



## Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

*Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos*

M.A.N. Dode, L.O. Leme, J.F.W. Sprícigo

Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

Correspondência: [margot.dode@embrapa.br](mailto:margot.dode@embrapa.br)

### Resumo

Vários estudos indicam que embriões produzidos *in vitro* (PIV) são menos resistentes à criopreservação do que os *in vivo*. Isso se deve às diferenças existentes entre eles causadas, principalmente, pelo cultivo *in vitro*. Essa revisão visa sumarizar os principais fatores que afetam a criopreservação de embriões PIV e abordar as diferentes estratégias que podem ser utilizadas para melhorar a qualidade e aumentar a criotolerância desses embriões.

**Palavras-chave:** congelamento, criotolerância, cultivo *in vitro*, vitrificação.

### Abstract

Numerous studies indicate that *in vitro*-produced (IVP) bovine embryos are less resistant to cryopreservation when compared to those produced *in vivo*. The lower cryotolerance of those embryos are probably caused by the *in vitro* culture. This review aims to summarize the main factors that affect cryopreservation of IVP embryos and to describe different strategies for modifying those embryos to increase their quality and cryosurvival.

**Keywords:** cryotolerance, freezing, *in vitro* culture, vitrification.

### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta para aumentar a produtividade por possibilitar a multiplicação rápida e o aumento do número de produtos de animais melhoradores. Inicialmente era aplicada no Brasil apenas para fins de pesquisa, mas, na última década, passou a ser utilizada em larga escala para a multiplicação comercial. No período de 2000 a 2008, a participação do Brasil na produção mundial de embriões PIV aumentou de 9,0 para 66,6% (Viana et al., 2010), sendo atualmente o país que mais produz embriões PIV no mundo (Viana et al., 2012). Apesar de ser considerada uma técnica estabilizada, ainda continua enfrentando um de seus fatores mais limitantes que é a alta sensibilidade dos embriões à criopreservação.

Existem evidências de que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* e de que a criotolerância reduzida está associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006).

Portanto, estratégias que superem esses problemas, em busca de resultados melhores e mais estáveis para criopreservação de embriões PIV, têm sido propostas com enfoque, principalmente, nas alterações nos métodos de criopreservação e/ou na indução de modificações nas células do embrião para que ele se torne mais criotolerante.

Essa revisão visa sumarizar os estudos mais recentes sobre as manipulações no sistema de cultivo para produzir embriões de melhor qualidade e mais resistência à criopreservação.

### Diferenças entre embriões *in vitro* e *in vivo*

Embriões PIV são menos resistentes à criopreservação do que os *in vivo*, o que tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (Abe et al., 2002). Entre essas diferenças pode-se mencionar maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, disco embrionário geralmente menor com menos células, menor quantidade de células totais e zona pelúcida mais frágil (Crosier et al., 2001). Além disso, embriões PIV possuem um grande acúmulo intracelular de lipídeos e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões *in vivo* (Crosier et al., 2001; Farin et al., 2004).

Muitas das diferenças na qualidade desses embriões têm sido atribuídas às condições de cultivo, especialmente a presença de soro, que tem sido responsabilizado pelo aumento no acúmulo de lipídeos no citoplasma (Abe et al., 2002; Moore et al., 2007). O acúmulo de lipídeos pode ser resultado da captação desses



do meio ou devido ao metabolismo ineficiente das mitocôndrias embrionárias (Farin et al., 2004; Barcelo-Fimbres e Seidel Jr., 2007a). Além da diferença nos lipídeos citoplasmáticos, o perfil dos lipídeos mais abundantes na membrana plasmática das células, a fosfatidilcolina e a esfingomielina, também difere entre eles (Sudano et al., 2012b).

Outras diferenças são as relacionadas aos aspectos moleculares, já que embriões PIV diferem na expressão de genes importantes para o desenvolvimento (Mundim et al., 2009). Essas diferenças são demonstradas, mais detalhadamente, em estudos do transcriptoma que mostram genes diferencialmente expressos entre os embriões PIV e os *in vivo* (Clemente et al., 2011). Tem sido também demonstrado que genes relacionados ao metabolismo de lipídeos estão mais expressos nos embriões *in vivo* que nos *in vitro* (Gad et al., 2012). Tais resultados sugerem que esses embriões podem ser incapazes de utilizar os lipídeos internos para a produção de ATP, o que poderia ser devido à atividade mitocondrial inadequada. Isso também explicaria outras diferenças morfológicas, como o citoplasma mais escuro observado nos embriões PIV.

