

Artículo de Revisión:

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos

M.A.N. Dode^{1,2} e J.F.W. Sprícigo²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

²Faculdade de Agronomia E Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, UnB, Brasília, DF, Brasil.

E-mail (Margot Alves Nunes Dode): margot.dode@embrapa.br

RESUMO

Vários estudos indicam que embriões produzidos *in vitro* (PIV) são menos resistentes a 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: *vitriificação, congelamento, criotolerância, cultivo in vitro*

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: *vitriification, freezing, cryotolerance, in vitro culture.*



INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta importante para aumentar a produtividade, pois possibilita a multiplicação rápida de animais melhoradores e permite a produção de embriões com valor agregados. Inicialmente essa técnica era utilizada apenas para fins de pesquisa, mas, na última década passou a ser utilizada para a multiplicação comercial, especialmente no Brasil, que é 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.

A criopreservação de embriões PIV facilita a logística para a indústria de embriões, pois permite armazenar os excedentes para serem utilizados no momento e situação mais adequados aumentando ainda mais os benefícios potenciais dessa técnica. Além disso, a criopreservação é essencial para o estabelecimento de bancos de germoplasma, seja de animais de produção, seja de conservação e principalmente para a troca e comercialização nacional e internacional de genética, evitando o transporte de animais e seus riscos sanitários.

Existem evidências de que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* e, que a criotolerância reduzida pode estar associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (Abe *et al.*, 2002; Sudano *et al.*, 2011). Por tanto, estratégias que superem esses problemas buscando resultados melhores e mais estáveis têm sido propostas modificando os métodos de criopreservação e melhorando a criotolerância do embrião. 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*

Vários estudos têm demonstrado que os 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 (Enright *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002).

Entre as diferenças pode-se mencionar que embriões PIV tendem, entre outras características, a conter maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, disco embrionário geralmente menor com menos células e menor quantidade de células totais do que os embriões *in vivo* (Dinnyes *et al.*, 1999; Crosier *et al.*, 2000; Lonergan *et al.*, 2006). Além disso, possuem um grande acúmulo intracelular de lipídios e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparado com embriões *in vivo* (Crosier *et al.*, 2000; 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; Rizos *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2007).

Além dos lipídios citoplasmáticos, serem diferentes entre os *in vivo* e *in vitro*, o perfil dos lipídios mais abundantes na membrana plasmática das células, a fosfatidilcolina e a esfingomiélna, também difere entre eles (Sudano *et al.*, 2012b). De tal forma que, a determinação da composição química dos lipídeos tem sido sugerida como uma ferramenta para estudos que visam alterar o sistema de cultivo para aumentar a criotolerância dos embriões PIV.

Outras diferenças importantes do embrião produzido *in vitro* são as relacionadas aos aspectos moleculares. Estudos têm mostrado que esses embriões também diferem na expressão de genes importantes para o desenvolvimento (Mundim *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2013). Essas diferenças são detectadas, principalmente, com a utilização de estudos do transcriptoma bovino que mostraram genes diferencialmente expressos entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Clemente *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2011). Têm sido também demonstrado que genes relacionados ao metabolismo de lipídios estão mais expressos nos embriões *in vivo* e menos expressos nos *in vitro* (Gad *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que os embriões PIV podem ser incapazes de utilizar os lipídios internos para a produção de ATP, o que poderia ser devido à atividade inadequada da mitocôndria, como já mencionado acima. Isso também explicaria outras diferenças morfológicas, tais como o citoplasma mais escuro observado nos embriões PIV.

FATORES QUE AFETAM A CRIOPRESERVAÇÃO

Todos os embriões sofrem consideráveis injúrias morfológicas e funcionais durante a criopreservação, mas a extensão dos danos assim como as diferenças na sobrevivência e desenvolvimento pós-criopreservação podem variar de acordo com vários fatores, tais como a espécie, o método de congelamento, o tipo de embrião, o estágio de desenvolvimento, o ambiente de cultivo, entre outros.

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 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 uma curva constante de 0,3 a 0,5 °C/minutos até atingir -30 à -35 °C, quando são mergulhados no nitrogênio líquido. Este método ainda é bastante utilizado principalmente pela facilidade de descongelamento e a transferência direta.

Na vitrificação se utiliza altas concentrações de crioprotetores, formando 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 *et al.*, 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). Em bovinos a comparação entre os métodos clássico e vitrificação tem sido realizados principalmente em relação à aspectos morfológicos, tais como número de células, re-expansão e eclosão. Entretanto,



Stinshoff *et al.* (2011) mostraram claramente que a criopreservação afetou a qualidade dos embriões em nível molecular, causando alterações na expressão de alguns genes. Sendo a alteração nos embriões vitrificados menor do que nos submetidos ao congelamento clássico. 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.

