

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MÔNICA FERREIRA ACCORSI

**Avaliação de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença
de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação**

PIRASSUNUNGA – SP

2008

RESUMO

ACCORSI, M.F. **Avaliação de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação.**

2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Tendo em vista a possibilidade de que a adição de ácidos graxos ao meio de cultivo embrionário aumente a sobrevivência ao congelamento, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de quatro ácidos graxos isoladamente ao meio de cultivo, dois do grupo ômega 6 (ácido linoléico e ácido linoléico conjugado) e dois do grupo ômega 3 (ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico), na produção de embriões, no número de células, na quantidade de lipídeos, na taxa de re-expansão da blastocelule após 48 horas de cultivos pós-descongelamento, na taxa de eclosão pós-descongelamento e na taxa de gestação. Para tal, os oócitos bovinos colhidos de ovários de vacas abatidas foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro* em atmosfera de 5% CO₂ em ar, à 38,8°C e máxima umidade. No cultivo, foi adicionado isoladamente um destes ácidos graxos, e foram avaliadas a taxa de clivagem, e a produção de embriões no sétimo e oitavo dia de cultivo. No sétimo dia, os blastocistos expandidos foram congelados com 1,5M de etileno glicol. Eles permaneceram nesta solução por 9 minutos antes de serem envasados e seguirem para a máquina de congelamento numa taxa de resfriamento de 0,5°C/minuto até chegarem à temperatura de -32°C. Dos embriões que foram congelados, alguns seguiram para o descongelamento e voltaram para o cultivo *in vitro* para avaliação da re-expansão e taxa de eclosão pós-descongelamento. Outros foram transferidos para receptoras sincronizadas para avaliação da taxa de gestação. Outros grupos de embriões permaneceram até o oitavo dia de cultivo e foram corados com *Hoechst 33342* para contagem dos núcleos, e corados com *Nile Red* para avaliação do conteúdo total de lipídeos. Em geral, a adição isolada de ácidos graxos do grupo ômega 6 (CLA e LA) na produção *in vitro* de embriões bovinos aumentou a taxa de sobrevivência ao congelamento (criotolerância), no entanto, não houve um aumento no número de células, nem diferença no conteúdo total de lipídeos nos embriões analisados. A taxa de gestação também não diferiu estatisticamente entre os grupos testados *in vivo*, porém foi observado um aumento de 200% na taxa de gestação dos embriões cultivados na presença de CLA. Novos estudos devem ser desenvolvidos para comprovar o efeito do aumento da criotolerância e melhorias nas taxas de gestações dos embriões, além de estudos da composição de lipídeos nos embriões e membranas.

Palavras chaves: ácidos graxos, embriões bovinos *in vitro*, criopreservação.

ABSTRACT

ACCORSI, M.F. **Assessment of bovine embryos grown *in vitro* in the presence of fatty acids and their survival after cryopreservation.** 2008. 77 f. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

In the view of the possibility that the addition of fatty acids in the embryo growing medium increase the survival rate after cryopreservation, this study was proposed to evaluate the effect of the addition of four fatty acids in culture medium, two of the omega 6 group (linoleic acid and conjugated linoleic acid) and two of the omega 3 group (eicosapentainoic acid and docosahexaenoic acid), in the rate of production of blastocysts, blastocyst cell number, blastocyst amount of lipids, re-expansion of blastocyst rate after 48 hours of culture post-thaw, post-thaw hatching rate and pregnancy rate. The oocytes obtained by puncture of slaughterhouse cows were matured *in vitro*, fertilized *in vitro* and cultured *in vitro* in an atmosphere of 5% CO₂ in air, to 38,8°C and maximum moisture. Fatty acids were supplemented individually and cleavage rate and production of embryos in the seventh and eighth days of culture were assessed. On seventh day, the expanded blastocysts were frozen with 1.5M of ethylene glycol. They remained in this solution for nine minutes before introduction in a straw followed and then in a freezing machine with a chilling rate of 0,5°C/minute until temperature of -32°C. Frozen embryos were then divided in two groups: one was thawed and returned to *in vitro* culture in other to assess the re-expansion and post-hatching rate, and other was transferred to synchronized recipients to assess the pregnancy rate. Another unfrozen group of embryos were stained with *Hoechst 33342* for counting the nuclei, or stained with *Nile Red* to estimate the lipids contents. In general, the addition of fatty acids omega 6 group (LA and CLA) increased the survival rate to the freezing (cryotolerance), however, there was no increase in the number of cells, or difference in the lipids contents. In the CLA treated embryos, the pregnancy rate of the frozen embryos did not differ from groups tested *in vivo*, but there was a 200% increase in the pregnancy rate. Further studies should be developed to prove the improvements in the rates of pregnancies of omega 6 treated embryos, besides a study of the composition of lipids of embryos and membranes should be conducted.

