



Capítulo 17- Criopreservação de embriões bovinos: avanços e entraves
OLIVEIRA, C.S.¹; SENA, L.M.²; SANTOS, J.D.²; OLIVEIRA, L.Z.³; MARTINS, C.B.²

Introdução

O Brasil utiliza intensamente e desenvolve biotecnologias da reprodução animal, sendo o maior produtor de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), responsável por 70,8% da produção mundial (IETS, 2014). Através do uso da PIV, os ganhos genéticos e a pressão de seleção sobre os rebanhos podem aumentar com velocidade consideravelmente superior à obtida com métodos reprodutivos convencionais. Assim, a produção *in vitro* de embriões consiste em uma ferramenta importante para a pecuária, por (i) aumentar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores, (ii) encurtar o intervalo entre gerações, favorecendo o uso de fêmeas na pré-puberdade, (iii) facilitar o uso do sêmen sexado, priorizando a produção de bezerras fêmeas, benefício especialmente importante em sistemas de produção leiteira e rebanhos geneticamente superiores, e (iv) por propiciar a manutenção de grau de sangue definido em rebanhos cruzados. Estas características estão todas relacionadas com impacto econômico positivo para a pecuária.

O conceito de criopreservação envolve o armazenamento de tecidos biológicos vivos a baixas temperaturas para que esses continuem viáveis para utilização futura. A interrupção do desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto permite a programação de diversas etapas subsequentes, otimizando o destino destes embriões. Dois principais métodos de criopreservação são descritos (GONÇALVES, FIGUEIREDO e FREITAS, 2008). O congelamento lento que visa à manutenção do equilíbrio entre as várias fontes de danos, utilizando baixas concentrações de crioprotetores para controlar a formação de cristais de gelo, e o congelamento rápido que emprega concentrações maiores de crioprotetores, levando os componentes celulares a um estágio vítreo promovendo a conservação (VAJTA e NAGY, 2006).

Dentre os aspectos de controle que tornam importante o processo a criopreservação, o manejo de receptoras seria o mais evidente. Em qualquer programa de transferência de embriões, frequentemente temos receptoras em excesso ou em número insuficiente, por ser

¹EMBRAPA Gado de Leite, Campus Experimental Santa Mônica, Valença, RJ.

²Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo, CCA/UFES, Alegre-ES. Email: cbmvt@hotmail.com

³Departamento de Reprodução Animal e Obstetrícia, Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Rio Preto - UNIRP, São José do Rio Preto, SP.

improvável a estimativa precisa do número de blastocistos que será produzido dias antes do momento da punção folicular (BUENO e BELTRAN 2008).

Outro ponto crítico seria o transporte e comercialização destes embriões. Congelados em palhetas, podem ser trabalhados de forma semelhante a doses de sêmen, tornando assim, a comercialização mais fácil e prática, com benefícios que se estenderiam desde a sanidade dos rebanhos, por não haver a necessidade de introdução receptoras, até ganhos genéticos extremos, pela completa substituição do genoma materno (GONÇALVES, FIGUEIREDO e FREITAS, 2008). O terceiro aspecto interessante é a utilização da ferramenta para a produção de bancos de germoplasma. Genomas e a combinação deles poderiam ser armazenados por períodos indeterminados e se tornariam uma alternativa viável de retorno em programas de melhoramento genético (MARIANTE, ALBUQUERQUE e RAMOS, 2011).

No entanto, apesar das inúmeras vantagens da biotécnica, a criopreservação de embriões ainda não é uma prática comum em programas de produção de embriões *in vitro*, devido aos inúmeros fatores que afetam a viabilidade embrionária. Esses resultados são atribuídos a alterações de acúmulo lipídico, alterações genéticas, epigenéticas e danos as organelas citoplasmáticas (FAIR et al., 2001; ENRIGHT et al., 2003).

