

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS NO INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES ZEBUÍNOS PRODUZIDOS IN VITRO¹

RITA MARIA LADEIRA PIRES², RAFAEL HERRERA ALVAREZ², ANA CRISTINA LIGORI², LIA DE ALENCAR COELHO^{2,3},
ANTÔNIO CAMPANHA MARTINEZ²

¹Recebido para publicação em 03/01/05. Aceito para publicação em 12/05/05.

²Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Rua Heitor Penteado, 56, Centro, Nova Odessa, SP, CEP 13460-000. E-mail: pires@iz.sp.gov.br

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP

RESUMO: Embriões bovinos produzidos in vitro (FIV) apresentam uma alta incidência de anomalias cromossômicas. Porém, ainda não foi determinado se esse quadro acontece em embriões zebuínos. O presente trabalho objetivou avaliar a frequência de alterações cromossômicas de embriões FIV, de origem zebuína. Foram utilizados embriões FIV nos estágios de 2; 4; 8; 16 células e mórulas, produzidos a partir de oócitos coletados de ovários de vacas Nelore abatidas. Como controle foram utilizadas mórulas recuperadas de vacas Nelore superovuladas (PIV). A leitura do cariótipo foi realizada em microscópio ótico após preparo das amostras pelo método de coloração convencional (Giemsa) e as diferenças foram estabelecidas pelo teste de χ^2 ou χ^2 com correção de Yates. Foram encontradas anomalias cromossômicas em 29,9% (32/107) dos embriões FIV e 13,0% (3/23) dos embriões PIV analisados ($P>0,05$). Igualmente, a incidência de anomalias cromossômicas não foi influenciada pelo estágio de desenvolvimento dos embriões. As alterações cromossômicas encontradas, tanto nos embriões FIV como nos PIV, foram mixoploidias e poliploidias. Dos embriões FIV que apresentaram anomalias cromossômicas, 59,4% eram do sexo feminino e 40,6% do masculino ($P>0,05$). Concluiu-se que aproximadamente um terço dos embriões zebuínos FIV apresenta anomalias cromossômicas e sua incidência não está associada a um estágio de desenvolvimento embrionário específico.

Palavras-chave: cromossomo, citogenética, embrião, produção in vitro

CHROMOSOMAL ABNORMALITIES AT EARLY STAGES OF DEVELOPMENT IN ZEBU EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

ABSTRACT: Bovine embryos produced in vitro (IVF) have a high incidence of chromosomal anomalies. However, such occurrence still was not determined in zebu embryos. The aim of the present study was to evaluate the frequency of chromosomal alterations of IVF zebu embryos. It was used IVF embryos of 2; 4; 8; 16 cells and compacted morulae derived from oocytes collected from ovaries of slaughtered Nelore cows. Morulae recovered from superovulated Nelore cows (IVP) were used as control. Embryonic cells were submitted to conventional procedures (Giemsa staining) and karyotype reading with an optical microscope. Differences between normal and abnormal karyotype was established using χ^2 test. It was found chromosomal anomalies in 29.9% (32/107) of IVF embryos and 13.0% (3/23) of IVP embryos ($P>0.05$). Also, incidence of chromosomal anomalies was not influenced by the stage of development of IVF embryos. Mixoploidy and polyploidy were the only chromosomal anomalies present in both, IVF and IVP embryos. From IVF embryos that showed chromosomal anomalies, 40.6% and 59.4% were male and female embryos, respectively ($P>0.05$). It was concluded that about one third IVF zebu embryos at early stages of development present chromosomal anomalies and their incidence is not related to a specific period of embryonic development.

Key-words: chromosome, cytogenetic, embryo, in vitro production

INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil ocupa um lugar de destaque no emprego de tecnologias relacionadas a transferência de embrião (TE). Segundo estatísticas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, o País realiza por ano aproximadamente 25000 transferências de embriões produzidos *in vitro* (FIV), colocando-se na liderança mundial nesse ramo de atividade (THIBIER, 2003).

