



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

## CONCEITOS E MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

*Danieli Aparecida Bóbbio Moreski*<sup>1</sup>; *Ana Carolina Fanhani de A. Botelho*<sup>1</sup>; *Suellen Neves*<sup>2</sup>; *Fabio Luiz Bim Cavalieri*<sup>3</sup>; *Francielli Gasparotto*<sup>3</sup>; *Isabele Picada Emanuelli*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmicos do Programa de Pós-graduação em Tecnologias Limpas, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. [danielibobi@hotmail.com](mailto:danielibobi@hotmail.com)

<sup>2</sup>Acadêmico do Curso de Graduação de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR.

<sup>3</sup>Docentes dos Programas de Mestrado em Tecnologias Limpas do Centro Universitário Cesumar - UNICESUMAR, Maringá - PR. Pesquisadora do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação - ICETI. [isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br](mailto:isabele.emanuelli@unicesumar.edu.br)

### RESUMO

O Brasil tem a maior produção de embriões produzidos *in vitro* do mundo. Com o crescimento na produção de embriões de existe a necessidade cada vez maior de desenvolvimento e aperfeiçoamento das biotécnicas de reprodução principalmente a da criopreservação de embriões bovinos *in vitro*. Estudos indicam estes embriões são mais sensíveis à criopreservação que os *in vivo*, isso se deve as diferentes causas entre eles. Diante desta preocupação, este artigo teve como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica acerca da problemática da criopreservação de embriões *in vitro* bovinos e comparar os dados da literatura de dois métodos de criopreservação. Essa revisão visa sumarizar os principais fatores que afetam a criopreservação de embriões de PIVE, abordando o panorama da produção *in vitro* no Brasil, a geração de embriões de descarte e a sustentabilidade econômica e ambiental do processo; a criotolerância de embriões *in vitro* e *in vivo*; e as metodologias de congelamento lento e ultrarrápido (vitrificação). Com base na literatura pesquisada verifica-se que inúmeros esforços têm sido realizados para melhorar a taxa de sobrevivência dos embriões *in vitro* criopreservados, não só no que se restringe ao tipo de método de congelamento, mas principalmente os fatores biológicos inerentes ao oócito e também as células. No entanto, constatou-se que ainda não existe unanimidade sobre os melhores sistemas de produção *in vitro* (maturação e desenvolvimento embrionário) e o método de criopreservação mais eficiente para embriões bovinos produzidos *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotécnicas da Reprodução; Congelamento; Produção Sustentável; Vitrificação.

### 1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução são utilizadas para aumentar o número de animais de alta genética, aumentando assim a produtividade e reduzindo os custos de produção. Para tanto, são utilizadas diferentes técnicas de reprodução, como as técnicas de inseminação artificial, a transferência convencional de embriões, e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) prática eficaz na aplicação comercial e no melhoramento genético (VIANA et al., 2012).

Inicialmente, a PIVE no Brasil foi desenvolvida apenas para pesquisas e, conseqüentemente, não teve impacto comercial. De 2000 a 2008, a produção *in vitro* passou a ser utilizada em grande escala comercial e o Brasil passou a ser o maior produtor, saltando de 9,0 para 66,6% da produção mundial (VIANA et al., 2012).

Com as técnicas *in vitro* atuais, uma grande quantidade de embriões bovinos pode ser produzida a um custo relativamente baixo. Estes embriões podem ser utilizados para pesquisas científicas, servirem de suporte para outras biotécnicas como clonagem e transgênicos, ou para fins comerciais. No entanto, os embriões produzidos *in vitro* são caracterizados pela diminuição da capacidade de tolerar a criopreservação, em comparação com os embriões *in vivo* (LEIBO; LOSKUTOFF, 1993).

A criopreservação de oócitos e embriões são cruciais para a disseminação e conservação de recursos genéticos animais, tendo enorme potencial para proteger e gerenciar espécies (WOELDERS et al., 2006). Em embriões bovinos produzidos *in vitro*, um dos fatores mais limitantes é a vulnerabilidade a criopreservação. A diminuição da criotolerância possivelmente está correlacionada ao acúmulo lipídico no citoplasma desses embriões (ABE et al., 2002).



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

Os métodos usuais de criopreservação possuem boas taxas de sobrevivência para embriões bovinos *in vivo*, já para os *in vitro* geralmente resultam em baixas taxas de sobrevivência sugerindo serem metabolicamente anormais quanto ao acúmulo de lipídeos (DEL COLLADO et al., 2015; ABE et al., 2002; LEIBO; LOSKUTOFF, 1993). Atualmente os métodos do congelamento lento e ultrarrápido (vitriificação) são usados para criopreservar embriões bovinos.

