their respective controls. The satisfactory rates of hatching suggest that it is possible to transport warmed and fresh *in vitro* produced embryos for periods up to 12 hours.

Key Words: cryopreservation, DMSO, *in vitro* production embryo

Introdução

A criopreservação de embriões permite o aproveitamento de receptoras com estro natural, reduzindo os custos com a sincronização de estros, além de permitir o transporte de embriões congelados e a programação de nascimentos adequada ao manejo de cada fazenda. Oferece, ainda, condições de armazenamento dos embriões durante o período de teste de progênie e viabiliza a criação de bancos de embriões originados de animais geneticamente superiores, tanto puros como mestiços F1.

É necessário que o método seja adequado e que os embriões apresentem características de tolerância às crioinjúrias. O congelamento lento controlado tem sido a técnica mais amplamente utilizada na criopreservação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, os embriões produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis à criopreservação e resultam em taxas de gestação menores que as obtidas com embriões produzidos *in vivo* (Sommerfeld & Niemann, 1999; Pugh et al., 2000; Diez et al., 2001).

O aumento da sensibilidade dos embriões PIV aos processos de congelamento é parcialmente explicado por mudanças na estrutura embrionária, como menor número de células no embrioblasto, maior número de gotas de lipídeos intracelulares e aumento da permeabilidade da zona pelúcida (Abe et al., 1999; Lazar et al., 2000; Diez et al., 2001). A maior quantidade de lipídeos aumenta a sensibilidade dos embriões a mudanças de temperatura (Rizos et al., 2001; Massip, 2001). Além disso, o número de junções gap nos embriões PIV diminui, reduzindo o grau de compactação do embrioblasto e elevando a susceptibilidade dos embriões às crioinjúrias (Boni et al., 1999; Rizos et al., 2001; Massip, 2001).

Diversos autores concordam que o método de cultivo tem grande importância sobre a menor criotolerância observada nos embriões PIV e que a melhoria nas condições de cultivo pode levar ao aumento nas taxas de sobrevivência embrionária (Vajta et al., 1996). Outra possibilidade para resolver esse problema é encontrar um método de criopreservação apropriado para esses embriões (Martinez et al., 2002).

O método de vitrificação tem se mostrado apropriado para a criopreservação de embriões PIV (Martinez et al., 2002), proporcionando taxas de sobrevivência dos embriões PIV após a vitrificação significativamente maiores que as obtidas após o congelamento lento (Vajta et al., 1996). Taxas de gestação aceitáveis têm sido obtidas após a transferência de embriões PIV vitrificados (Vajta et al., 1996; Donnay et al., 1998; Lazar, 2000; Massip, 2001). Martínez et

al. (2002) afirmaram que a vitrificação pode ser utilizada com sucesso na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* e que essa técnica pode ser utilizada, inclusive, em programas comerciais. A vitrificação é um processo de congelamento que pode ser realizado em contêiner de nitrogênio líquido e que requer pouco tempo para o resfriamento. Com a aplicação dessa técnica, a necessidade de equipamento é menor, pois é possível obter considerável economia no custo do embrião transferido.

Na prática, a utilização da técnica de vitrificação requer o manuseio dos embriões por pessoas especializadas e sob condições que normalmente não existem a campo, principalmente quanto ao reaquecimento dos embriões. Uma possibilidade de superar essa limitação seria reaquecer os embriões em laboratórios e, posteriormente, transportá-los para as fazendas. Neste trabalho, avaliou-se a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados e posteriormente reaquecidos e submetidos a diferentes períodos de transporte.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora - MG, durante os meses de julho a setembro de 2004. Os ovários foram obtidos de vacas mestiças abatidas em matadouro e transportados ao laboratório em garrafas térmicas contendo solução fisiológica (0,9% NaCl e 0,1 g/L de sulfato de estreptomicina), a temperaturas de 30 a 34°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina e mantidos em banho-maria a 37°C até a aspiração. Os folículos com diâmetro entre 2-8 mm foram aspirados com o auxílio de uma agulha calibre 21 G acoplada a uma seringa de 10 mL. O período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 4 horas. Os oócitos recuperados foram mantidos em meio TALP-HEPES para posterior seleção em microscópio estereoscópico com aumento final de 50x.