Keywords: fatty acids, *in vitro* bovine embryos, cryopreservation.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões facilita e sofisticada o comércio de animais principalmente provenientes de linhagens de alto padrão genético e de grande expressão econômica e científica (DE BEM et al., 1995; LÔBO et al., 1996).

A produção em larga escala de embriões bovinos produzidos *in vitro* é dependente da produção de um grande número de embriões de alta qualidade. Embora a produção *in vitro* de embriões bovinos seja muito difundida e empregada há algumas décadas, a eficiência da técnica ainda é pouco satisfatória, e apenas cerca de 40% dos oócitos maturados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto. Mais importante, quando estes blastocistos obtidos *in vitro* são submetidos à criopreservação, a eficiência média do processo baixa ainda mais e a taxa de gestação pós-descongelamento é menor que 10% apresentando variações de resultados.

A alta sensibilidade dos embriões derivados *in vitro* para criopreservação pode ser justificada por diferenças morfológicas, celulares, metabólicas e fisiológicas entre as duas categorias de embriões (LEIBO e LOSKOTOFF, 1993; RIZOS et al., 2002, 2008).

Tendo em vista que embriões produzidos *in vivo* são criopreservados com sucesso, possivelmente, a baixa eficiência do método está relacionada às condições sub-ótimas de cultivo, desde a maturação até o desenvolvimento embrionário *in vitro* (NIEMANN, 1995; SEIDEL, 2006; LONERGAN et al., 2006).

Um dos problemas patentes do desenvolvimento embrionário *in vitro* é a síntese ou o acúmulo excessivo de lipídios no citoplasma dos embriões induzido pela presença de soro fetal bovino (SFB) e outros componentes no meio de cultura (SHAMSUDDIN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994; ABE et al., 1999; PEREIRA et al., 2008a, 2008b). É descrito que o excesso lipídico pode causar alteração na fluidez e função da membrana plasmática ou danos ao citoesqueleto e às junções célula-célula. Visando contornar estes efeitos

prejudiciais, pesquisadores procuraram desenvolver sistemas de cultivo livre de soro e de ácidos graxos onde o soro fetal é substituído pela albumina bovina fração livre de ácidos graxos (FERGUSON e LEESE, 1999) ou meios suplementados com agentes antioxidantes como a Vitamina E que diminuem o impacto do oxigênio sobre os lipídeos (REIS et al., 2002).

A remoção do SFB dos meios de cultivo é uma alternativa inviável, que encerra uma grande dificuldade se associado à diminuição da taxa de oxigênio, quando se considera a produção em grande escala de embriões bovinos destinados à criopreservação, devido, principalmente, ao tempo necessário para retirar as células do *cumulus*, separadamente para o conjunto de complexos *cumulus-oócito* de cada doadora e seus acasalamentos.

Uma alternativa para tentar diminuir o acúmulo de lipídeos nos embriões e influenciar pouco no processo como os embriões são produzidos, é a utilização dos ácidos linoléicos conjugados, também conhecidos como ácidos ruminóicos. Eles são um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico produzido a partir da biohidrogenação bacteriana no rúmen (KEPLER et al., 1966). A partir do estudo pioneiro de Ha e colaboradores (PARIZA et al., 2001) demonstrando o efeito inibitório do ácido linoléico em neoplasias epidérmicas induzidas pelo benzeno-pireno em camundongos, diversos outros trabalhos têm salientado os efeitos biológicos e fisiológicos do uso de CLA, especialmente os isômeros *cis*-9; *trans*-11 (c-9;t-11) e *trans*-10;*cis*-12 (t-10;c-12), onde, dentre os efeitos fisiológicos observados estão a diminuição da “massa” gordurosa do corpo com aumento da “massa” magra em murinos (PARK et al., 1999), redução do acúmulo lipídico durante a diferenciação de adipócitos humanos e murinos (BROMN et al., 2001; EVANS et al., 2001) e redução da síntese de gordura do leite em vacas em lactação que ingeriram CLA (BAUMGARD et al., 2002).

Mais especificamente ficou demonstrado que a adição de uma mistura de isômeros de CLA ou a forma *t*-10;*c*-12 *per-se* inibe a expressão do mRNA de genes envolvidos na lipogênese durante a diferenciação dos adipócitos (GRANLUND et al., 2003). Finalmente os ácidos graxos como os ômega 3 e

6, por exemplo, estão sendo estudados mais cuidadosamente em cultivos de células *in vitro*. Um trabalho realizado no Brasil aplicando estes suplementos demonstrou que a modificação do conteúdo de ácidos graxos altera o padrão de expressão gênica de leucócitos humanos (VERLENGIA et al., 2004).

Os ácidos graxos e lipídios são contribuintes essenciais para a integridade estrutural, funcional e metabólica do embrião pré-implantação. Apesar desta importância, os ácidos graxos têm sido negligenciados como constituintes dos meios de cultivo dos embriões sendo a sua contribuição, positiva ou não, amplamente ignorada.