O congelamento lento é amplamente utilizado, tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores e permite a transferência direta pós descongelamento (VOLKEL; HU, 1992). Por outro lado, o congelamento ultrarrápido pode ser uma metodologia mais favorável para a proteção dos embriões produzidos *in vitro* protegendo-os dos danos causadas pelos processos de resfriamento e aquecimento, pelo fato de possuir uma passagem rápida pelo estado crítico de temperatura, no entanto o descongelamento não é direto (VAJTA et al., 2006).

Frente à necessidade cada vez maior do desenvolvimento de processos produtivos sustentáveis, que gastem menos para produzir mais e que gerem a menor quantidade de resíduos de descarte em sua produção, o entendimento e o aperfeiçoamento dos processos de criopreservação de embriões na PIVE bovina é de suma importância para redução de descarte embriões excedentes da produção *in vitro*. Diante desta preocupação, este artigo teve como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica acerca da problemática da criopreservação de embriões *in vitro* bovinos e comparar os dados da literatura de dois métodos de criopreservação: o congelamento lento e o ultrarrápido.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para formar a base de sustentação do assunto a ser estudado, foram realizadas pesquisas científicas em bases de dados online textuais (Periódicos Capes, Ebsco, Scielo, Science Direct, BioOne, Banco de Teses da CAPES) e base de dados referenciais (Web of Science e bibliotecas).

Ademais, foram consultados livros, artigos, publicações e fonte de dados factuais sobre o assunto. Os textos foram lidos, analisados e fichados visando entender a dificuldade do congelamento de embriões *in vitro* bem como os tipos de técnicas utilizadas.

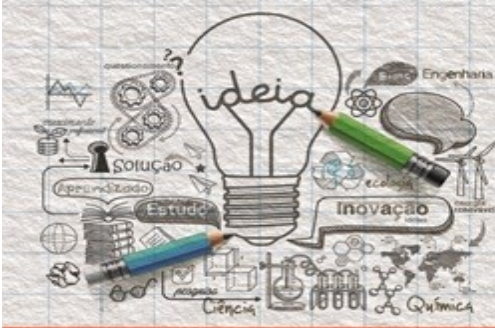
Após avaliação, os trabalhos que atenderam aos critérios de seleção e análise crítica foram utilizados para redigir a revisão bibliográfica. Para tanto, o trabalho foi estruturado em três seções. A primeira seção apresentou o panorama da produção *in vitro* no Brasil, a geração de embriões de descarte e a sustentabilidade econômica e ambiental do processo; a seção 2 abordou a criotolerância de embriões *in vitro* e *in vivo*; e as metodologias de congelamento lento e ultrarrápido (vitriificação).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PANORAMA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* NO BRASIL E DESCARTE DE EMBRIÕES

A produção *in vitro* de embriões bovinos vem se tornando uma prática promissora, uma biotécnica para aumentar a produtividade por promover a multiplicação rápida de animais de alta genética (SERAPIÃO et al., 2005).

O Brasil como maior produtor mundial destes tipos de embriões tem grande interesse em aumentar a sustentabilidade no processo produtivo desta técnica. O processo produtivo *in vitro* apresenta uma grande quantidade de embriões excedentes de boa qualidade, que na maioria das vezes são descartados, pois as técnicas de congelamento não são eficientes para esses tipos de embriões, levando a maioria deles a morte. Estima-se que 30% dos embriões de boa qualidade



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

produzidos são descartados por falta de receptora (dados internos do laboratório do autor). Esse descarte ocorre quando a produção média dos embriões supera a das receptoras sincronizadas disponíveis.

Analisando economicamente, essa prática usual de descarte de embriões *in vitro* gera uma perda de produto e conseqüentemente menor lucratividade aumentando o custo de produção. No enfoque ambiental, essa ação de descarte contribui para o desperdício de materiais e descarte de produto, bem como consumo de recurso e energia desnecessários. Dessa maneira, o aumento da eficiência da técnica de congelamento contribuiria para produzir mais com menos, um dos princípios da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014) e assim caracterizando sustentável também dentro da esfera ambiental utilizando menos recursos e poluindo menos o meio ambiente.

