



Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós-desvitrificação

Association between antioxidant and hydrostatic pressure on the embryonic viability after

A.A.G. Fidelis^{1,4}, E. Siqueira Filho², L. Leme³, E. Ramiro Júnior³, A. Leme², R. Rumpf², M.M. Franco³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brasil.

²Geneal - Genética Animal Análise, Pesquisa e Laboratório S/A, Uberaba, MG, Brasil.

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

⁴Correspondência: andreifidelis@gmail.com

Resumo

Avaliou-se o efeito de dois antioxidantes no cultivo de embriões pós-desvitrificação, associados ou não à pressão hidrostática (PH) em três experimentos. O primeiro avaliou a interação entre PH e antioxidante (β -mercaptoetanol - BME, cisteamina - CYST e BME + CYST). O segundo, similar ao primeiro, vitrificou os embriões uma hora após passarem ou não pela PH. Os parâmetros foram taxas de eclosão e degeneração com 24 e 48 h após passar pela PH (experimento 1) e 12, 24, 48 e 72 h pós-desvitrificação (experimento 2). O experimento 3 avaliou a taxa de prenhez de embriões cultivados por 12 h com/sem BME. O primeiro experimento não demonstrou interação entre os tratamentos. No segundo, os resultados foram similares para BX. O tratamento BME + CYST obteve melhor taxa de eclosão dos BL com 48 e 72 h (76,04%). O mesmo fato ocorreu para a taxa de degeneração às 24 h (BME + CYST = 7,29%; 32,29% controle). Ao transferir os embriões (n = 55), percebeu-se uma similaridade em todos os grupos (38,9% CONT; 16,7% VITRIF e 31,6% BME). O presente trabalho mostrou que o uso da pressão hidrostática e de BME e CYST não influencia as taxas de eclosão, degeneração e de prenhez de embriões vitrificadas.

Palavras-chave: β -mercaptoetanol, bovino, cisteamina, criopreservação, embrião.

Abstract

This study aimed to evaluate different antioxidants in embryo culture after vitrification, with or without the previous use of hydrostatic pressure (PH). Three experiments were designed to evaluate the interaction between PH and antioxidants (β -mercaptoethanol - BME, cysteamine - CYST and BME + CYST) in fresh and vitrified in vitro produced embryos. In experiment 1 hatching and degeneration rates were evaluated at 24 and 48 h after passing through the PH and in experiment 2 the same parameters were evaluated at 12, 24, 48 and 72 h after heating. The last step of the study evaluated the pregnancy rate of vitrified embryos, cultured for 12 h with / without BME. The first experiment showed no difference between treatments. The second found similar results for all parameters evaluated in BX embryos. Note that the BME + CYST treatment obtained a better hatching rate in BL with 48 and 72 h (76.04%) than the control group (45.83%). The same behavior was observed in degeneration 24 h, where the BME + CYST group was 7.29% against 32.29% in the control. However, the pregnancy rates (55 embryo transfers) were not different between control fresh, control vitrified and BME groups (38.9%, 16.7% and 31.6%, respectively). This study showed that the use of hydrostatic pressure and antioxidant had no effect on the evaluated parameters.

Keywords: β -mercaptoethanol, bovine, cysteamine, cryopreservation, embryo.

Introdução

O Brasil tornou-se referência mundial em produção *in vitro* de embriões (PIVE) e lidera o *ranking* há alguns anos. O país deteve, em 2010, aproximadamente 58% da produção mundial desses embriões (Stroud e Callesen, 2012). Isso demonstra um foco em aumentar a produtividade da pecuária, tendo em vista uma crescente substituição de áreas destinadas à criação bovina para a agricultura. Tal fato revela o compromisso do país com a qualidade de seu rebanho e a incessante busca de melhoramento genético e eficiência de produção.

A utilização de biotecnologias na reprodução animal possui um papel chave para a multiplicação de animais geneticamente superiores. A quantidade de embrião bovino produzido *in vitro* é maior a cada ano no Brasil. Em contrapartida, o número de receptoras aptas a ingressarem nos programas comerciais não abastece o cenário nacional de maneira adequada, o que acarreta em um desequilíbrio entre número de embriões produzidos e quantidade de receptoras disponíveis. Diante desse entrave, a necessidade de criopreservar os embriões excedentes é uma alternativa bastante interessante, pois o processo de criopreservação permite armazenar material biológico por período indeterminado com pouca perda de viabilidade. Isso torna possível uma logística economicamente interessante para o sistema agropecuário, em que o investimento com protocolos de sincronização de estro seria mais eficiente. Além do impacto no setor produtivo, a criopreservação é indispensável para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção.

Sabe-se, entretanto, que o embrião oriundo de lavado uterino (*in vivo*) detém características distintas



quando comparado ao PIVE, como uma menor quantidade de lipídeos, maior grau de compactação, melhor qualidade das junções entre botão embrionário e trofoblasto (Van Soom et al., 1992). Isso explicaria, em parte, maior sensibilidade ao processo de criopreservação dos embriões PIVE.

Nesse contexto, a vitrificação pode ser considerada como alternativa de criopreservação mais adequada para os respectivos embriões. Diversos protocolos de vitrificação já foram desenvolvidos desde o primeiro relato da técnica (Rall e Fahy, 1985), cujas principais alterações desde então consistiram em aumentar consideravelmente a taxa de resfriamento/aquecimento pela redução no volume da solução de vitrificação (Vajta, 2000; Vajta e Kuwayama, 2006, Morato et al., 2008; Rios et al., 2010).