### Fatores que afetam a criopreservação

#### *Métodos de criopreservação*

Atualmente, dois métodos são utilizados para a criopreservação de embriões: congelamento lento ou clássico e vitrificação.

O congelamento clássico tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, entretanto permite a formação de cristais de gelo (efeito solução), que, em maior ou menor escala, resultarão em lesões às membranas e organelas. A queda da temperatura é controlada mantendo-se uma curva constante até a atingir a temperatura de  $-32^{\circ}\text{C}$ , quando as palhetas contendo os embriões são mergulhadas no nitrogênio líquido.

Na vitrificação se utilizam altas concentrações de crioprotetores, os quais formam uma solução viscosa que, durante o resfriamento, faz com que a água da célula se solidifique em estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo (Vajta e Nagy, 2006). Entretanto, a toxicidade dos crioprotetores é tanta, que as células só podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (Vajta et al., 1998). Desde que esse método foi desenvolvido, o objetivo dos diferentes protocolos propostos visam à redução na concentração e no volume dos crioprotetores e ao aumento da curva de resfriamento. Com base nisso, diferentes dispositivos de suporte foram desenvolvidos para reduzir o volume e permitir o contato rápido com nitrogênio líquido, incluindo grades de cobre de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), *open pulled straw* - OPS (Vajta et al., 1998), *cryoloop* (Lane et al., 1999), microgotas (Papis et al., 2000) e *cryotop* (Kuwayama et al., 2005).

Apesar de o congelamento clássico continuar sendo mais utilizado para embriões *in vivo*, a técnica OPS provocou um grande impacto no uso da vitrificação. A maioria dos autores relata resultados positivos com a vitrificação de embriões bovinos PIV (Vajta et al., 1998; Pereira et al., 2005; Siqueira Filho et al., 2011), sendo, até o presente, a técnica mais utilizada para esse tipo de embriões.

Já a vitrificação pelo método de *cryotop* (Kuwayama et al., 2005) tem recebido especial atenção, principalmente em humanos. Tal técnica consiste na utilização de uma haste de polipropileno na qual os embriões são alocados junto a volumes mínimos de solução de crioprotetor. Esse sistema tem se mostrado promissor para vitrificação de ovócitos (Kuwayama et al., 2005; Spricigo et al., 2012). Com relação à criopreservação de embriões, Inaba et al. (2011) compararam embriões *in vivo* e PIV criopreservados com congelamento clássico e vitrificação em palheta e em *cryotop*, e observaram que a taxa de eclosão às 48 h foi maior no *cryotop* do que nos outros métodos. Outro estudo comparando a técnica de *cryotop* ao congelamento clássico também mostrou taxas de eclosão às 48 h maiores em embriões vitrificados do que naqueles submetidos ao congelamento clássico (Diógenes et al., 2012).

A comparação entre os métodos clássico e vitrificação tem sido realizada principalmente em relação à morfologia, considerando-se número de células, reexpansão e eclosão. Entretanto, Stinshoff et al. (2011) mostraram claramente que a criopreservação afetou a qualidade dos embriões em nível molecular, o que causou alterações na expressão de alguns genes, sendo a alteração nos embriões vitrificados menor do que nos submetidos ao congelamento clássico.

Recentemente, um método que utiliza um fragmento de papel absorvente como suporte para os embriões durante a criopreservação foi descrito. Os autores observaram que a taxa de eclosão e a de prenhez foram semelhantes entre os embriões vitrificados com grades de microscopia eletrônica e com papel (Kim et al., 2012).

#### *Estágio e qualidade do embrião*

Não existe um consenso sobre qual o melhor estágio de desenvolvimento embrionário a ser criopreservado (Saragusty e Arav, 2011). Tem sido indicado que, entre os blastocistos que foram inseminados concomitantemente, aqueles que se desenvolvem mais rápido ou que apresentam maior diâmetro são de melhor



qualidade e mais propensos a sobreviver à criopreservação (Saha et al., 1996; George et al., 2008). Quando blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) de D6,5 e D7,5 foram cultivados na presença de soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica bovina (BSA-FAF) como suplementos proteicos no cultivo, os embriões BX apresentaram melhor taxa de eclosão comparados aos BL, independentemente do tratamento utilizado (Leme, 2008). Da mesma forma, Morato et al. (2010), ao avaliarem a taxa de eclosão após a vitrificação com *cryotop* de embriões PIV de D7 e D8 nos estágios de blastocisto inicial (BI), BX e eclodidos (BE), observaram que os mais avançados no desenvolvimento tiveram melhor taxa de eclosão em relação aos menos desenvolvidos. Além disso, blastocistos de mesmo estágio transferidos em D6 apresentaram taxas de prenhez superiores aos de D7, e estes superiores aos de D8 (Zucolloto et al., 2003). Esses resultados confirmam que a qualidade se refere não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento, mas também à idade em que o embrião atinge determinado estágio.