Nesse contexto, o intuito desta revisão é discutir os principais pontos que tornaram o armazenamento de embriões um gargalo na PIV, e algumas estratégias propostas para minimizar os efeitos deletérios da biotécnica.

Princípios básicos da criopreservação de embriões

O conceito de criopreservação envolve o armazenamento de tecidos biológicos vivos a baixas temperaturas e apesar de já ter sido tema de diversos filmes de ficção científica, a criopreservação é um procedimento amplamente utilizado para conservação de linhagens celulares diversas, espermatozóides (SHARMA, 2011) e fragmentos de tecidos (PARIS et al., 2004). Durante os processos de congelamento e descongelamento, ocorrem danos na estrutura celular que são provenientes de fatores como a formação intracelular de cristais de gelo e a diminuição da temperatura antes do congelamento (SHARMA, 2011).

Os embriões em estágio de blastocisto possuem pelo menos duas linhagens diferenciadas: o trofotoderma e a massa celular interna (ZERNICKA-GOETZ, 2011). Em bovinos, estruturas coletadas no dia 7 de desenvolvimento apresentam aproximadamente 100 células (OLIVEIRA et al., 2011), organizadas tridimensionalmente de maneira única, e envoltas por uma forte membrana denominada zona pelúcida. Portanto, o processo de

criopreservação de embriões apresenta elevada complexidade quando comparado à criopreservação de suspensões de células contendo milhares de exemplares, como ocorre em células tronco embrionárias (CTE), por exemplo.

Os efeitos deletérios sobre percentuais da população na criopreservação de CTE, mesmo que significativos, tem menor importância sobre o cultivo como um todo, uma vez que há um grande número de células vivas que podem multiplicar-se e substituir as células perdidas com o processo de criopreservação. No blastocisto, o percentual de células da massa celular interna corresponde a aproximadamente 38% das células do blastocisto no dia 7 em bovinos (OLIVEIRA et al., 2011). E a perda destas células durante o processo de criopreservação pode ser irreparável. Por isso, o potencial de sobrevivência das células é um aspecto essencial, característica denominada criotolerância.

A primeira técnica proposta para criopreservação de embriões com sucesso foi a congelação lenta (WHITTINGHAM et al., 1971). O princípio da congelação lenta é promover o congelamento dos compartimentos externos ao embrião, promovendo desidratação gradual do blastocisto até que o mesmo atinja a temperatura de vitrificação da matriz intracelular (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Para tanto, os blastocistos são expostos a baixas concentrações de crioprotetores, sendo a temperatura reduzida a -5 a -7°C para equilíbrio. Em seguida, as estruturas são submetidas ao início da congelação extracelular, a temperatura é diminuída gradualmente através de uma curva de -0.3 a -0.5°C por minuto, até atingir temperaturas da ordem de -30 a -65° C, quando as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (WILLADSEN et al., 1976).

Apesar de funcionar muito bem para embriões produzidos *in vivo*, com taxas de aproximadamente 41,5% de prenhez (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, DEN DAAS e RALL, 1997), em embriões PIV os índices inicialmente foram insatisfatórios. Neste contexto, a técnica de vitrificação reemergiu como uma alternativa interessante para a criopreservação de embriões PIV. O congelamento rápido ou vitrificação promove a desidratação do embrião pelo emprego de soluções osmóticas e indução da diminuição drástica da temperatura embrionária, transpondo a etapa de cristalização (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Para tanto, são utilizadas concentrações maiores de crioprotetores, que em função de sua maior velocidade de resfriamento e aquecimento proporcionam uma passagem rápida pela faixa crítica de temperatura (NEDAMBALE et al., 2004). Três aspectos são muito importantes neste último processo: a taxa de resfriamento, a viscosidade do meio de vitrificação, que deve ser alta para aumentar a temperatura de transição, diminuindo as chances de cristalização; e o

volume, que deve ser o menor possível para permitir melhor transferência de calor (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