Como critérios de avaliação dos oócitos, foram considerados a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Foram selecionados os complexos *cumulus*-oócitos com, no mínimo, três camadas de células do *cumulus* compactas e o citoplasma homogêneo.

Após seleção, os complexos *cumulus*-oócitos foram maturados *in vitro* em placas de quatro poços contendo 400 mL de meio TCM199 acrescidos de 10% de soro da vaca em estro e 20 mg/mL de FSH em cada poço, conforme descrito por Costa (1994). A maturação foi realizada em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

Depois de maturados, os oócitos foram fertilizados *in vitro* com sêmen congelado de um touro da raça Holandesa previamente selecionado. Os espermatozoides foram preparados segundo o método de *swim up* (Parrish et al., 1986) e a fecundação foi realizada em gotas, sob óleo mineral, de 100 µL de meio FERT-TALP acrescido de 10 µL/mL de heparina e com $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL por um período aproximado de 22 horas nas mesmas condições de maturação.

Os possíveis zigotos foram semidesnudados em meio TALP-HEPES e, em seguida, transferidos para o meio CR_{2aa} acrescido de 10% de soro fetal bovino em gotas de 50 µL de óleo mineral, onde foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação. Após 48 horas do início do cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. A taxa de produção de blastocisto e a qualidade dos embriões foram avaliadas no sétimo dia e, quando os embriões se apresentavam em estágio de blastocisto ou blastocisto expandido e grau de qualidade 1 ou 2, segundo o manual da IETS (1998), foram vitrificados.

Os embriões foram vitrificados pela passagem em uma solução de vitrificação constituída de PBS com 5% de soro fetal bovino (HM) acrescida de 10% de DMSO e 10% de etilenoglicol (SV1) por um minuto. Em seguida, foram passados em outra solução de vitrificação (SV2), que consistia de HM acrescido de 20% de DMSO e 20% de etilenoglicol por, no máximo, 20 segundos. Os embriões foram, então, envasados em OPS (*Open Pulled Straw*) e imediatamente imersos em nitrogênio líquido.

Os embriões vitrificados foram reaquecidos pela passagem em soluções de HM a 38°C com duas concentrações diferentes de sacarose (0,25 e 0,15M), por cinco minutos em cada uma, sendo então colocados em solução HM a 38°C e, posteriormente, distribuídos em três tratamentos: V0: embriões vitrificados, reaquecidos e cultivados *in vitro* (n=25); V6: embriões vitrificados, transportados por 6 horas (simulação em palhetas), reaquecidos e cultivados *in vitro* (n=29); e V12: embriões vitrificados, transportados por 12 horas, reaquecidos e cultivados *in vitro*. Cada tratamento foi comparado a um tratamento controle, com embriões a fresco: C0: embriões a fresco cultivados *in vitro* (n=26); C6: embriões a fresco cultivados *in vitro* após 6 horas de transporte (n=30); e C12: embriões a fresco cultivados *in vitro* após 12 horas de transporte (n=30).

Para simulação do transporte, os embriões foram mantidos em palhetas de 0,25 mL em placa aquecedora a 33-35°C, sendo realizadas cinco repetições para cada tratamento.

O cultivo foi realizado em gotas de 50 µL de meio TCM-199 tamponado com HEPES e acrescido de 10% de

soro fetal bovino (SFB), na presença de monocamadas de células da granulosa por 48 horas. As taxas de re-expansão, eclosão e degeneração foram avaliadas a cada 24 horas após o início do cultivo.

Os dados (taxas de re-expansão, eclosão e degeneração) foram avaliados pelo teste do qui-quadrado.