#### *Sistema de cultivo*

De acordo com a literatura, a principal característica que afeta a criotolerância do embrião PIV e que tem sido alvo das pesquisas nessa área é o alto conteúdo lipídico existente no seu citoplasma (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006; Barcelo-Fimbres e Seidel Jr., 2007b). Apesar de não estar claro como e por que a acumulação lipídica ocorre no citoplasma desses embriões, tal acúmulo tem sido atribuído à presença de soro. De fato, a concentração de SFB afeta o número de gotas lipídicas presentes no citoplasma do embrião PIV (Leroy et al., 2005; Sudano et al., 2012a), sendo que embriões cultivados em sistemas livres de soro têm uma redução no acúmulo de gotas de lipídeos citoplasmáticos e maior resistência à criopreservação (Pereira e Marques, 2008).

Atualmente, muitos laboratórios já aboliram o soro do cultivo embrionário, principalmente quando o objetivo é a criopreservação. Entretanto, em estudo que comparou o cultivo na presença de soro e de BSA, foi observado que a taxa de eclosão em 48 h após a vitrificação só foi maior nos embriões cultivados em BSA do que naqueles do soro quando BL de D6,5 e D7,5 foram vitrificados. Porém, quando embriões mais avançados e de melhor qualidade (BX de D6,5 e de D7,5) foram cultivados na presença de BSA, apresentaram taxa de eclosão semelhante aos cultivados no soro (Leme, 2008). Além disso, quando vários parâmetros foram correlacionados com a capacidade dos embriões sobreviverem à criopreservação, foi observado que a variável que apresentou a maior correlação foi a qualidade do embrião avaliada pelo grau de células apoptóticas e não o conteúdo de lipídeos (Sudano et al., 2012a, b). Esses resultados sugerem que o fator mais relevante para determinar a sobrevivência pós-criopreservação é a qualidade dos embriões, em que o estágio e a idade são tão importantes quanto o suplemento do meio de cultivo.

#### **Estratégias para aumentar a criotolerância de embriões bovinos PIV**

A manipulação do sistema de PIVE, como, por exemplo, mudanças nas condições de cultivo para reduzir o acúmulo de lipídeos e uso de métodos físicos, como o aumento na pressão hidrostática (HHP), tem sido feita para melhorar a resposta de embriões bovinos à criopreservação.

A retirada do soro do meio de cultivo reduz a quantidade de lipídeos, mas também reduz a produção de blastocistos. Entretanto, alternativas como a redução na concentração do soro e a delipidação química foram testadas com sucesso e podem ser utilizadas isoladas ou em combinação nos sistemas de cultivo de embriões PIV.

O forskolin, um agente capaz de estimular a lipólise quando adicionado ao meio de cultivo, tem sido usado em algumas espécies para reduzir os lipídeos citoplasmáticos. Em bovinos, um estudo que avaliou a presença ou não de soro em baixas concentrações (2,5%) mostrou que os embriões produzidos no soro tinham maior sensibilidade à criopreservação, sendo que esse efeito foi eliminado quando forskolin foi adicionado ao meio (Paschoal et al., 2012).

Outras substâncias químicas podem também ser usadas para reduzir os lipídeos do soro, como, por exemplo, o etossulfato de fenazina (PES), o qual recebe elétrons do NADPH, resultando em NADP, que estimula a via das pentoses e, dessa forma, diminui a produção de lipídeos (Barcelo-Fimbres e Seidel Jr., 2007a). O cultivo de embriões bovinos do D3 ao D7 na presença de PES melhorou a sobrevivência do blastocisto após a criopreservação tanto na vitrificação como no congelamento lento, não havendo diferença entre os dois métodos (Barcelo-Fimbres e Seidel Jr., 2007a). Já Sudano et al. (2011) avaliaram diferentes concentrações de soro e a presença de PES por diferentes períodos de cultivo e concluíram que a redução na concentração de soro para 2,5%, associada à suplementação do meio a partir do D4 com PES, aumentou a taxa de sobrevivência pós-vitrificação.