A finalidade principal dessa tecnologia vem sendo a multiplicação de animais que apresentam características genéticas (reais ou especulativas) de alto valor de mercado. Igualmente, embora em menor escala, o emprego de embriões vem sendo cada vez mais considerado para viabilizar programas de seleção em núcleos de rebanhos submetidos ao processo de ovulação múltipla e transferência de embriões (CAMARGO, 2002).

Apesar da melhora nos processos de produção, particularmente dos sistemas de cultivo, o uso de embriões FIV freqüentemente está associado a problemas específicos de manutenção de prenhez (mortalidade embrionária precoce, abortos espontâneos), produção de bezerros "gigantes", desvio da taxa de sexo (em favor dos machos) e problemas de saúde dos bezerros nascidos (BEHBOODI *et al.*, 1995 ; GARCIA *et al.*, 2002). Esses problemas têm sido atribuídos, entre outros, às alterações celulares de ordem genética e estrutural dos embriões. FARIN e FARIN (1995) observaram uma sobrevivência quatro vezes maior dos embriões bovinos produzidos *in vivo* (PIV) quando comparados a embriões FIV. Segundo esses autores, a baixa taxa de desenvolvimento dos embriões FIV seria o resultado dos danos em nível citoplasmático e nuclear desses embriões durante o processo de produção. Existe evidência de que manipulações e/ou os métodos de cultivo *in vitro* provocam alterações estruturais e funcionais nos embriões (FUKUI *et al.*, 1991; KING *et al.*, 1992; POLARD e LEIBO, 1993; CROSIER *et al.*, 2001). Assim, sistemas de produção de embriões FIV provocariam danos na integridade dos cromossomos, resultando em menor taxa de prenhez e em alterações somáticas do embrião e do produto nascido (VIUFF *et al.*, 1999; 2000; HENDRIKSEN *et al.* 2001; FARIN *et al.*, 2001).

Sabe-se que as anomalias cromossômicas podem aparecer em qualquer etapa do processo de produção do embrião (maturação, fecundação, cultivo até blastocisto) (IWASAKI e NAKAHARA, 1990a; IWASAKI *et*

al., 1992). Na espécie *Bos taurus taurus* tem sido mostrada a existência dessas anomalias cromossômicas em embriões FIV e PIV nos estágios de 2 células até blastocisto (HARE *et al.*, 1980; KING *et al.*, 1987; IWASAKI e NAKAHARA 1990a; b; IWASAKI *et al.*, 1992; KAWARSKY *et al.*, 1996; LECHNIAK, 1996; YOSHIZAWA *et al.*, 1999; VIUFF *et al.*, 1999; 2000; 2001; SLIMANE *et al.*, 2000; LONERGAN, *et al.*, 2004). Diferentemente, não existem informações sobre a incidência de anomalias cromossômicas dos embriões da espécie *Bos taurus indicus*. Considerando que bovinos de raças européias apresentam determinadas anomalias cromossômicas, como a translocação Robertsoniana, ausentes nas raças zebuínas, não pode ser descartada a possibilidade que diferenças específicas possam acontecer também em embriões dessas duas subespécies. Essa informação é particularmente importante considerando que as raças zebuínas representam a grande maioria da população bovina do Brasil e constituem o principal mercado das empresas de FIV no País. O presente trabalho objetivou caracterizar a incidência de alterações cromossômicas de embriões zebuínos FIV em diferentes estágios de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Embriões FIV