Um estudo sobre a adição de ácido linoléico conjugado (CLA) ao meio de cultivo de embriões bovinos (PEREIRA et al., 2004) demonstrou um efeito positivo no aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós-criopreservação. Entretanto, os autores relatam seus resultados utilizando critérios morfológicos de re-expansão da blastocle pós-descongelamento, sem evidência de maior viabilidade *in vivo* do grupo tratado em relação aos embriões gerados em meio padrão. Esse mesmo grupo mostrou que a suplementação com CLA em meios de cultura na presença de SFB diminuiu a deposição de lipídeos no citoplasma dos embriões durante o cultivo *in vitro* e melhorou significativamente a resistência do embrião produzido *in vitro* à congelação. Neste trabalho foi avaliada a taxa de re-expansão da blastocle após descongelamento, e medida a quantidade de lipídeos (PEREIRA et al., 2008a).

Existe, portanto, a necessidade de caracterizar a contribuição dos ácidos graxos ao desenvolvimento embrionário *in vitro*, assim como assegurar que sua presença exerce um efeito benéfico no embrião. Esta dissertação teve o propósito de investigar os efeitos da adição de quatro ácidos graxos: ácido linoléico conjugado (CLA), ácido linoléico (LA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaheptaenóico (DHA) isoladamente aos meios de cultivo para produção de embriões. Para tanto, foram analisadas a taxa de desenvolvimento ao estágio de blastocisto e a qualidade dos mesmos (estimada pelo número de células), a concentração de lipídeos estimada pelo corante *Nile Red*, a viabilidade pós-descongelamento medida pela re-

expansão da blastocle e a taxa de gestação aos 90 dias pós-transferência de embriões em receptoras sincronizadas.

e os demais grupos não diferiram entre si. No trabalho de Tominaga et al. (2000), a contagem de núcleos utilizando o LAA e controle não diferiu (121,6 x 121,5 frescos, e 93,0 x 91,2 congelados, respectivamente). Garcia (2004), obteve um número de núcleos contados para os meios suplementados com SFB de 122,7, e meios cultivados sem SFB de 126,8. Assim, de modo geral, a adição de ácidos graxos não interferiu no número de células, onde somente o grupo EPA obteve resultados menores que os demais. Estes resultados implicam que o aumento na taxa de sobrevivência nos grupos suplementados com ômega 6 não é mediado por um aumento no número de células.

Na técnica de coloração com o Nile Red, a quantidade de luz fluorescente emitida é correlacionada com o conteúdo lipídico. Ela é altamente sensível e tem repetibilidade (FERGUNSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001) onde um único oócito ou embrião pode ser analisado (GENICOT et al., 2005). Existem outras técnicas para medir o conteúdo lipídico, como a cromatografia gasosa, o HPLC, corante *Sudan Black*, porém cada uma analisa apenas parte do embrião, ou há a necessidade de utilização de vários embriões para um único resultado.

A presença do soro no meio de cultivo de embriões acumula grandes gotas lipídicas e eletro densas, e seu conteúdo tem proporções significantes de triglicerídeos (ABE et al., 2002). Ferguson e Leese (1999), também relataram que o tipo de lipídeo mais acumulado durante o desenvolvimento de mórulas para blastocistos em culturas com SFB são os triglicerídeos.

Para Sata et al. (1999), o acúmulo é de ácidos graxos saturados de cadeia longa como o ácido palmítico e esteárico. Mas a importância das gotas de lipídeos nos oócitos e embriões de mamíferos ainda permanece com dados insuficientes.

Os resultados coletados de avaliação do conteúdo lipídico nos embriões não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Estes dados foram diferentes dos resultados obtidos por Pereira et al. (2007,

2008a) que afirmaram que o acúmulo de lipídeos é reduzido com a adição de CLA aos meios de cultivo com SFB. Os embriões neste caso foram classificados em magros, intermediários e gordos de acordo com as observações feitas sob microscópio aplicando a óptica de Nomarski.

Leroy et al. (2005), avaliaram o conteúdo lipídico de oócitos e embriões com o corante *Nile red*, onde foi possível observar que mórulas cultivadas na presença de SFB emitiam uma maior quantidade de luz fluorescente que as cultivadas somente com a adição de BSA-FAF, e concluíram que a presença de SFB aumentou em 30% a quantidade de gotas lipídicas.

Ferguson e Leese (1999) avaliaram o conteúdo de triglicerídeos em oócitos imaturos, maturados, embriões de duas células, e blastocistos cultivados com a presença ou ausência de SFB em atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. A quantidade inicial nos oócitos é de 59ng, e depois da maturação *in vitro* passa para 46ng. Os embriões de duas células apresentaram 34ng, e os blastocistos eclodidos cultivados sem SFB mantiveram o valor próximo de triglicerídeos (33ng). Quando estes embriões foram cultivados na presença de soro, a quantidade de triglicerídeos foi de 62 ng, onde concluíram que os triglicerídeos podem servir como fonte de energia durante os estágios iniciais (maturação e fecundação), e a presença do SFB causou ou uma síntese excessiva ou um acúmulo excessivo de triglicerídeos nos estágios mais avançados. Pois tem sido relatado que culturas de células de mamíferos facilmente incorporam os ácidos graxos do meio de cultivo.