### 3.2. CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES *IN VITRO* E *IN VIVO*

As diferenças físicas e morfológicas dos embriões *in vitro* com relação ao *in vivo* estão associados à baixa resistência a criopreservação dos embriões produzidos em *laboratório* (ABE et al., 2002). Dentre as diferenças pode-se citar que *in vitro* há uma reduzida expressão de comunicações intercelulares, a menor compactação embrionária no estágio que precede a abertura da blastocela, menor quantidades de células totais na massa celular interna e zona pelúcida mais frágil (CROSIER et al., 2001), e é claro, o acúmulo intracelular de lipídeos (ABE et al., 2002).

Existem várias justificativas e motivos para estas alterações metabólicas na qualidade desses embriões *in vitro*, sendo uma delas atribuídas as condições de cultivo, que por apresentar soro animal é responsabilizado pelo aumento do acúmulo de lipídios no citoplasma (FARIN et al., 2004). Não está claro como e por que há esta acumulação de lipídios no citoplasma, fato é que o Soro Fetal Bovino afeta o número de gotas lipídicas que estão no citoplasma do embrião de PIVE (SUDANO et al., 2014).

Embriões cultivados sem soro tem redução de gotas lipídicas no citoplasma e possuem maior resistência a criopreservação (PEREIRA et al., 2008). Outro trabalho forneceu evidências convincentes que o acúmulo de lipídios em espécies como o bovino e o rato ocorre durante o primeiro passo do IVP, a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos e que não ocorre quando a maturação ocorre *in vivo* (DEL COLLADO et al., 2015). Este estudo mostrou ainda que a MIV causa alterações na dinâmica mitocondrial e lipídica, o que pode ter efeitos negativos nas taxas de desenvolvimento dos oócitos e no acúmulo de lipídios embrionários sem afetar as taxas de produção. Um estudo recente propõe uma quebra de paradigma para origem do acúmulo de lipídeo. Este estudo conseguiu demonstrar que o mais provável é que exista uma desregulação do metabolismo, não do oócito em si, mas das células que estão ao redor. E esse desequilíbrio de produção de lipídeo pelas células do cumulus provoca um fluxo aumentado de lipídios de fora para dentro do oócito. A consequência final é que o oócito acumula muito lipídeo e isso tem impacto no seu potencial (DEL COLLADO et al., 2017).

Stinshoff et al. (2011) mostrou ainda que a criopreservação afeta a qualidade dos embriões em nível molecular, como as alterações na expressão de alguns genes, sendo que nos embriões vitrificados foram menores que no do congelamento lento.

O estudo de Del Collado et al. (2017) também sugere um possível mecanismo para o transporte de ácidos graxos de células cumulus a oócitos via FABP3 e TZPs. Além disso, demonstrou a desregulação da síntese de FABP3 e sua acumulação em oócitos durante maturação *in vitro* (MIV), concomitante com a acumulação de lipídios. Estes autores sugerem que o aumento do acúmulo de lipídios nas células cumulus durante MIV poderia levar a um aumento



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

dos níveis de expressão de FABP3 para transportar esses ácidos graxos. Assim, essa desregulação das células do cumulus poderia levar ao acúmulo de lipídios nos oócitos durante a MIV. No entanto, os autores ressaltam que outras experiências são necessárias para verificar este novo mecanismo de acumulação de lipídios em oócitos.

### 3.3 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO: CONGELAMENTO LENTO E ULTRARRÁPIDO (VITRIFICAÇÃO)

Como já relatado, os processos de criopreservação podem acarretar em lesões em todas as fases do procedimento. Para tanto, é necessário que se compreendam as causas e mecanismos dessas lesões, melhorando as técnicas de criopreservação. Os danos sofridos pelos oócitos e embriões durante o resfriamento e o aquecimento podem ser revertidos, pois eles possuem mecanismos de reparar totalmente ou parcialmente este dano, e no melhor dos casos para continuar o desenvolvimento normal (ABE et al., 2012). Muitos destes danos podem ser ocasionados pelos próprios crioprotetores, pois a maioria deles possuem alguns efeitos negativos, incluindo toxicidade e lesões osmótica. A toxicidade é geralmente proporcional à concentração da substância e ao momento da exposição (VAJTA et al., 2006).

Atualmente, os dois métodos mais utilizados são o do congelamento lento e o ultrarrápido (vitrificação). As taxas de resfriamento podem variar de acordo com o método aplicado, de refrigeração moderada ou gradual entre a fisiológica temperatura para  $-4^{\circ}\text{C}$ , taxas de resfriamento altamente controladas para  $-40$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$ , seguido de mergulhar em nitrogênio líquido, para rápido (cerca de  $200^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ) ou ultrarrápido (até  $20,000-100,000^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ) em toda a temperatura (RALL, 2001; KASAI et al., 2004).