Diversos protocolos foram desenvolvidos utilizando essa técnica e as diferenças existentes nas taxas de sobrevivência após a vitrificação obtidas entre diferentes autores e protocolos refletem possivelmente o estágio, origem, a composição de lipídeos intracelulares, diferenças na estrutura microtubular e a razão volume/superfície dos embriões influenciando a penetração de crioprotetores (VAJTA et al. 1998). O procedimento de vitrificação pela técnica open pulled straw (OPS), proposto por Vajta (1998), permite que se alcance taxas muito altas de resfriamento e aquecimento (até 20.000°C/min), e pequeno contato com os aditivos crioprotetores concentrados (menos de 30seg. a 180°C negativos). A técnica evita a injúria causada pela formação de cristais, toxicidade e danos osmóticos, culminando com taxas de blastocistos semelhantes aos embriões controle, em embriões criopreservados desde o dia 3 (D3) ao dia 7 (D7).

As técnicas de criopreservação são importantes ferramentas para o controle do destino dos embriões, porém, afetam a viabilidade embrionária, principalmente nos embriões produzidos *in vitro*. Estudos comparando a viabilidade de embriões submetidos à congelação lenta e vitrificação apontam a segunda como mais adequada (MUCCI et al., 2006). Apesar da maioria dos estudos apontar queda na viabilidade de embriões PIV criopreservados por congelamento rápido, estudos demonstram que os índices de prenhez são semelhantes quando comparados aos da inseminação artificial em rebanhos leiteiros, tornando a técnica interessante para determinados fins (BLOCK et al., 2010).

Principais efeitos deletérios da criopreservação nos embriões PIV

Os efeitos dos crioprotetores sobre organelas celulares foram investigados em alguns estudos. Gómez et al. (2009) observaram lesões principalmente na MCI de embriões após a vitrificação, com redução do número de células. Ohboshi et al. (1998) notaram a diminuição de microvilosidades em embriões criopreservados, além de alterações de membrana plasmática, mitocondriais e edema do retículo endoplasmático; no entanto, núcleo e regiões juncionais resistiram à crioinjúria.

Fair et al. (2001) compararam os efeitos da criopreservação sobre embriões produzidos *in vitro* (PIV) e *in vivo*. Os autores descreveram que os embriões PIV apresentaram características morfológicas distintas dos produzidos *in vivo*, como espaço perivitelino mais largo, menor abundância de microvilosidades (MV) e a presença de debris celulares no espaço perivitelino. Ainda, a diminuição dos contatos juncionais entre células trofoblásticas também

é evidente em embriões PIV. Após a criopreservação, os autores observaram maior número de gotículas lipídicas, e redução pronunciada dos contatos juncionais. A comparação entre os efeitos da criopreservação entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* mostrou que a quebra da zona pelúcida foi observada com maior frequência nos embriões PIV, e que embriões produzidos *in vivo* apresentam maior tolerância à exposição ao crioprotetor e à criopreservação.

Jin et al. (2011) demonstraram que a permeabilidade dos embriões bovinos em estágio de mórula a crioprotetores é baixa, ocorre por canais de aquaporina 3 (difusão facilitada: glicerol e etilenoglicol) e difusão simples (DMSO). Camargo et al. (2011) observaram que o sistema de cultivo e a vitrificação afetam a expressão das aquaporinas, que estão diretamente relacionadas com a habilidade de reidratação dos embriões criopreservados.