Em humanos (HAGGARTY et al., 2006), foram utilizados ácidos graxos marcados com C¹³, e estes após duas horas de cultivo com embriões de 8 células, foram incorporados nos triglicerídeos e nos fosfolipídeos. Embriões que de desenvolvem além do estágio de 4 células, possuem significativamente maiores concentrações de ácidos graxos insaturados e menores de saturados. Eles também concluíram que o ácido linoléico é mais importante nos estágios finais de desenvolvimento, e o ácido palmítico nos estágios iniciais. O ácido linoléico estimula a proteína Kinase C que é crítica

no crescimento celular e diferenciação, e é o ácido graxo que tem sido mais utilizado nos estudos de fertilidade animal.

Segundo Mersmann et al. (2001), as respostas do CLA podem diferir entre as espécies devido ao padrão do metabolismo ser espécie-específico, tornando assim, a comparação de resultados delicada. É o mesmo que diz Pereira et al. (2008a), que o mecanismo de ação do *trans*-10, *cis*-12CLA não é totalmente esclarecido e os estudos *in vitro* e *in vivo* não estão sempre de acordo, possivelmente porque isômeros de CLA atuam em diferentes caminhos e com diferentes consequências quando administrados para diferentes espécies.

Durante este estudo, foi desenvolvido um experimento piloto utilizando atmosfera controlada de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ onde os embriões tiveram suas células do *cumulus* totalmente removidas, e foram testados somente os grupos controle, CLA e LA suplementados com 1% de SFB. Paralelamente a este experimento, outros embriões foram produzidos como no processo padrão (5% CO₂ em ar e com células do *cumulus*). No oitavo dia de cultivo foi avaliada a quantidade de lipídeos dos embriões nas duas atmosferas testadas. A quantidade de lipídeos medida pela intensidade de fluorescência foi diferente estatisticamente dentro do grupo LA, ou seja, os embriões produzidos com a adição de LA em atmosfera controlada apresentaram uma menor quantidade de lipídeos que os embriões do mesmo grupo produzidos em atmosfera de 5% CO₂ em ar. Os embriões do grupo CLA e do controle também apresentaram uma redução na quantidade de lipídeos quando a atmosfera de O₂ foi reduzida para 5%, mas esta não foi significativa. Este resultado indica que um possível fator para a diminuição na quantidade de lipídeos dos embriões seria a produção destes em atmosfera controlada. Este pode ser um caminho a ser seguido, utilizando somente os grupos com melhores taxas de re-expansão pós-descongelamento (CLA e LA) agora em atmosfera controlada, para produzir embriões, congelá-los e descongelá-los e transferi-los para receptoras sincronizadas. Além da tentativa válida de se fazer um experimento

utilizando uma proporção entre a quantidade de ômega 3/ ômega 6 utilizada.

Quando avaliamos a taxa de gestação aos 90 dias, os grupos de embriões frescos apresentaram uma produção similar, sem diferenças significativas, assim como os transferidos após serem descongelados. Todavia, pôde ser observado que os embriões do grupo controle obtiveram uma diminuição de 77% no seu potencial de desenvolvimento e o grupo tratado com EPA apresentou uma diminuição de 69,7%. Somente o grupo tratado com CLA, no entanto, apresentou uma diminuição menor do potencial, de apenas 37,5%. Isso pode sugerir que de alguma forma, a presença do CLA melhorou a sobrevivência pós-congelamento.

Para Diez et al. (2001), quando o embrião passa pelo processo de delipidação altera o seu potencial de desenvolvimento, sugerindo que o armazenamento ou o estoque de lipídeos herdado maternalmente interfere na recuperação metabólica pós-descongelamento. A sobrevivência *in vitro* foi melhor após a delipidação, porém as transferências destes embriões resultam em taxas de prenhez muito baixas.

No presente estudo, foi obtido um aumento na viabilidade do embrião (taxa eclosão) pós-descongelamento de embriões tratados com os ácidos graxos do grupo ômega 6. A quantidade total de lipídios não foi modificada, e não houve perdas na taxa de gestação em comparação com o grupo controle, sendo assim, a adição destes não apresenta um efeito negativo na taxa de gestação.

Em resumo, embriões tratados com os ácidos graxos do grupo ômega 6 (LA e CLA) apresentaram melhores resultados quando os embriões foram submetidos à técnica de congelamento. Estes resultados aparentemente não foram gerados pelo aumento de velocidade de clivagem, da diminuição da morte celular (número de núcleos) e tampouco pela variação da quantidade total de lipídeos (*Nile Red*). Sendo assim, a hipótese mais provável é que os ácidos graxos atuem modificando a composição de lipídeos das membranas dos embriões, influenciando na sua fluidez que é de grande importância quando trabalhamos com criopreservação celular.