Ovários de fêmeas zebuínas (Nelore) foram coletados em um frigorífico regional, colocados em solução salina (cloreto de sódio a 0,9 %) acrescida de estreptomicina (100 µg mL⁻¹) e penicilina (100 UI mL⁻¹), e transportados ao laboratório dentro de uma caixa térmica na temperatura de 30 a 35°C. Os oócitos, acompanhados das células do *cumulus oophorus* (COCs), foram aspirados dos folículos ovarianos no período de 4 h após o abate. Os COCs foram lavados em meio H-199, constituído de TCM suplementado com Hepes (25 mM), piruvato (2,73 mM), sulfato gentamicina (50 µg mL⁻¹) e soro fetal bovino (5%), e avaliados por critérios morfológicos. Somente foram utilizados COCs que apresentaram um *cumulus oophorus* intacto. Os COCs selecionados foram colocados em meio B-199, constituído de meio TCM 199 suplementado com Hepes (16,79 mM), bicarbonato de sódio (28,57 mM), piruvato de sódio (2,73 mM), sulfato de gentamicina (50 µg mL⁻¹) e albumina sérica bovina-BSA (4 mg mL⁻¹). A maturação dos oócitos foi realizada colocando os COCs em meio B-199 adicionado de estradiol 17β (1 µg mL⁻¹), PMSG (20 UI mL⁻¹) e hCG

(10 UI mL⁻¹), seguida de incubação durante 24h, à temperatura de 38,5°C e ambiente de 5% de CO₂ (estufa modelo 3140 da Forma Scientific, Inc.). Após maturados, os oócitos foram lavados em meio H-199 e TALP-FIV e distribuídos em gotas sob óleo mineral. Cada gota era formada de 70 µL de meio TALP-FIV-PHE, 10 µL de suspensão de espermatozoides à concentração de 10X10⁶ mL⁻¹ (preparada segundo Parrish et al., 1995), e 20 µL de suspensão contendo 10-12 oócitos. Após um período de incubação de 18 a 21h no mesmo ambiente da maturação, os oócitos (presumivelmente fecundados) foram lavados e transferidos para gotas de desenvolvimento, constituídas de 78 µL meio B-199-CEOB, 2 µL de fragmentos de células epiteliais de oviduto bovino e 20 µL de suspensão contendo 10 oócitos e cultivados nas mesmas condições da maturação. Ao alcançar os estágios de 2; 4; 8; 16 células e mórula compacta os embriões foram submetidos à análise citogenética.

Embriões PIV

Mórulas Grau I e II produzidas *in vivo* foram utilizadas como controle da incidência de anomalias cromossômicas para esse estágio de desenvolvimento. Os embriões foram obtidos de vacas Nelore superovuladas com FSH-LH conforme metodologia descrita por ALVAREZ *et al.* (1999). A lavagem dos cornos uterinos foi realizada por via cervical, utilizando um sistema de circuito fechado, no dia 7 após a inseminação (com sêmen do mesmo touro usado nos embriões FIV). Após recuperação, os embriões foram avaliados morfológicamente e em seguida foram submetidos ao processo de cariotipagem de forma semelhante aos embriões FIV.

Análise cromossômica dos embriões

Os embriões foram cultivados durante 8 a 12 horas em meio TCM, suplementado com soro fetal bovino (10%) e colchicina (0,03 µg mL⁻¹). Posteriormente foram transferidos para uma solução hipotônica (citrato de sódio 0,9%) durante 10 minutos a 20°C e em seguida os embriões foram fixados sobre uma lâmina, com metanol:ácido acético (3:1). A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico, após coloração com Giemsa.

Análise estatística de dados.

Os resultados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) ou χ^2 com correção de Yates.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 107 embriões FIV analisados, 32 (29,9%) apresentaram anomalias cromossômicas. Enquanto que, os embriões PIV (mórulas) apresentaram uma incidência de 13,0% (3/23). As mórulas FIV contribuíram com 24,1% (7/29) e os embriões de 2; 4; 8 e 16 células com 32,1% (9/28), 39,1% (9/23), 26,7% (4/15) e 25,0% (3/12), respectivamente, (P>0,05). (Figura 1).