Além dos efeitos da criopreservação serem mais acentuados em embriões PIV que em embriões produzidos *in vivo*, a composição racial também afeta a criotolerância. Ao comparar embriões *Bos taurus* e *Bos indicus*, Visintin et al. (2002) observaram que antes da criopreservação, maiores e mais numerosas gotículas lipídicas em embriões da raça Holandesa, maior número de mitocôndrias em embriões Nelore, e maior número de vesículas contendo material parcialmente digerido (vacúolos fagossômicos) ligados ou não a lisossomos em embriões Nelore. Após a vitrificação, foi observado em ambos os tipos raciais um maior espaço perivitelino, sugerindo expansão incompleta dos blastômeros no processo de reidratação associada à remoção do crioprotetor. Apesar de macroscopicamente os embriões parecerem normais, as células embrionárias, principalmente de embriões Nelore, apresentaram alterações significativas, como sinais qualitativos e quantitativos de degeneração: células edemaciadas, apresentando injúrias citoplasmáticas, vacuolização do núcleo, lise celular, membranas plasmáticas descontínuas, e processos similares aos observados na morte celular. A redução de microvilosidades na superfície de células trofoblásticas, aumento de vacúolos endossômicos, vacuolização mitocondrial e intensa expansão do compartimento de membrana também foram descritos. Os embriões da raça Holandesa apresentaram melhores condições morfológicas após o processo de vitrificação, sugerindo maior criotolerância.

Efeitos dos meios de cultivo *in vitro* na criotolerância dos embriões

Por mais adequado que seja o ambiente de cultivo *in vitro*, dificilmente se aproximará do ambiente uterino e tubárico. O fornecimento de nutrientes não é dinâmico e não

conhecemos todas as substâncias importantes ao desenvolvimento embrionário *in vivo*, para suplementá-las adequadamente. Por isso, algumas moléculas podem ser fornecidas em excesso e outras importantes podem ser negligenciadas. Além disso, o fato dos embriões não se movimentarem, como ocorre no ambiente uterino e tubárico, e alterações de luminosidade, mudança de temperatura e atmosfera gasosa durante o processo, podem ocasionar danos aos embriões. Por isso, sabemos que os embriões produzidos *in vitro* apresentam alterações morfológicas (FAIR et al., 2001), alterações gênicas (WRENZYCKI e NIEMANN, 2003), e epigenéticas (ENRIGHT et al., 2003). Tais alterações culminam com a formação de blastocistos de qualidade inferior quando comparados aos produzidos *in vivo*, o que será refletido na menor sobrevivência ao stress celular causado pela criopreservação.

Já foi demonstrado em diversos estudos que o sistema de cultivo afeta a criotolerância dos blastocistos nele produzidos (RIZOS et al., 2001). Este efeito é facilmente observado quando se compara o cultivo *in vivo* com o *in vitro*. Enright et al. (2000) demonstraram que zigotos produzidos *in vitro* e cultivados no oviduto de ovelhas (*in vivo*) apresentaram maior criotolerância em comparação aos cultivados *in vitro*. Lonergan et al. (2003) delinearam um estudo para avaliar em que estágio de desenvolvimento o cultivo *in vivo* seria mais crítico na aquisição da criotolerância e demonstrou que os quatro últimos dias de cultivo (D4-D7) são especialmente importantes. Outro estudo conduzido por Havlicek et al. (2010) descreve que quanto maior o tempo em ambiente *in vivo*, maior a criotolerância dos embriões produzidos.

Dentre os principais componentes que parecem estar envolvidos na diminuição da criotolerância de embriões PIV, pode-se apontar o acúmulo anormal de lipídeos intracitoplasmáticos nos embriões, principalmente nos sistemas que utilizam soro fetal bovino (SFB) (ABE et al., 2002). Neste contexto, diversos estudos demonstraram que a substituição do SFB tem efeito positivo sobre a congelabilidade dos blastocistos produzidos (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, 2007; MUCCI, 2006; MOORE et al., 2007). Outros estudos demonstraram que a adição de agentes delipidantes, que diminuem a acumulação lipídica em embriões, tais como o ethosulfato de phenazina (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, 2007) e compostos de ácido linoleico ao meio de cultivo com SFB, aumentaram a criotolerância dos embriões produzidos (PEREIRA et al., 2008). Diez et al. (2001) promoveram a remoção de gotículas lipídicas dos embriões e perceberam também um aumento na criotolerância, deixando claro que há interferência destas estruturas na congelabilidade.