Resultados e Discussão

As taxas de eclosão dos embriões a fresco, assim como as taxas de degeneração, não diferiram ($P>0,05$) entre os diferentes períodos de transporte (Tabela 1).

Os resultados deste experimento corroboram os obtidos por outros autores, que também não observaram alterações na viabilidade embrionária após transportarem embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* por períodos de 6 a 24 horas em diferentes meios de cultivo (Hasler et al., 1997; Leibo & Winninger, 1986; Mezzalira et al., 2004).

Relatos na literatura confirmam que 20 a 30% dos embriões produzidos *in vitro* (PIV) degeneram após serem transportados (Leibo et al., 1986a; Kuwayama et al., 1991; Takahashi et al., 1996). Entretanto, as taxas de degeneração observadas neste experimento foram inferiores a 4%.

As taxas de gestação obtidas com embriões PIV parecem ser inversamente relacionadas ao período de transporte (Yang et al., 1991), mas, neste experimento, não foi possível a avaliação desse parâmetro. Entretanto, as taxas de eclosão e degeneração observadas neste experimento permitem concluir que a viabilidade dos embriões não foi afetada pelo transporte.

O transporte por diferentes períodos também não afetou ($P>0,05$) as taxas de re-expansão, eclosão e degeneração dos embriões PIV vitrificados e reaquecidos (Tabela 2). Similarmente, Mezzalira et al. (2004) não observaram diferença entre as taxas de gestação de embriões PIV vitrificados, reaquecidos e transportados por 6 horas e aqueles transferidos logo após o reaquecimento. As taxas de degeneração

Tabela 1 - Taxas de eclosão e degeneração de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transportados a fresco por diferentes períodos (horas)

Table 1 - Hatching and degeneration rates of *in vitro* produced bovine embryos after transportation by different periods of time (hours)

Período de transporte (horas) <i>Transportation period (hours)</i>	n	Eclosão (%) <i>Hatching</i>	Degeneração (%) <i>Degeneration</i>
0	26	79,8	0
6	30	81,3	0
12	30	92,0	3,6

Tabela 2 - Taxas de re-expansão, eclosão e degeneração de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transportados após vitrificação e reaquecimento por diferentes períodos (horas)

Table 2 - Re-expansion, hatching and degeneration rates of *in vitro* produced bovine embryos, transported after vitrification and warming, by different periods of time (hours)

Período de transporte (horas) <i>Transportation period (hours)</i>	N	Re-expansão (%) <i>Re-expansion</i>	Eclosão (%) <i>Hatching</i>	Degeneração (%) <i>Degeneration</i>
0h	25	73,3	36,1 ^a	10,6 ^a
6h	29	47,6	24,0 ^a	24,6 ^a
12h	29	63,3	28,7 ^a	29,2 ^a

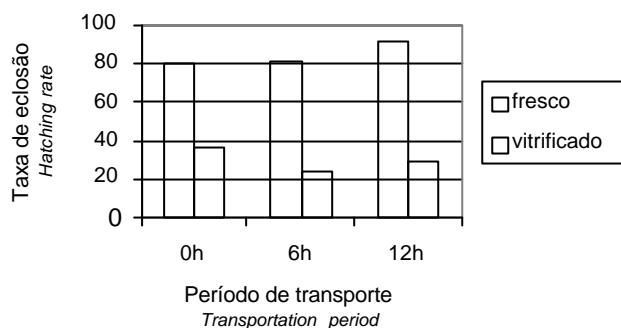


Figura 1 - Taxas de eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transportados, a fresco ou após vitrificação e reaquecimento, por diferentes períodos.