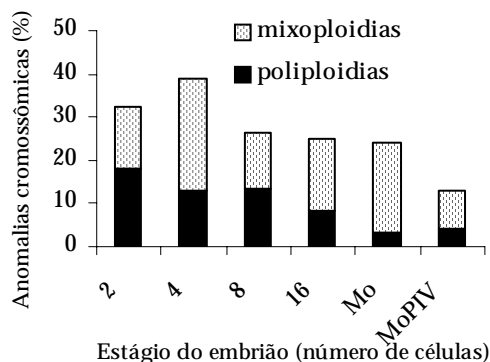


Figura 1. Anomalias cromossômicas de embriões zebuínos FIV em diferentes estágios de desenvolvimento (MoPIV = mórulas produzidas *in vivo*)

Outros autores também não evidenciaram diferenças significativas entre os diferentes estágios de desenvolvimento precoce do embrião bovino. IWASAKI e NAKAHARA (1990a) encontraram 36,8%; 26,1%; 20,0% e 57,1% de anomalias nos embriões de 2; 4; 8 e 16 células, respectivamente; LECHNIAK (1996) observou 23,3% de anomalias em embriões de duas a dezesseis células, resultado próximo à média obtida no presente estudo. YOSHIZAWA *et al.* (1999) encontraram anomalias cromossômicas (haploidia) em 80% dos embriões de duas a dez células. Contudo, segundo os próprios autores, esse resultado extremo seria devido à baixa concentração do sêmen utilizado no experimento. Considerando esses resultados, é provável que o período de maturação e fertilização *in vitro*, e não o estágio de desenvolvimento, levem a uma maior incidência de anomalias

cromossômicas, conforme sugerem IWASAKI e NAKAHARA (1990b), os quais observaram 18% e 22% de anomalias cromossômicas em embriões FIV cultivados *in vitro* ou *in vivo* (em oviduto de coelha), respectivamente.

Diferentemente do observado em embriões taurinos, os embriões FIV zebuínos não apresentaram maior frequência de anomalias cromossômicas quando comparados com embriões PIV. Embora nem sempre essa diferença entre embriões bovinos FIV e PIV pode ser estabelecida (HENDRIKSEN *et al.*, 2001), a maioria dos trabalhos tem associado maior incidência de anomalias cromossômicas em embriões FIV quando comparado com embriões PIV (IWASAKI e NAKAHARA, 1990a; VIUFF *et al.*, 1999; 2001).

A mixoploidia e poliploidia foram as únicas anomalias observadas, tanto nas mórulas FIV como nas PIV. A mixoploidia foi a alteração que apresentou maior prevalência nos embriões FIV e PIV, no início de desenvolvimento, o que está em acordo com trabalhos de outros autores (HARE *et al.*, 1980; IWASAKI e NAKAHARA, 1990a; IWASAKI *et al.*, 1992; KING *et al.*, 1995; YOSHIZAWA *et al.*, 1999; VIUFF *et al.*, 1999; 2000; 2001; HENDRIKSEN, *et al.*, 2001). Esta anomalia apresentou diferentes rearranjos ($n/2n$; $2n/3n$; $2n/4n$, $3n/4n$), sendo que na maioria dos casos (acima de 80%) existiu uma linhagem celular normal de $2n=60$.

A incidência de poliploidia ($3n$ e $4n$) dos embriões FIV nos estágios de mórula e de duas a 16 células foi 0,9% e 10,3%, respectivamente. Frequências semelhantes foram reportadas, em embriões bovinos, por IWASAKI *et al.* (1989), KAWARSKY *et al.* (1996) e LECHNIAK (1996). Por sua vez VIUFF *et al.* (2000) observaram apenas 5,6% da referida anomalia em embriões bovinos de duas a oito células e 0% nos embriões acima de nove células. Esses resultados sugerem que o desenvolvimento de embriões poliplóides é menor e aparentemente reprimido a partir do terceiro ciclo celular. As poliploidias poderiam ser explicadas devido a erros na fertilização, levando à penetração de mais de um espermatozóide no óvulo, e/ou à não expulsão do segundo corpúsculo polar ou ainda à fertilização de um óvulo diplóide por um espermatozóide (HARE e SINGH, 1979). Segundo LONG *et al.* (1994), o aumento do tempo de cultivo e da concentração espermática eleva a fecundação polispermática. Com base em suas investigações, IWASAKI e NAKAHARA (1990b) sugeriram que a principal causa da triploidia de embriões bovinos FIV seria a ocor-