No processo de congelamento lento são usadas baixas concentrações de crioprotetores, mas permite-se a formação de cristais de gelo, resultando em lesões da membrana e organelas. A queda de temperatura mantendo-se controlada em uma curva constante até atingir a temperatura de  $-32^{\circ}\text{C}$ , quando as palhetas com embriões bovinos são mergulhadas em nitrogênio líquido (DODE et al., 2013).

No método de congelamento ultrarrápido (vitrificação) utilizam-se altas taxas de crioprotetores, nos quais se forma uma solução viscosa durante o resfriamento, e assim a água da célula fica em estado vítreo, sem formação de cristais de gelo (VAJTA et al., 2006). Esse método consiste na utilização de uma haste de polipropileno na qual os embriões são postos a volumes mínimos de crioprotetor (SPRICIGO et al., 2012).

Inaba et al. (2011) comparam o desenvolvimento de embriões *in vitro* com relação aos embriões *in vivo* em congelamento lento e a ultrarrápido em palheta e em *cryotop*, pode se observar que a taxa de eclosão em 48h foi maior no *cryotop*, outro estudo realizado por Diógenes et al., (2012) evidenciaram que entre o congelamento lento e o ultrarrápido, os melhores resultados em 48h foram do ultrarrápido. São comparados principalmente a morfologia, considerando o número de células e eclosão nos métodos de congelamento lento e vitrificação (DODE et al., 2013).

Outros trabalhos tentaram melhorar a criotolerância testando mudanças nas condições de cultivo mediante métodos físicos como o aumento na pressão hidrostática, (DODE et al., 2013). A pressão hidrostática já utilizada na criopreservação de ovócitos, embriões e espermatozoides (PRIBENSZKY et al., 2005). Neste estudo foi demonstrado que a retirada do SFB do meio de cultivo diminui a quantidade de lipídeos, por outro lado reduz a formação de blastocistos. Contudo, opção a delipidação química foram testadas com sucesso e podem ser utilizadas, isoladas ou em combinação nos sistemas de cultivo de embriões de PIVE. E com isso obtendo melhores respostas de embriões bovinos á criopreservação.



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

A pressão hidrostática foi demonstrada em bovinos que se deve ser aplicada duas horas antes do início da criopreservação, para assim a célula ter tempo de responder ao estímulo, e com isso aumentando sua resistência ao congelamento ultrarrápido (vitrificação), (SIQUEIRA et al., 2011).

Estudos realizados com forskolin mostrou que embriões cultivados com soro fetal bovino tem maior sensibilidade a criopreservação, mas quando foi adicionado forskolin ao meio o efeito da sensibilidade foi eliminado (PASCHOAL et al., 2014). Para a redução de lipídeos nos embriões outras substâncias químicas podem ser utilizadas como o etossulfato de fenazina (PES), o qual recebe elétrons do NADPH, resultando em NADP, que causa a estimulação da via das pentoses e assim, diminuindo a produção de lipídeos (BARCELOS-FIMBRES et al., 2007). Estudos demonstraram que o uso do PES no cultivo de embriões bovinos do dia 3 ao dia 7 obteve uma maior sobrevivência do blastocisto, seguidamente a criopreservação tanto no congelamento lento como no ultrarrápido.

Várias concentrações de SFB e a presença de PES foram utilizadas nos diferentes períodos de cultivo, e com isso pode-se concluir que a diminuição na concentração do SFB para 2,5% agregado a reforço com PES no meio a partir do dia 4, aumentou a taxa de sobrevivência pós o congelamento ultrarrápido (vitrificação) (SUDANO et al., 2011).

Embriões bovinos também estão susceptíveis a danos oxidativos, no período da criopreservação, sendo que os *in vitro* são mais vulneráveis ao estresse oxidativo no período de cultivo, impulsionados por fatores endógenos e exógenos (WANG et al., 2002). O estresse provoca alterações negativas nos processos de MIV e fecundação dos oócitos. Sendo estes aparentemente protegidos do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes dos fluidos folicular e do oviduto. Porém os oócitos quando retirados do ambiente natural para a produção *in vitro*, perdem sua defesa natural, cuidados extras devem ser tomados como a adição de oxidantes ao meio de cultivo, para que a eficiência da produção *in vitro* não reduza devido ao estresse oxidativo (WANG et al., 2002).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na literatura pesquisada verifica-se que inúmeros esforços tem sido realizados para melhorar a taxa de sobrevivência dos embriões *in vitro* criopreservados, não só no que se restringe ao tipo de método de congelamento, mas principalmente os fatores biológicos inerentes ao oócito e também as células. Uma melhor compreensão deste mecanismo de transporte ajudará no desenvolvimento de ferramentas para modular a acumulação de lipídios em oócitos durante a maturação