Figure 1 - Hatching rate of *in vitro* produced bovine embryos, fresh or warmed, after transportation by different periods of time.

observadas neste trabalho para embriões PIV vitrificados e reaquecidos após 6 e 12 horas de transporte foram semelhantes às relatadas na literatura para embriões PIV transportados a fresco (Leibo et al., 1986b; Kuwayama et al., 1991; Takahashi et al., 1996). Entretanto, são poucos os dados disponíveis na literatura sobre o transporte de embriões submetidos aos processos de vitrificação e reaquecimento. Um fator limitante para difusão da técnica de vitrificação é a ausência de laboratórios adequados nas fazendas para realização do reaquecimento. Uma solução seria o reaquecimento dos embriões em laboratório adequado antes do transporte para as fazendas, todavia, são necessárias mais pesquisas sobre o assunto.

As taxas de eclosão dos embriões vitrificados diferiram ($P < 0,01$) das obtidas nos seus respectivos tratamentos controles, a fresco (Figura 1), o que confirma os achados de outros autores (Lazar et al., 2000; Camargo et al., 2004), que também observaram diminuição nas taxas de eclosão após a vitrificação. Esse resultado pode ter sido ocasionado pela alta concentração de crioprotetores utilizada nos procedimentos de vitrificação. Segundo Kaidi et al. (1999), concentrações hiperosmóticas de crioprotetores durante o equilíbrio podem promover alterações no volume celular ocasionando danos na membrana celular e, conseqüentemente, afetando a sobrevivência dos embriões. Neste experimento,

a intensa desidratação sofrida pelos embriões vitrificados foi evidenciada pela perda parcial ou total da blastocela. Após o reaquecimento, praticamente todos os embriões apresentaram-se semelhantes a mórulas, como conseqüência do colapamento da blastocela. Observou-se também redução na qualidade, principalmente em virtude do aumento do número de células de extrusão.

Embora as taxas de re-expansão tenham sido semelhantes às descritas por outros autores (Lazar et al., 2000; Camargo et al., 2004), as taxas de eclosão observadas neste trabalho foram inferiores às relatadas na literatura (Lazar et al., 2000; Martínez et al., 2002; Camargo et al., 2004). A utilização de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* e as diferenças na qualidade dos oócitos podem ser responsáveis pela obtenção de resultados divergentes. A composição de alguns meios de cultivo pode influenciar os desenvolvimentos embrionário, fetal e placentário (Young et al., 1998; Mcevoy, 2003), por afetar a transcrição de determinados genes (Niemann & Wrenzycki, 2000) e promover alterações morfológicas nos embriões PIV (Cho, 2002; Rizo et al., 2003). Shamsuddin et al. (1994) observaram que embriões cultivados *in vitro* em presença de soro fetal bovino (SFB), suplemento utilizado neste experimento, apresentaram menor viabilidade e termotolerância. Entretanto, Folhadella et al. (2004), utilizando um sistema de cultivo semelhante, obtiveram taxas de eclosão maiores e não evidenciaram diferenças entre as taxas de eclosão dos embriões cultivados a fresco e daqueles submetidos a vitrificação. Esta diferença também pode ter sido causada pela composição do soro, que é altamente variável dependendo da fonte (animal e/ou fornecedor) e do número de lote (Gomez & Diez, 2000). Alguns lotes podem ser inertes, tóxicos ou possuir algum tipo de patógeno (Palma, 2001). O co-cultivo com células da granulosa, utilizado em ambos os trabalhos, também é uma fonte de variação para cultivo embrionário.

As taxas de sobrevivência dos embriões PIV verificadas após a vitrificação têm sido significativamente superiores às obtidas após o congelamento lento (Vajta et al., 1996) e um dos fatores que possibilitaria a difusão dessa técnica

seria realização do reaquecimento no laboratório antes de transportar os embriões para as fazendas, técnica que se mostrou viável nesta pesquisa.

Conclusões

Embriões cultivados *in vitro*, a fresco ou reaquecidos após vitrificação, podem ser transportados por períodos de até 12 horas, pois possibilitam taxas de eclosão satisfatórias.