rência de polispermia. Igualmente, a taxa de polispermia pode ser aumentada em duas ou três vezes, quando os oócitos são liberados das células do *cumulus* antes da fecundação *in vitro* (BEHALOVA e GREVE, 1993).

Dos 75 embriões FIV que apresentaram um cariótipo normal, 40 (53,3%) eram do sexo masculino ($2n=60,XY$) e 35 (46,7%) do sexo feminino ($2n=60,XX$).

Embora não significativo ($P>0,05$), os dados sugerem que as condições de manipulação e cultura *in vitro* influenciaram a razão do sexo em favor dos machos, conforme indicam YADAV *et al.* (1993), WURTH *et al.* (1994), LONERGAN *et al.* (1999) e GARCIA *et al.* (2002). Dos 32 embriões FIV que apresentaram anomalias cromossômicas, 19 (59,4%) eram do sexo feminino e 13 (40,6%) do masculino (Figura 2). Se confirmada com um maior número de repetições, essa informação poderia eventualmente explicar o maior número de nascimento de bezerros machos oriundos de embriões FIV.

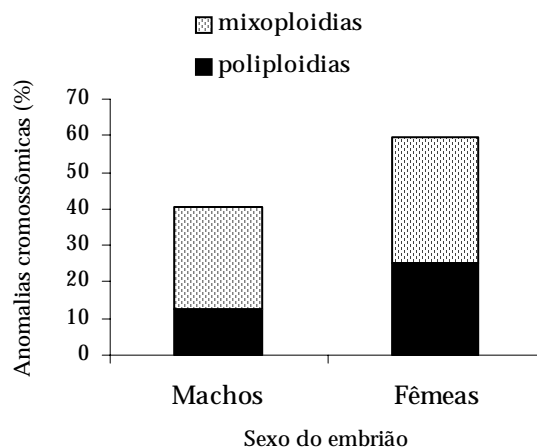


Figura 2. Anomalias cromossômicas de embriões zebuínos FIV conforme o sexo do embrião