CONCLUSOES E PERSPECTIVAS

- A suplementação com CLA e LA na produção de embriões aumentou a criotolerância, no entanto, este efeito não foi mediado por uma diminuição no conteúdo total de lipídeos, e tampouco por um aumento no número de células
- No experimento piloto, a atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂, influenciou na diminuição da quantidade total de lipídeos e isso poderia nos levar a confirmação de que a utilização de ácidos graxos do grupo ômega 6 (CLA e LA) em meios suplementados com soro e em atmosfera controlada poderiam resultar em embriões mais capazes de sobrevivência pós-congelamento/descongelamento
- Outros estudos devem ser desenvolvidos para comprovar o efeito do aumento da criotolerância e melhorias nas taxas de gestações em embriões produzidos *in vitro* pós-congelamento/descongelamento, e para avaliar a modificação na composição dos lipídeos dos embriões, tanto dos lipídeos presentes na forma de estoque de energia como os presentes nas membranas, e sua relação com o sucesso no congelamento.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY,G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C. Differences in lipids composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, 2000 (abstr).

ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal Reproduction Development**, v. 49,p. 193-202, 2003.

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

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

ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.

ANASH, G.A. and BUCKLAND, R.B. Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels, and the relationships of these lipids with fertility of frozen-thawed and fresh semen. **Poultry Science**, v. 61, p. 623-637, 1994.

ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S.B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 33, 589-599, 1996.

AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Austr. J. Sci. Res.**, v. 134, p. 581, 1951.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryo: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91-148, 1995.

BAUNGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.80, p. 1285-1293, 2002.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p.147-158, 1982.

BROWN, J.M.; HALVORSEN, Y.D.; LEA-CURRIE, Y.R.; GEIGERMAN, C.; McINTOSH, M. *Trans-10, cis-12* but not *cis-9, trans-11*, Conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2316-2321, 2001.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v. 43, p. 1115-1128, 1995.

CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. **Nature**, v. 168, p. 697-698, 1951.

CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v.184, p.466-467, 1959.

CHARPIGNY, G.; GUESNET, P.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; MERMILLOD, P.; HUMBLLOT, P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. **Les Actes du BRG**, v. 4, p. 159-172, 2003.

CHO, S.R.; CHO, S.K.; LEE, S.L.; CHOE, S.Y.; RHO, G.J. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum free medium. **Journal Assist Reproduction Genetic**, v. 19, p. 487-492, 2002.

DE AZAMBUJA, R.M.; WATANABE, Y.F.; PERIPATO, A.C.; WATANABE, M.R.; VILA, R.A.; VERSIANI, A.; MENDES, F.C.; LOBO, R.B. Primeiras prenhez do Brasil utilizando fecundação *in vitro* em vacas Nelore PO. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.24, p. 234, 1996.

DE BEM, A.R.; RUMP, R.; LUNA, N.M.; OFUGI, K.; COELHO, J.; AVELINO, M. Banco brasileiro de germoplasma animal. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, Belo Horizonte. Anais, p. 89-97, 1995.

DE PAZ, P.; SANCHEZ, A.J.; FERNANDEZ, J.G.; CARBAJO, M.; DOMINGUEZ, J.C.; CHARMORRO, C.A.; ANEL, L. Sheep embryos cryopreservation by vitrification and conventional freezing. **Theriogenology**, v. 42, p. 327-338, 1994.

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J.P. Delipidating *in vitro* produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology** v. 55, p. 923-936, 2001.

DIEZ, C.; LE BOURHIS, D.; HEYMAN, Y.; RENARD, JP. Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro*

and on the freezing tolerance of blastocysts. **Theriogenology** v. 45, p.166, 1996.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes – a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

DUMOULIN, J.C.; MEIJERS, C.J.; BRAS, M.; COONEN, E.; GERAEDTS, J.P.; EVERS, J.L. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. **Human Reproduction**, v. 14, p. 465-469, 1999.

EVANS, M.; PARK, Y.; PARIZA, M.W.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; McINTOSH, M. *Trans-10,cis-12* conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferators activated receptor γ 2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, v. 36, p. 1223-1232, 2001.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein free media. **Theriogenology**, v. 43, p. 913-926, 1995.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407-426, 1984.

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. 151-170, 2001.

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 Development**, v. 58, p. 186-195, 2001.

FERGUNSON, E.M. & LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 373-378, 1999.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 483-489, 1997.

FUKUI, Y.; MCGOWAN, L.T.; JAMES, R.W.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 92, p. 125-131, 1999.

FUKUDA, Y.; ICHIKAWA, M.; NAITO, K.; TOYODA, Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. **Biology Reproduction**, v. 42, p. 114-119, 1990.