Literatura Citada

- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAW, S. et al. Fine structure of bovine morulae and blastocyst *in vivo* and *in vitro*. **Anatomy and Embryology**, v.199, n.16, p.516-527, 1999.
- BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLOS, S. et al. Intracellular communications *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1050-1055, 1999.
- CAMARGO, L.S.A.; OLIVEIRA, R.S.; VIANA, J.H.M. et al. Comparison of two vitrification protocols for crossbred Bos indicus x Bos Taurus *in vitro* produced embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.1-2, p.164, 2004.
- CHO, K. Comparison of assisted hatching on cellular fragment portion and empty perivitelline space in poor embryos. **Fertility and Sterility**, v.78, p.S187, 2002 (suppl. 1).
- COSTA, E.P.; NOGUEIRA, J.C.; CAMARGOS, E.R.S. et al. Cultivo "in vitro" de ovócitos bovinos em diferentes sistemas. II - Aspectos ultra-estruturais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.9, n.5, p.561-574, 1997.
- DIEZ, C.; NEYMAN, Y.; LEBOURHIS, D. et al. Delipidating *in vitro* produced bovine zygote: Effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v.56, p.923-936, 2001.
- DONNAY, I.; AUQUIER, P.; KAIDI, S. et al. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v.52, p. 93-104, 1998.
- FOLHADELLA, I.M.; OLIVEIRA, R.S.; POLISSENI, J. et al. Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2004, 41., Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. (CD-ROM).
- GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.23-37, 2000.
- HASLER J.F.; HURTGEN P.J.; JIN Z.Q. et al. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v.48, p.563-579, 1997.
- KAIDI, S.; van LANGENDONCKT, A.; MASSIP, A. et al. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.52, n.3, p.515-525, 1999.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenology**, v.54, p. 313-326, 2000.
- LAZAR, L. The vitrification of *in vitro* fertilized cows blastocysts by open pulled straw method. **Theriogenology**, v.54, p.571-578, 2000.
- LAZAR, L.; ŠPAK, J.; DAVID, V. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. **Theriogenology**, v.54, n.4, p.571-578, 2000.
- LEIBO, S. P. Commercial production of pregnancies from one-step™ diluted frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.166, 1986a.
- LEIBO, S.P. Cryobiology: preservation of mammalian embryos. **Basic Life Science**, v.37, p.251-272, 1986b.
- LEIBO, S.P.; WINNINGER D. Production of bovine pregnancies from embryos transported at 0°C by air. **Theriogenology**, v.25, n.1, p.165, 1986.
- MARTÍNEZ, G.A.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. et al. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Animal Reproduction Science**, v.73, p.11-21, 2002.
- MASSIP, A. Cryopreservation of embryo of farm animals. **Domestic Animal**, v.36, p.49-55, 2001.
- MCEVOY, T.G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, n.4, p.268-275, 2003.
- MEZZALIRA, A.; SANTOS, R.M.; BARRETA, M. et al. Transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*: efeito da vitrificação e do transporte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.164, 2004 (supl.).
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.21-34, 2000.
- PALMA, G.A. **Biotechnología de la reproducción**. 1.ed. Balcarse: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2001. 693p.
- PARRISH J.J.; SUSKO-PARRISH J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L. et al. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.
- PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.9-22, 2000.
- RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p. 236-243, 2003.
- RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect of culture on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1-16, 2001.
- SHAMSUDDIN, M.; NASAR, A.; GUPTA, T.K.S.P. Thermodynamic investigations of liquid Te-saturated PbSe-PbTe solid solutions. **Thermochimica Acta**, v.232, n.2, p.303-315, 1994.
- SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES - IETS. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Illinois: IETS, 1998. 180p.
- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.
- TAKAHASHI, H.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. et al. Effect of b-mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. **Theriogenology**, v.46, n.6, p.1009-1015, 1996.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T. et al. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.191-200, 1996.
- YANG, N.S.; DUFF, R.; LU, K.H. et al. Effect of storage temperature and time on the viability of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.297, 1991.
- YOUNG, L.E.; BUTTERWITH, S.C.; WILMUT, I. Novel method for quantifying mRNA levels in single embryos. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.192, 1998.