Durante a criopreservação, embriões também estão susceptíveis a danos oxidativos, sendo que embriões *in vitro* são mais predispostos ao estresse oxidativo induzido por fatores endógenos e exógenos durante o cultivo (Nasr-Esfahani et al., 1990). Uma estratégia que tem sido amplamente utilizada para minimizar o estresse oxidativo é cultivar os embriões sob baixa tensão de oxigênio e, assim, melhorar o metabolismo e diminuir a produção de radicais livres. Entretanto, alguns antioxidantes, tais como o  $\alpha$ -tocoferol ou vitamina E (Breininger



et al., 2005) e seu análogo sintético, o trolox (Feugang et al., 2004), a catalase (Paudel et al., 2010) e o  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME; Hosseini et al., 2009), já foram adicionados aos meios de cultivo e/ou criopreservação de embriões, no intuito de diminuir a produção de radicais livres. Todavia, o efeito benéfico dessas substâncias antes e após a criopreservação ainda deve ser melhor estudado.

Além do uso de moléculas antioxidantes, outras abordagens vêm sendo desenvolvidas para aumentar a resistência do embrião à criopreservação. Nesse contexto, pode-se citar o grupo de Pribenszky et al. (2005), os quais desenvolveram um equipamento para produzir um aumento de pressão hidrostática (PH) e, então, causar um estresse ao embrião. A PH já foi utilizada na criopreservação de ovócitos, embriões e espermatozoides (Pribenszky et al., 2005; Du et al., 2008). Em bovinos, foi demonstrado que a PH deve ser aplicada de uma a duas horas antes do início da criopreservação, para que a célula tenha tempo de responder ao estímulo, dessa forma aumentando sua resistência à vitrificação (Siqueira Filho et al., 2011).

### Considerações finais

Esforços para melhorar as taxas de sobrevivência de embriões PIV tem se restringido basicamente a modificações nos métodos de criopreservação e modificações nos sistemas de cultivo para tornar os embriões mais criotolerantes. Muitas dessas modificações já foram realizadas, testadas e algumas até inseridas em sistemas comerciais. Entretanto, os resultados são muito instáveis e difíceis de serem comparados devido à enorme variação que ocorre de acordo com meio, suplementos, ambiente de cultivo, estágio de desenvolvimento, idade do embrião, tempo de cultivo pós-criopreservação e momento em que é feita a seleção. Outra grande dificuldade com relação aos estudos nessa área é que, na maioria deles, o resultado é avaliado, principalmente, pelas taxas de reexpansão e eclosão. Embora válidos e importantes, não se sabe o quanto esses parâmetros são eficientes para indicar a real capacidade do embrião em iniciar uma prenhez após a transferência. O teste ideal para a qualidade embrionária é o estabelecimento de gestação após a transferência para receptoras, resultando no nascimento de crias saudáveis. É evidente a dificuldade de se obter esse tipo de respostas devido ao custo não só para a obtenção, mas principalmente para a manutenção das receptoras. Por essas razões, é essencial desenvolver testes mais viáveis e práticos para avaliação mais segura da qualidade dos embriões.

Uma alternativa seria aperfeiçoar um método para avaliação do embrião até estágios mais avançados, como o sistema de cultivo pós-eclosão. Outra seria a identificação de marcadores moleculares ou funcionais para a qualidade dos embriões e/ou sua criotolerância. Portanto, pesquisas básicas ainda são necessárias para determinar as estruturas, as vias metabólicas e os mecanismos moleculares mais afetados pela criopreservação. Esse conhecimento é importante para estabelecer condições de cultivo que levem em consideração as mudanças necessárias para o desenvolvimento embrionário saudável e que suportem melhor a criopreservação.