Dentre os métodos de vitrificação o cryotop (Kuwayawa *et al.*, 2005), tem recebido especial atenção, principalmente em humanos. Esse consiste 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 (Morato *et al.*, 2008; 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 nos submetidos ao congelamento clássico (Diógenes *et al.*, 2012).

Apesar dos avanços da vitrificação nas últimas décadas, o principal fator limitante da técnica é o fato de necessitar de mão de obra e equipamento específico durante o descongelamento. Devido às altas concentrações dos crioprotetores, esses têm de ser removidos do embrião de maneira lenta, havendo a necessidade de reidratação em meios hipertônicos antes da transferência. Recentemente Morato e Mogás (2014) desenvolveram um dispositivo (Vit Trans), no qual os embriões são vitrificados em um dispositivo semelhante ao utilizado no cryotop e depois da vitrificação, o dispositivo é inserido dentro de uma palheta de 0,5 ml. A vantagem desta metodologia é que a reidratação ocorre na própria palheta, logo há a possibilidade de transferência direta deste embrião. Apesar dos resultados apresentados serem promissores, com boas taxas de re-expansão após descongelamento, ainda não existem dados suficientes que de gestações após a transferência direta utilizando este dispositivo.

ESTÁGIO E QUALIDADE DO EMBRIÃO

Não existe um consenso de qual o melhor estágio de desenvolvimento embrionário a ser criopreservado (Saragusty *et al.*, 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, independente do tratamento utilizado (Leme, 2008).

SISTEMA DE CULTIVO E QUALIDADE DO EMBRIÃO

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; Barcelo_Fimbres *et al.*, 2007b). Apesar de não estar claro como e porque a acumulação lipídica ocorre no citoplasma destes embriões, esse 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 *et al.*, 2008). Entretanto, quando todo o cultivo é realizado na presença de soro as taxas de blastocistos em D6, D7 e D8 foram sempre superior as dos embriões cultivados na presença de BSA (Leme, 2008), e a retirada do soro produziu embriões com menor qualidade e maior taxa de células danificadas (Paschoal *et al.*, 2012).

Atualmente muitos laboratórios já aboliram o soro do cultivo embrionário, principalmente quando o objetivo é a criopreservação. Entretanto, em estudo comparando 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 nos do soro quando BL de D6,5 e D7,5 foram vitrificados. Entretanto, 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.*, 2011, 2012a). Esses resultados sugerem que o fator mais importante em 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 PIV tal como, mudanças no suplemento proteico do meio, o uso de aditivos como reguladores metabólicos (antioxidantes, forskolina, phenazineethosulfato [PES] e fosfodiesterases [PDE]) ou a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados, têm sido indicados para reduzir os efeitos deletérios e diminuir o acúmulo de TG. Também o uso de métodos físicos como o aumento na pressão hidrostática (HHP) e a remoção do líquido da blastocle são ferramentas utilizadas para melhorar a resposta de embriões bovinos a 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.



Em bovinos, um estudo avaliando a presença ou não de soro em baixas concentrações (2,5%) mostrou que os embriões produzidos com soro tinham maior sensibilidade à criopreservação, sendo que esse efeito foi eliminado quando forskolin foi adicionado ao meio (Paschoal *et al.*, 2012). Além disso, Sanches *et al.* (2013) demonstraram que embriões vitrificados quando cultivados na presença de forskolin apresentaram maiores taxas de gestação, após transferência. Outras substâncias químicas podem também ser usadas para reduzir os lipídeos do soro, como por exemplo, o etossulfato de fenazina (PES), que recebe elétrons do NADPH, resultando em NADP que estimula a via das pentoses diminuindo a produção de lipídeos (Barcelo-Fimbres *et al.*, 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 *et al.*, 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% associado à suplementação do meio a partir do D4 com PES, aumentou a taxa de sobrevivência pós-vitrificação.

A L-carnitina, a qual desempenha um papel importante no metabolismo dos triglicerídeos armazenados no citoplasma de ovócitos e embriões, também é capaz de reduzir a quantidade de lipídeos. A L-carnitina é um agente transportador de TG do citoplasma para as mitocôndrias onde são metabolizados gerando ATP (Yasaki *et al.*, 2013). Recentemente foi demonstrado que a adição de L-carnitina aos meios de cultivo embrionário diminui a quantidade de TG e minimiza a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) após a criopreservação (Takahashi *et al.*, 2003).

A adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), principalmente do ácido linoleico conjugado (*trans-10* e *cis-12*) também é outra estratégia para diminuir a quantidade de TG no embrião, que no embrião PIV corresponde a aproximadamente 88% do total de ácidos graxos (Charpiguay, 2003). O ácido linoleico conjugado é capaz de modular o armazenamento de lipídio durante o desenvolvimento embrionário sem necessariamente estimular a lipólise, resultando em uma menor formação de EROs. Além de ser capaz de alterar a permeabilidade das membranas, aumentando a fluidez por incorporação direta às mesmas (Hochi *et al.*, 2003).

Na tentativa de alterar a composição de embriões *in vivo* e melhorar a crioresistência, Guardieiro *et al.* (2014) observaram que a suplementação de animais por 50 dias com gordura protegida rica em PUFA não aumentou as taxas de re-expansão e eclosão após a criopreservação. Porém, quanto a adição de isômeros do ácido linoleico conjugado aos meios de cultivo a literatura é controversa. Pereira *et al.* (2007) observaram que o composto foi capaz de reduzir a quantidade de TG e melhorar a re-expansão após a vitrificação. Porém Al Darwich (2010) não observou aumento da resistência à criopreservação dos embriões expostos a tratamentos similares.

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 melhorando o metabolismo e diminuindo a produção de radicais livres. Entretanto, alguns antioxidantes tais como α -tocoferol ou vitamina E (Breininger *et al.*, 2005), e o β -mercaptoetanol [β 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. Entretanto o efeito benéfico dessas substâncias antes e após a criopreservação ainda deve ser melhor estudado. Recentemente foi demonstrado que o Resveratrol um importante composto antioxidante encontrado em várias fontes vegetais como frutas vermelhas e também no vinho tinto, tem um efeito positivo produção *in vitro* de desenvolvimento embrionário em suínos (Lee *et al.*, 2010). Foi observado também que o resveratrol utilizado durante a maturação de ovócitos suínos antes da vitrificação reduziu os níveis de apoptose após descongelamento (Giarretta *et al.*, 2013). E que para bovinos, quando adicionado aos meios de cultivo foi capaz de elevar a taxa de sobrevivência e eclosão após vitrificação e descongelamento (Abdel-Wahab *et al.*, 2012).

Além do uso de moléculas antioxidantes, outras abordagens vêm sendo desenvolvidas para aumentar a resistência do embrião à criopreservação. Nesse contexto podemos citar o grupo de Pribenszky *et al.* (2005) que desenvolveram um equipamento para produzir um aumento de pressão hidrostática (PH) e, então causar um estresse ao embrião. O princípio básico da PH é de que quando um estresse subletal é aplicado às células, estas respondem de maneira a se proteger, iniciando transcrição e tradução de proteínas que teoricamente podem conferir proteção durante a criopreservação (Wouters *et al.*, 1999). 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). Trabalhos recentes mostram a utilização dessa ferramenta de suporte para embriões bovinos, sendo que Trigal *et al.* (2012), observaram em bovinos um aumento do número de células em embriões que antes da vitrificação foram submetidos à PH.

Um dos princípios da criopreservação independente do método utilizado é a desidratação celular, para que durante a queda de temperatura a formação de cristais de gelo seja minimizada. Recentemente Min *et al.* (2014) desenvolveram uma técnica de punção do líquido da blastocela através de micromanipulação e observaram que após o congelamento e descongelamento de embriões bovinos, utilizando as duas técnicas vitrificação ou congelamento clássico, que as taxas de re-expansão e eclosão foram aumentadas comparadas aos embriões não punccionados.