Além da suplementação do SFB, outros aspectos do cultivo *in vitro* parecem ter efeito sobre a congelabilidade dos embriões. O co-cultivo com células do oviduto afeta positivamente os embriões criopreservados (SHIRAZI et al., 2009), assim como a adição de

alguns componentes, a exemplo da hialurona (BLOCK et al., 2009). O tipo de óleo utilizado no cultivo de microgotas também afeta a criotolerância dos embriões por alterar a composição lipídica das membranas embrionárias ou por causar danos pela peroxidação lipídica (VAN SOOM et al., 2001).

Outra estratégia para o aumento dos índices de criopreservação é a otimização da técnica. Algumas alterações nos protocolos tradicionais foram propostas, como a adição de albumina rica em lipídeos ao meio de vitrificação em substituição ao SFB (LIM et al., 2008). E até a aplicação de pressão hidrostática subletal logo antes do processo incrementam as taxas de sobrevivência após descongelamento (SIQUEIRA FILHO et al., 2011). A otimização dos aparatos para posicionamento dos embriões, de forma a facilitar a transferência de calor e proteção dos embriões, também foi o foco de muitas iniciativas (Cryotop®, Kitazato, Valencia, Spain).

Após o descongelamento, os embriões apresentam padrão de transcrição gênica compatível com desenvolvimento embrionário subsequente a eclosão, demonstrando que eles ainda se apresentam potencialmente competentes (KUZMANY et al., 2011). No entanto, diversas alterações estão presentes nos embriões PIV após o descongelamento. Entre elas, o diâmetro dos poros da ZP encontra-se alterado, o que possivelmente dificulta a troca de líquido e nutrientes com o meio externo (MOREIRA DA SILVA e METELO, 2005). O perfil de expressão gênica de embriões descongelados também é alterado em comparação ao de embriões frescos (STINSHOFF et al., 2011). Tais alterações são ainda mais pronunciadas em embriões criopreservados pela congelação lenta. Dentre os genes alterados, estão transcritos relacionados à fragmentação de DNA (PARK et al., 2006).

Após o descongelamento, algumas técnicas permitem o aumento da competência dos blastocistos. Pryor et al. (2011), demonstraram que a eclosão assistida por laser aumenta a sobrevivência embrionária após a descongelação, conferindo maior número de células totais e vivas aos blastocistos. Além disso, o cultivo dos embriões na presença de alguns agentes culmina com o aumento da sobrevivência dos embriões. Hochi et al. (2010) testaram um inibidor da “Rho associated coiled-coil kinase” e observaram aumento na taxa de sobrevivência dos embriões vitrificados após descongelamento. A suplementação com hormônio tireoidiano também melhorou a expansão e eclosão dos blastocistos após descongelamento (ASHKAR et al., 2010). A adição de β -mercaptoetanol promoveu diminuição na fragmentação de DNA observada após a vitrificação (HOSSEINI et al., 2009). Ainda, a adição de IGF-I durante o descongelamento de embriões criopreservados melhora a

organização da actina, aumenta o número de células e diminui as taxas de apoptose (MAKAREVICH et al., 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de embriões PIV é uma biotécnica ascendente, apesar de ainda não ser prática rotineira em diversos laboratórios. Porém, estudos demonstram que é possível a produção de embriões com maior potencial de sobrevivência à criopreservação. Diversos suplementos e práticas, quando aplicados ao meio de cultivo e também ao meio de descongelamento, promovem incrementos significativos na sobrevivência embrionária. Portanto, a associação destes conhecimentos recentes à rotina da PIV é promissora, e cria expectativa para viabilização rotineira das técnicas de criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. et al. 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 and Development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.

ASHKAR, F. A. et al. Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro. **Human Reproduction**, v. 25, n. 2, p. 334-344, 2010.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 11, p. 1395-1405, 2007.