### Referências

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.57-66, 2002.
- Barcelo-Fimbres M, Seidel GE Jr.** Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1406-1418, 2007a.
- Barcelo-Fimbres M, Seidel GE Jr.** Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1395-1405, 2007b.
- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT.** Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, v.63, p.2126-2135, 2005.
- Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gaora P, Mehta JP, Forde N, Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D.** Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod*, v.85, p.285-295, 2011.
- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE.** Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biol Reprod*, v.64, p.1375-1385, 2001.
- Diógenes M, Spricigo J, Dode MAN.** Vitrificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de reexpansão e eclosão de embriões bovinos PIV. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 26, Foz do Iguaçu, PR. Foz do Iguaçu, PR: SBTE; 2012: p.495. Resumo.
- Du Y, Pribenszky CS, Molnar M, Zhang X, Yang H, Kuwayama M, Pedersen AM, Villemoes K, Bolund L, Vajta G.** High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, v.135, p.13-17, 2008.
- Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA.** Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci*, v.82, E-Suppl, p.E53-E62, 2004.
- Feugang JM, DE Roover R, Moens A, Leonard S, Dessy F, Donnay I.** Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of



- apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, v.61, p.71-90, 2004.
- Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D.** Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. *Biol Reprod*, v.87, p.100, 2012.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I.** Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, v.69, p.612-623, 2008.
- Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P; Hosseini L; Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langrroodi M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaied Sh, Nasr-Esfahani MH.** Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *J Assist Reprod Genet*, v.26, p.355-364, 2009.
- Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K.** In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *J Reprod Dev*, v.57, p.437-43, 2011.
- Kim YM, Uhm SJ, Gupta MK, Yang JS, Lim JG, Das ZC, Heo YT, Chung HJ, Kong IK, Kim NH, Lee HT, Ko DH.** Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, v.78, p.1085-1093, 2012.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, v.11, p.300-308, 2005.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.** Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril*, v.72, p.1073-1078, 1999.
- Leme LO.** Efeito de diferentes fontes proteicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Brasília. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2008.
- Leroy JL, Opsomer G, De Vliegher S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, DE Kruif A, Van Soom A.** Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, v.64, p.2022-2036, 2005.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*, v.54, p.1059-1069, 1996.
- Moore K, Rodriguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, 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.
- Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T.** Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.1141-1147, 2010.
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH.** Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v.65, p.1551-1562, 2006.
- Mundim TC, Ramos AF, Sartori R, Dode MA, Melo EO, Gomes LF, Rumpf R, Franco MM.** Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. *Genet Mol Res*, v.8, p.1398-1407, 2009.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH.** Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*, v.109, p.501-7, 1990.
- Papis K, Shimizu M, Izaike Y.** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, v.54, p.651-658, 2000.
- Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias Maziero RR, Crocomo LF, Ona Magalhaes LC, Rascado TS, Martins A, Landim-Alvarenga FC.** Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, p.1-12, 2012.
- Paudel KP, Kumar S, Meur SK, Kumaresan A.** Ascorbic acid, catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.256-262, 2010.
- Pereira DC, Dode MAN, Rumpf R.** Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1131-1141, 2005.
- Pereira RM, Marques CC.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, v.9, p.267-277, 2008.
- Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L.** Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.143-50, 2005.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T.** Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, v.46, p.331-343, 1996.
- Saragusty J, Arav A.** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and



vitrification. *Reproduction*, v.141, p.1-19, 2011.

**Siqueira Filho E, Caixeta ES, Pribenszky C, Molnar M, Horvath A, Harnos A, Franco MM, Rumpf R.** Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.585-590, 2011.

**Spicigo JF; Morais KS; Yang BS; Dode MA.** Effect of the exposure to methyl-beta-cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. *Cryobiology*, v.65, p.319-325, 2012.

**Stinshoff H; Wilkening S; Hanstedt A; Bruning K; Wrenzycki C.** Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, v.76, p.1433-1441, 2011.

**Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Crocomo LF, Magalhaes LC, Junior AM, Machado R, Landim-Alvarenga FC.** Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. *Zygote*, p.1-8, 2012a.

**Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TS, Magalhaes LC, Crocomo LF, Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga FDA C.** Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v.75, p.1211-1220, 2011.

**Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FC.** Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Biol Reprod*, v.87, p.130, 2012b.

**Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve Callesen H.** Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.53-58, 1998.

**Vajta G, Nagy ZP.** Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, v.12, p.779-796, 2006.

**Viana JH, Siqueira LG, Palhao M, Camargo LS.** Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Anim Reprod*, v.9, p.12-18, 2012.

**Viana JH, Siqueira LG, Palhao M, Camargo LS.** Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Sci Vet*, v.38, p.661-674, 2010.

**Zucolloto J, Oliveira M, Pereira DC, Rumpf R, Dode MAN.** Influence of the growth rate and stage of development of bovine embryos produced *in vitro* on the pregnancy rate. *Acta Sci Vet*, v.31, p.630, 2003. Resumo.