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 re-expansão e eclosão. Esses parâmetros embora válidos e importantes não se sabe o quanto são eficientes para indicar a real capacidade do embrião em iniciar uma gestação 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 manutenção das receptoras. Por estas razões, se torna essencial o desenvolvimento de 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 necessário para estabelecer condições de cultivo que levem em consideração as mudanças necessárias para o desenvolvimento embrionário saudável e que suportem melhor a criopreservação.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Wahab AM, Zullo G, Boccia L, De Blasi M, Longobardi V, Albergo G, Gasparini, B. 2012 Resveratrol during in vitro culture improves cryotolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reprod Fert and Dev*, 2012, 25:213-214.
- 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*, 2002, 61:57-66.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25:371-81
- Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P, Guignot F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2010, 93:30-6.
- 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*, 2007a, 74:1406-18.
- Barcelo-Fimbres M, Seidel, G.E. 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*, 2007B, 74:1395-405
- Breininger E, Beorlegui N, O'flaherty CM, Beconi, MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 2005, 63:2126-35.
- Charpigny G, Guesnet P, Marquant-Leguiene B, Heyman Y, Mermillod P, Humblot P. Fatty acid composition of tryglicerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. *Les. Actes du BRG*, 2003, 4: 172.
- Clemente M, Lopez-Vidriero I, O'Gara P, Mehta JP, Forde N, Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. *Biol Reprod*, 2011, 85:285-295.
- Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biol Reprod*, 2000, 62: 1459-65.
- Diógenes M, Spricigo J, Dode M. Vitrificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. XXVI Reunión Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu, PR, Brasil: SBTE: 495 p. 2012.
- Du Y, Pribenszky CS, Molnár 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*, 2008, 135:13-7.
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. Culture of in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 2000, 54:659-73.
- Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *J Anim Sci*, 2004, 82 E-Suppl: E53-62.
- 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*, 2012, 87:1-10.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. 2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, 2008, 69:612-23.
- Giarretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G. 2013. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:1-7.
- Guardieiro MM, Machado GM, Bastos MR, Mourão GB, Carrijo LH, Dode MA, Leroy JL, Sartori R. A diet enriched in linoleic acid compromises the cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 26: 511-20.
- Hoshi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology*, 1999, 52: 497-504.
- Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langroodi M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaid 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*, 2009, 26: 355-64.
- 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*, 2011, 57: 437-43

- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11:300-8.
- Lee K, Wang C, Chaille JM, Machaty Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *J Reprod Dev*, 2010, 56:330-5.
- Leme, L. Efeito de diferentes fontes protéicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos in vitro. (MsC). *Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília*. 2008. 82
- 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*, 2005, 64: 2022-36.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 2006, 65:137-52.
- Machado GM, Ferreira AR, Pivato I, Fidelis A, Sprícigo JF, Paulini F, Lucci CM, Franco MM, Dode MA. Post-hatching development of in vitro bovine embryos from day 7 to 14 in vivo versus in vitro. *Mol Reprod Dev*, 2013b, 80:936-947
- Mamo S, Mehta JP, McGettigan P, Fair T, Spencer TE, Bazer FW, Lonergan P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptus associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. *Biol Reprod*, 2011. 85:1143-1151.
- Min SH, Kim JW, Lee YH, Park SY, Jeong PS, Yeon JY, Park H, Chang KT, Koo DB. Forced Collapse of the Blastocoel Cavity Improves Developmental Potential in Cryopreserved Bovine Blastocysts by Slow-Rate Freezing and Vitrification. *Reprod Domest Anim*, 2014, doi: 10.1111/rda.12354. [Epub ahead of print]
- Moore K, Rodríguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S, Niasari-Naslaji A. 2007. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 2007, 68:1316-25.
- Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*, 2008, 57:137-41.
- Morato R, Mogas T. New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryos. *Cryobiology*, 2014, 68:288-93.
- 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*, 2009, 8:1398-407.
- 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*, 1990, 109:501-7.
- Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias Maziero RR, Crocomo LF, Oña Magalhães LC, da Silva Rascado T, Martins A, da Cruz Landim-Alvarenga F. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, 2012, 18:1-12.
- Pereira DC, Dode MA, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63:1131-41.
- Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira MS, Marques CC. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim Reprod Sci*, 2007, 98: 293-301.
- Pereira RM, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 2003, 68:236-43.
- Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. *Anim Reprod Sci*, 2006., 87:143-50.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod*, 2003, 68:236-43.
- Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 1996, 46: 331-43.
- Sanches BV, Marinho LS, Filho BD, Pontes JH, Basso AC, Meirinhos ML, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, 2013, 80:372-7.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 2011, 14:1-19.
- 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*, 2011, 23:585-90.
- Sprícigo 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*, 2012, 65:319-25.
- Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Brüning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, 2011, 76: 1433-41.
- Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Crocomo LF, Magalhães LC, Junior AM, Machado R, da Cruz Landim-Alvarenga F. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, 2012a, 11:1-8.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado Tda S, Magalhães LC, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, Landim-Alvarenga F da C. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 2011, 75:1211-20.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FD. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod*, 2012b 87:1-11
- Takahashi T1, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 2013, 25:589-99.



- Trigel B1, Gómez E, Caamaño JN, Muñoz M, Moreno J, Carrocera S, Martín D, Diez C. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 2012, 78:1465-75.
- Vajta G1, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51: 53-8.
- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 2006, 12: 779-96.
- Viana JH, Siqueira L, Palhao M, Camargo LS. 2012. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Animal Reproduction*, 2012, 9:12-18