BLOCK, J. et al. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos in vitro following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1063-1071, 2009.

BLOCK, J. et al. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5234-5242, 2010.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.11, 2008.

CAMARGO, L. S. et al. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 63, n. 3, p. 256-262, 2011.

DIEZ, C. et al. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 923-936, 2001.

ENRIGHT, B. P. et al. Culture of in vitro produced bovine zygotes vs *in vivo*: implications for

early embryo development and quality. **Theriogenology**, v.54, p.659-673, 2000.

ENRIGHT, B.P. et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 896-901, 2003.

FAIR, T. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186-195, 2001.

GÓMEZ, E. et al. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 194-199, 2009.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2 ed. São Paulo: ROCA, 2008, 395p.

HAVLICEK, V. et al. The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 832-837, 2010.

HOCHI, S. et al. Stimulatory effect of Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) inhibitor on revivability of in vitro-produced bovine blastocysts after vitrification. **Theriogenology**, v. 73, n. 8, p. 1139-1145, 2010.

HOSSEINI, S. M. et al. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, n. 6, p. 355-364, 2009.

IETS. 2013 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf, p. Statistics and data retrieval committee report., 2014. Acesso em: 16th April.

JIN, B. et al. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 4, p. 834-847, 2011.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived “in vitro” or “in vivo”. **Theriogenology**, v. 54, p. 313-326, 2000.

KUZMANY, A. et al. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. **Theriogenology**, v. 75, n. 3, p. 482-494, 2011.

LIM, K. T. et al. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3-4, p. 239-248, 2008.

LONERGAN, P. et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 337-346, 2003.

MAKAREVICH, A. V. et al. Post-thaw culture in presence of insulin-like growth factor I improves the quality of cattle cryopreserved embryos. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 97-102, 2012.

MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, 2011.

MOORE, K. et al. 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, n. 9, p. 1316-1325, 2007.

MOREIRA DA SILVA, F.; METELO, R. Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 3, p. 205-209, 2005.

MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006.

NEDAMBALE, T.L. et al. Comparison of in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or Vitrification. **Theriogenology**. v. 62, p. 437-449, 2004.

OHBOSHI, S. et al. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. **Zygote**, v. 6, n. 1, p. 17-26, 1998.

OLIVEIRA, C. et al. In vitro Culture of Bovine Embryos in Murine ES Cell Conditioned Media Negatively Affects Expression of Pluripotency-Related Markers OCT4, SOX2 and SSEA1. **Reproduction in Domestic Animals**, 2011.

PARIS, M.C.J.; SNOW, M.; COX, S.L.; SHAW, J.M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? **Theriogenology**, v.61, p.277-291, 2004.

PARK, S. Y. et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v. 14, n. 2, p. 125-131, 2006.

PEREIRA, R. M. et al. 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, n. 3-4, p. 322-32, 2008.

PRYOR, J. H. et al. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 24-33, 2011.

RIZOS.D. et al. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 1-16, 2001.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1-19, 2011.

SHARMA, V. Sperm storage for cancer patients in the UK: a review of current practice.

Human Reproduction, v. 26, n. 11, p. 2935-43, 2011.

SHIRAZI, A. et al. Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 59, n. 3, p. 285-290, 2009.

SIQUEIRA FILHO, E. et al. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 4, p. 585-90, 2011.

STINSHOFF, H. et al. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433-1441, 2011.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v.12, p.779-796, 2006.

VAN SOOM, A. et al. Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3-4, p. 169-76, 2001.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H.; RALL, W. F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1071-1084, 1997.

VISINTIN, J. A. et al. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 345-59, 2002.

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, n. 5315, p. 125-131, 1971.

WILLADSEN, S. M. et al. Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, n. 1, p. 141-151, 1976.

WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, n. 6, p. 649-656, 2003.

ZERNICKA-GOETZ, M. Proclaiming fate in the early mouse embryo. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 112-114, 2011.