GARCIA, S.M. Bloqueio e morte celular programada em embriões bovinos: efeitos da fonte de suplementação protéica e da cinética do desenvolvimento. Pirassununga, 2004, 65p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

GENICOT, G.; LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; DONNAY, I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 1181-1194, 2005.

GRANLUND, L.; PEDERSEN, J.I.; NEBB, H.I. Impaired lipid accumulation by *trans*-10, *cis*-12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1687, p. 11-22, 2005.

GRANLUND, L.; JUVET, L.K.; PEDERSEN, J.I.; NEBB, H.I. *Trans*-10, *cis*-12 Conjugated linoleic acid prevents triacyl glycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPAR γ modulator. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1441-1452, 2003.

GUERIN, P.; MOUATASSIN, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p. 175-189, 2001.

GUR, M.I.; HARWOOD, J.L. Lipid Biochemistry: An Introduction. London: Chapman and Hall, p. 406, 1991.

HAGGARTY, P.; WOOD, M.; FERGUSON, E.; HOAD, G.; SRIKANTHARAJAH, A.; MILNE, E. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. **Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 766-773, 2006.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MC CAULEY, A.D.; MOYER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, 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 of oocytes recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. **Journal Animal Science**, v. 76 (suppl. 3), p. 52-74, 1998.

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

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae.

Theriogenology, v. 52, p. 497-504, 1999.

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. 837-847, 1996.

HYTTEL, P.; NIEMANN, H. Ultrastructure of porcine embryos following development *in vitro* versus *in vivo*. **Molecular Human Reproduction**, v. 27, p. 136-144, 1990.

IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; GOTO, Y.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology**, v. 47: 347, 1997.

IWASAKI, S.; HAMANO, S.; KUWAYAMA, M.; YAMASHITA, M.; USHIJIMA, H.; NAGAOKA, S.; NAKAHARA, T. Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized *in vitro*. **J. Exp. Zool.**, v. 261: 79-85, 1992.

JOSE, A.A.F.B.V. Efeito do ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 na regulação da lipogênese e expressão gênica em culturas de tecido adiposo de suínos em crescimento. Piracicaba, 2005, 60p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

JOLY, T.; NIBART, M.; THIBIER, M. Hyaluronic acid as a substitute for proteins in the deep freezing of embryos from mice and sheep: an *in vitro* investigation. **Theriogenology**, v. 37, p. 473-480, 1992.

KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect on conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocyst produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.65, p. 1127-1134, 2001.

KAIDI, S.; DONNAY, I.; BRALION, V.; MASSIP, A.; DESSY, F. Comparison of two co-culture systems for the assessment of bovine blastocyst survival after cryopreservation. **Journal of Reproduction Fertility**, Abstract series 18, p. 98, 1996.

KAIDI, S.; DONNAY, I.; LAMBERT, P.; DESSY, F.; MASSIP, A. Osmotic behavior of *in vitro* produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. **Cryobiology**, v.41, n. 1, p. 106-115, 2000.

KAIDI, S.; VAN LANGENDOCKT, A.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. 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.

KARJA, N.W.K.; OTOI, T.; WONGSRIKEAO, P.; MURAKAMI, M.; AGUNG, B.; FAHRUDIN, M.; NAGAI, T. *In vitro* development and post-thaw survival of blastocysts derived from domestic cats. **Theriogenology**, v. 65, p. 415-423, 2006.

KEPPLER, C.R.; IRNOS, K.P.; McNEILL, J.J.; TOVE, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241: 1350-1354, 1966.

KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 333-339, 1996.

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

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

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morule/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, n. 5, p. 741-756, 2000b.

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, n. 2, p. 313-326, 2000c.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in Glycerol 1,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v.31, n. 5, p. 415-422, 1994.

LAOWTAMMATHRON, C.; LORTHONGPANICH, C.; KETUDAT-CAIRNS, M.; HOCHI, S.; PARNPAI, R. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology**, v. 64, p. 1185-1196, 2005.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of *in vitro* produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.473-485, 1999.

LEIBO, S.P. Commercial production of pregnancies from one step diluted frozen-thawed bovine. **Theriogenology**, v.25, p.166, 1986.

LEIBO, S.P. Techniques for preservation of mammalian germ plasm. **Animal Biotechnology**, v. 3, p. 139-153, 1992.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, v. 69, p. 37-47, 2008.

LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.

LEIBO, S.P.; ODA, K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. **Cryo-letters**, v. 14, p. 133-144, 1993.

LEIBO, S.P.; POLLARD, J.W.; MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of “reassembled” *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 43, p. 265, 1995 (abstr).

LEROY, J.L.M.R.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOM, A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.76-78, 2005.

LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PAARK, H.J.; KIM, J.J.; LEE, S.H.; HWANG, W.S.; LEE, B.C.; KANG, S.K. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v. 67, p. 293-302, 2007.

LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M.A.; KEEFE, D.L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced Telomere attrition, chromosome instability and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 26, p. 31998-32004, 2003.