Com base nos dados obtidos, esforços para melhorar a taxa de sobrevivência dos embriões *in vitro* criopreservados, tem se restringido a modificações não somete nos processos nos sistemas de cultivo, pois com estudos recentes mostraram que a causa do acúmulo de lipídeos ocorre nas células oocitárias na maturação *in vitro* (MIV) oócito em si, este acúmulo excessivo está associado à redução da fertilidade desses bovinos; e com isso exigem-se esforços para o melhoramento para tornar embriões mais criotolerantes.

No entanto, constatou-se que ainda não existe unanimidade sobre os melhores sistemas de produção *in vitro* (maturação e desenvolvimento embrionário) e o método de criopreservação mais eficiente para embriões bovinos produzidos *in vitro*.



Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

## REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASSHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.

BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 11, p. 1406-1418, 2007.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; GASPAS, R. C.; PADILHA, L. C., COSTA R. R.; ROSSI, G. F. VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 1, p. 1721-1732, 2015.

DEL COLLADO, M.; SILVEIRA, J. C. da.; SANGALLI, J. R.; ANDRADE, G. M.; SOUSA, L. R. da. S.; SILVA, L. A.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. Fatty Acid Binding Protein 3 And Transzonal Projections Are Involved In Lipid Accumulation During *In Vitro* Maturation Of Bovine Oocytes. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 2645-2647, 2017.

DIÓGENES, M.; SPRICIGO, J.; DODE, M. Vitrificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (SBTE), 26., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Wish Resort Golf & Convention, 2012.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. bras. reprod. anim**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of animal science**, v. 82, n. 13, p. 53-62, 2004.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2014.

INABA, Y.; AIKAWA, Y.; HIRAI, T.; HASHIYADA, Y.; YAMANOUCHI, T.; MISUMI, K.; MATOBA, S. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 437-443, 2011.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004.

KUWAYAMA, M., VAJTA, G.; KATO, O.; LEIBO, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 3, p. 300-308, 2005.



**X**  
**EPCC**

Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 81-94, 1993.

PASCHOAL, D.M; SUDANO, M.J; GUASTALI, M.D; DIAS MAZIERO, R.R; CROCOMO, L.F; ONA MAGALHAES, L.C; RASCADO, T.S; MARTINS, A; LAMDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, n. 2, p.146-157, 2014.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and tissue banking**, v. 9, n. 4, p. 267-277, 2008.

PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; CSEH, S.; SOLT, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Anim Reprod Sci**, v. 87, n. 1, p. 143-50, 2005.

RALL, W. F. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes, and ovarian tissues. **Contemporary Endocrinology: Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals**. Humana Press, Towata, NJ, p. 173-187, 2001.

SERAPIÃO, R. V.; DE SÁ, W. F.; DE MORAIS, F. A.; DE ALMEIDA, C. L. S.; GILARDI, S. G. T.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A. G. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1-3, p. 58-61, 2005.

SIQUEIRA, F. E.; CAIXETA, E.S.; PRIBENSZKY, C.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; FRANCO, M. M.; 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, n. 1, p. 585-590, 2011.

SPRICIGO, J. F; MORAIS, K. S; YANG, B. S; DODE, M. A. Effect of the exposure to methyl-beta-cyclodextrin prior to chilling or vitrification on the viability of bovine immature oocytes. **Cryobiology**, v. 65, n. 1, p. 319-325, 2012.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M., DA SILVA, R. T.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; JUNIOR, A. M.; DA CRUZ, L. A, F. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-131, 2014.

VAJTA, G; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive biomedicine online**, v. 12, n. 6, p. 779-796, 2006.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim Reprod**, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2012.



**X**  
**EPCC**

Encontro Internacional  
de Produção Científica  
24 a 26 de outubro de 2017

VOLKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, n.1, p. 23-37, 1992.

WOELDER, H; ZUIDBERG, C.A; HIEMSTRA, S.J. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspectives. **Poultry Sci**, v. 85, n.1, p. 216–222, 2006.

WANG, X.; FALCONE, T; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A., & SHARMA, R. K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress–induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.