CONCLUSÃO

Dos resultados observados no presente estudo conclui-se que aproximadamente um terço dos embriões zebuínos FIV apresenta anomalias cromossômicas e sua incidência independe do estágio de desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, R.H.; COELHO, L.A.; PIRES, R.M.L. Superovulação de vacas Nelore com dose única de FSH aplicada por via subcutânea. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v.27, n.1, p.199, 1999. (Supl).
- BEHALOVA, E.; GREVE, T. Penetration rate of cumulus enclosed versus denuded bovine eggs fertilized in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.86, 1993.
- BEHBOODI, E. et al. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.2, p.227-232, 1995.
- CAMARGO, L.S.A. Produção in vitro de embriões bovinos na Embrapa Gado de Leite. In: WORKSHOP SOBRE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO: Perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira, 2002, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. p.31-36. (Documentos, 88)
- CROSIER, A.E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.64, p.1375-1385, 2001.
- FARIN, P.W. ; CROSIER, A.E.; FARIN, C.E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.151-170, 2001.
- FARIN, P.W.; FARIN, C.E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.52, p.676-682, 1995.
- FUKUI, Y. et al. Factors affecting the in vitro development of blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.92, p.125-131, 1991.
- GARCIA, J.M. et al. Eficiência, limitações e perspectivas futuras na produção in vitro de embriões bovinos. In: WORKSHOP SOBRE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira, 2002, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. p.27-30 (Documentos, 88).
- HARE, W.C.D.; SINGH, E.L. **Citogenética de la reproduction animal**. Zaragoza: Acribia, 1979.
- HARE, W.C.D. et al. Chromosomal analysis of 159 bovine embryos collected 12 to 18 days after estrus. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, Ottawa, v.22, p.615-626, 1980.
- HENDRIKSEN, P.J.M. et al. Effect of the origin of bovine oocytes on cell numbers and numerical chromosome aberrations in in vitro embryos collected at day 3 post-insemination. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.475, 2001.
- IWASAKI, S.; NAKAHARA, T. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized in vitro followed by culture in vitro or in vivo in rabbit oviducts. **Theriogenology**, Los Altos, v.33, p.669-675, 1990a.
- IWASAKI, S.; NAKAHARA, T.. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v.34, n.4, p.683-690, 1990b.
- IWASAKI, S. et al. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. **Gamete Research**, v.22, p.83-91, 1989.
- IWASAKI, S. et al.. Developmental changes in the incidence of chromosome anomalies of bovine embryos fertilized in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, Philadelphia, v.261, p.79-85, 1992.
- KAWARSKY, S.J. et al. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.54, p.53-59, 1996.
- KING, W.A.; GUAY, P.; PICARD, L. A cytogenetical study of 7-day-old bovine embryos of poor morphological quality. **GENOME**, v.29, p.160-164, 1987
- KING, W.A. et al. Sex dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.96, p.453-459, 1992.
- KING, W.A. et al. Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. **Genetique Selection, Evolution**, Paris, v.27, n.2, p.189-194, 1995.,
- LECHNIAK, D. The incidence of polyploidy and mixploidy in early bovine embryos derived from in vitro fertilization. **Genetique, Selection, Evolution**, Paris, v.28, n.4, p.321-328, 1996.
- LONERGAN, P. et al.. 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**, Oxford, v.117, p.159-167, 1999.
- LONERGAN, P. et al. Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. **Biology and Reproduction**, Champaign, v.71, p.1096-1100, 2004.
- LONG, C. R.; DEAMIANI, P.; PINTO-CORREIA, C. Morphology and subsequent development in vitro culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.102, p.361-369, 1994.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.6, p.859-869, 1995.
- POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, p.287, 1993.
- SLIMANE, W. et al. Assessing chromosomal abnormalities in two-cell bovine in vitro-fertilized embryos by using fluorescent in situ hybridization with three different cloned probes. **Biology and Reproduction**, Champaign, v.62, p. 628-635, 2000.
- THIBIER, M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report of IETS Data Retrieval Committee. **IETS Newsletter**, v.21, n.4, p.12-19, 2003.
- VIUFF, D. et al. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. **Biology and Reproduction**, Champaign, v.60, p.1273-1278, 1999.
- VIUFF, D. et al. Chromosome aberrations in vitro-produced bovine embryos at days 2-5 post-insemination. **Biology and Reproduction**, Champaign, v.63, p.1143-1148, 2000.
- VIUFF, D. et al. Chromosomal abnormalities and developmental kinetics in in vivo-developed cattle embryos at days 2 to 5 after ovulation. **Biology and Reproduction**, Champaign, v.65, n.1, p.204-208, 2001.
- YADAV, B.R.; KING, W.A.; BETTERIDGE, K.J. Relationships between the completion of first cleavage and chromosomal complement, sex and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v.36, p.434-439, 1993.
- YOSHIZAWA, M. et al. Chromosomal diagnosis in each individual blastomere of 5- to 10-cell bovine embryos derived from in vitro fertilization. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, p.1239-1250, 1999.
- WURTH, Y.A. et al. Developmental potential of in vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, p.1275-1284, 1994.