LÔBO, R.B. Programa de Melhoramento genético da raça Nelore. 3. ed. Ribeirão Preto: **PMGRN**, p. 104, 1996.

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

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M.P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, Sep., 117 (1), p.159-167, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FARIN, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003.

LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. Review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.

LU, K.H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; MCGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Vet. Rec.**, v.121, p.259-260, 1987.

MARTINEZ, A.G.; MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; BROGLIATTI, G.M. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 757- 767, 1998.

MASSIP A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; ECTORS, F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 117-129, 1989.

MASSIP A.; MERMILLOD, P.; WILDS, C.; DESSY, F. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen blastocysts produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 65- 69, 1993.

MASSIP A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, n° 11, p. 3004- 3011, 1995.

MASSIP A.; MERMILLOD, P.; VAN LANGENDONKT, A.; REICHENBACH, H.D.; LONERGAN, P.; BERG, U.; CAROLAN, C.; DE ROOVER, R.; BREM, G. Calving outcome following transfer of embryos produced *in vitro* in different conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p. 1- 10, 1996.

MASSIP A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction Domestic Animal**, v. 36, p. 49- 55, 2001.

MAZUR, P. Slow-freezing injuries in mammalian cells. In: the freezing of mammalian embryos. Ciba Foundation, **Symposium 52 (new series)**, p. 19-48, Excerpta medica, Amsterdam, 1977.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v. 247, p. 1442, 1984.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; SEIDEL, G.E.Jr. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology Reproduction**, v. 78, p. 2-12, 2008.

MERSMANN, A. Crystallization technology handbook. CRC Press, 832 pp, 2001.

MERYMAN, H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. **Cryobiology**, v. 8, p. 489-500, 1971.

MOORE, K.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.J.; KRAMER, J.M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, p. 1316- 1325, 2007.

MORRIS, G.J.; CLARK, A. Cells at low temperatures. In: **The effects of low temperatures in biological systems**. (editors BWW grout, GJ Morris). London: Edward Arnold, p. 72- 118, 1987.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; SEAMARK, R.F.; NOTTLIN, M. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 113- 118, 1994.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; NOTTLIN, M. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature**, p. 374- 416, 1995.

NIEMANN, H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived *in vitro* and *in vivo*. “**Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategies**”, **15 Symposium Int. Di Zootecnica**, p. 117-128, 1995.

PALASZ, A.T.;MAPLETOFT, E.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, n° 2, p. 127-149, 1996.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 283- 298, 2001.

PARK, Y.; STORKSON, K.J.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Evidence that the *trans-10,cis-12* isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v. 34, p. 235-241, 1999.

PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

PEIXER, M.A.; SOUZA, R.V.; RUMP, R.; DE BEM, A.R.; NETO, M.A.P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargem. **Zootecnia**, v. 32, p. 49, 1994.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTA, P.V.; BESSA, R.J.B.; MARQUES, C.C. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by *trans-10;cis-12* conjugated linoleic acid (CLA). **Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, Bahia, Brasil, 2004.

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 (10 t , 12 c CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10, cis12* conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008a.

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

PETERSON, D.G.;MATITASHVILI, E.A.; BAUMAN, D.E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increase *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 3098-3102, 2003.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. *In Vitro*-Matured/*in vivo*-Fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free cultured media. **Biology Reproduction**, v. 45, p. 736-742, 1991.

PINYOPUMMINTR, T.; BAVISTER, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v. 41, p. 1241-1249, 1994.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 287, 1993.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-106, 1994.

RALL, W.F. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for the application to the conservation of salmonid fishes. **Genetic Conservation of Salmonid Fishes**, New York, 1992.

RAYOS, A.A.; TAKAHSI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Quick freezing of one-cell mouse embryos using ethylene glycol with sucrose. **Theriogenology**, v. 37, p. 595-603, 1992.

REIS, A.; MAcCALLUM, G.J.; McEVOY, T.G. Accumulation and distribution of neural lipid droplets is non-uniform in ovine blastocysts produced *in vitro* in either the presence or absence of serum. **Reproduction Fertility Development**, v. 17, p. 815-823, 2005.

REIS, A.; McCALLUM, G.J.; STAINES, M.E.; EWEN, M.; LOMAX, M.A.; ROOKE, J.A. McEVOY, T.G. Vitamin E supplementation improves bovine embryo development *in vitro*. **Reproduction**, Abstract Series, v. 28, p.15-16, 2002.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; EWEN, M.; STAINES, M.E. LOMAX, M.A. Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of serum. **Reproduction**, p. 30, 2003 (abstr).

RICHARD, M.W.; SPTIZER, J.C.; WARNER, M.B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 300-306, 1986.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryos development and quality. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 44-50, 2008.

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*. **Molecular Reproduction Development**, v. 62, p. 320-322, 2002.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or the absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance,

and messenger RNA expression. **Biology Reproduction**, v. 68, p.236-243, 2003.

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.

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOCHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing médium during early embryonic development. **Journal Reproduction Development**, v. 45, p. 97-103, 1999.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocyst developed either in serum free medium or in conventional co-culture epithelial cells. **Journal of Veterinar Medicine**, v. 41, p. 307-316, 1994.

SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS**, Colorado State, University. Proceedings... p. 7-14, 1984.

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

SEIDEL, G.E.; ELSDEN, R.P.; BRINK, Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. **Theriogenology**, v. 33, p. 322, 1990 (abstr).

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.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the implantation of human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membranes polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochemistry Biophys Acta**, v. 137, p. 779-789, 1984.

SUZUKI, T.; YAMAMOO, M.; OOE, M.; SAKATA, A.; MATSUOKA, M.; NISHIKITA, M.; OKOMATO, K. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol, and 1,2 propanediol. **Theriogenology**, v. 34, p. 1051-1057, 1990.

TARIN, J.J.; TROUNSON, A.O. Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. **Biology Reproduction**, v. 49, p. 1362-1368, 1993.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, p. 137-145, 2000.

TAKAHASHI, M.; SAKA, N.; TAKAHASHI, H.; KANAI, Y.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, Assessment of DNA damage in individual hamster embryos by comet assay. **Molecular Reproduction Development**, v. 54, p. 1-7, 1999.

THOMPSON, J.G. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction Fertility Development**, v. 9, p. 341-354, 1997.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 263-275, 2000.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pré-elongation development of ovine embryos. **Biology Reproduction**, v. 53, p. 1385-1391, 1995.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16 cell stage. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62 (4), p. 465-467, 2000.

TROUNSEN, A.; MOHR, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature**, v. 305, p. 707, 1983.

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biology Reproduction**, v. 60, p. 534-539, 1999.

USHIJIMA, H.; YPSHIOKA, H.; ESAKI, R.; TAKAHASHI, K.; KUWAYAMA, M.; NAKANE, T.; NAGASHIMA, H. Improved survival of vitrified *in vivo*-derived porcine embryos. **Journal of Reproduction Development**, v. 50, p. 481-486, 2004.

VAJTA, G.; HYTELL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification, *in straw* direct reydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n. 1, p. 9-17, 1997.

VAN LANGENDOUCT, A.; AUQUIER, P.; DONNAY, I.; MASSIP, A.; DESSEY, F. Acceleration of *in vitro* bovine embryo development in the presence of fetal calf serum. **Theriogenology**, v. 45, p. 194, 1996.

VAN LANGENDOUCT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBRIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A.; DESSEY, F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, 109: 87-93, 1997.

VAN SOOM, A.; MAHMOUDZADEH, A.R.; CHRISTOPHE, A.; YSEBAERT, M.T.; KRUIF, A. Silicone oil used microdrop culture an affect bovine embryonic development and freezability. **Reproduction Domestic Animal**, v. 36, p. 169-176, 2001.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with ou without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.

VARISANGA, M.D.; DONG, Y.J.; MTANGO, N.R.; SUZUKI, T. Comparison of the effets of using standard and simple portable CO₂ incubators on the *in vitro* developmental competence of bovine embryos reconstituted by somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, v. 58, p. 77-86, 2002.

VERLENGIA. R.; GORJÃO; R.; KANUNFRE, C.C.; BORDIN, S.; DE LIMA, T.M.; MARTINS, E.F.; CURI, R. Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docohexaenoic acid in proliferation, cytokine production, and pleitropic gene expression in Jurkat cells. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.15, p.657-665, 2004.

VOECKEL, S.A.; HU, Y.X. Use of ethylene-glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. **Theriogenology**, v.3, p.687-697, 1992.

WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F.; PERIPATO, A.C.; VILA, R.A.; FIRMINO, F.; NOGUEIRA, M.F.G.; PUPIM, F.P.V.; LOBO, R.B. Taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro* após vitrificação. **Arq. da Fac. de Med. Vet., UFRGS**, Porto Alegre-RS, v. 24, p. 264, 1996.

WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E.B.; QUETGLAS, M.D.; GARCIA, J.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; SILVA FILHO, I.R.; VANTINI, R. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro*. **ARS Veterinária**, v. 2, p. 191, 1993.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; GALERANI, M.A.V.; VILA, R.A.; LOBO, R.B. The influence of B2 and a modified CR-2 medium on the *in vitro* production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. **Theriogenology**, v. 51, p. 251, 1999.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, n. 5315, p. 125-126, 1971.

WHITTINGHAM, D.G. Symposium on freezing of ova and embryos-synopsis papers. Freezing embryos of laboratory species. **Cryobiology**, v. 15, p. 367-369, 1978.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v. 92, n. 26, p. 686-190, 1973.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.J.R.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-901, 2001.

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

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447-454, 2001.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A.. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, p. 271-278, 2002.