A pressão hidrostática anterior à vitrificação (Pribenszky et al., 2004; Bock et al., 2008; Siqueira Filho et al., 2011) vem sendo utilizada como forma de preparar o embrião para o estresse da criopreservação a partir de um estresse prévio.

Além dessa alternativa, a utilização de compostos antioxidantes (β-mercaptoetanol e cisteamina) no meio de maturação, durante o cultivo e/ou no cultivo pós-desvitrificação tem demonstrado efeitos positivos no embrião PIVE (De Matos e Furnus, 2000; Furnus et al., 2008; Hosseini et al., 2009; Bagis et al., 2010). Contudo, ainda não há relatos sobre a associação dessas novas metodologias e um possível sinergismo para o incremento nas taxas de prenhez de embriões bovinos vitrificados. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência dos antioxidantes BME, CYST e ambos no cultivo embrionário pós-desvitrificação de embriões bovinos submetidos ou não à pressão hidrostática e na taxa de prenhez.

Material e Métodos

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA/UFU) pelo protocolo de número 090/12.

Recuperação de ovócitos e maturação in vitro (MIV)

Os ovários foram coletados de vacas sem raça definida, em abatedouros locais, distantes aproximadamente de 50 a 60 km do laboratório, e foram transportados em solução salina 0,9% suplementada com estreptomicina (50 mg/ml) e penicilina (100 mg/ml), à temperatura de 35-36°C. Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) foram rastreados e selecionados sob estereomicroscópio.

A composição do meio de maturação (MIV) consistiu de TCM 199 com sais de Earle (Gibco - BRL[®]) suplementado com 12 UI/ml de hormônio luteinizante, 0,01 UI/ml de hormônio foliculo estimulante, 0,1 mg/ml de L-glutamina, 0,075 mg/ml de amicacina, 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRL[®]), 100 µm de cisteamina e 1mg/ml de estradiol.

Os ovócitos selecionados foram lavados e transferidos em grupos de 40 por tubo de poliestireno de 5 ml (Falcon[®]) com 400 µl de meio de maturação (MIV) e 250 µl de óleo mineral. Foram maturados por 22 a 24 h.

Fecundação in vitro (FIV)

Após o período de maturação, os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 150 µL de meio de fecundação (FEC), suplementado com 10 µg/ml de heparina e PHE - 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina.

O sêmen utilizado em todos os experimentos foi de um mesmo touro e mesma partida, previamente testado para PIVE. Após descongelamento por 30 segundos em banho-maria a 36°C, os parâmetros de motilidade e vigor foram analisados antes e após a seleção espermática, realizada por meio do gradiente de Percoll[®], conforme proposto por Machado et al. (2009). O cálculo da dose inseminante/gota foi ajustado para uma concentração final equivalente a 1×10^6 espermatozoides/ml.

Ovócitos e espermatozoides foram coincubados por 18 h em estufa a 39°C, com 5% de CO₂. Considerou-se o dia da fecundação como D0.

Cultivo in vitro dos embriões (CIV)

Ao término do período de FIV, os possíveis zigotos foram pipetados para leve desnudamento e transferidos para gotas de 150 µL do meio de cultivo fluido sintético de oviduto suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (SOFaa) e 0,34 mM de tricitrato de sódio; 2,77 mM de mio-inositol e 5% de SFB.

Os embriões foram mantidos na mesma condição de temperatura, umidade e atmosfera gasosa por todo o período de cultivo, avaliados em D3 (72 h *pi*) quanto à clivagem e em D6 (144 h *pi*) e D7 (168 h *pi*) para taxa de desenvolvimento de blastocisto.

Todos os embriões D7 foram classificados segundo o manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1999), e apenas blastocistos de qualidade 1 foram utilizados.

Pressão hidrostática e vitrificação

Blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) foram aleatoriamente divididos em dois grupos. Um grupo de cada estágio permaneceu na estufa (grupo sem pressão - SEM) e o outro foi retirado do cultivo,



envasado e submetido por uma hora a 32°C, submetidos a uma pressão hidrostática de 60 MPa, segundo metodologia descrita por Siqueira Filho (2009) - grupo com pressão hidrostática (COM). Após esse procedimento, os embriões foram desnavados, cultivados por uma hora e vitrificados pela metodologia de Kuwayama et al. (2005).

Delineamento experimental

Experimento 1: Associação da pressão hidrostática e antioxidante em blastocistos bovinos produzidos in vitro

Nesse experimento foi avaliado o efeito da pressão hidrostática associada ao posterior cultivo com agentes antioxidantes na sobrevivência de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Para tal, BX e BL foram aleatoriamente divididos em dois grupos e submetidos ou não à pressão de 60 MPa, a 32°C, por uma hora, segundo Siqueira Filho (2009). Após esse período, foram novamente divididos em grupos, e a taxa de eclosão e degeneração foi avaliada em 24 e 48 h.

Após uma hora em cultivo ou na câmara de pressão, os BX foram novamente divididos ao acaso e separados em quatro grupos: (1) CONT (controle) - cultivo em meio SOF; (2) BME - cultivo em SOF acrescido com 100 µm de betamercaptoetanol; (3) CYST - cultivo em SOF acrescido de 100 µm de cisteamina e (4) BME + CYST - cultivo em SOF acrescido de 100 µm de BME e 100 µm de CYST. O mesmo procedimento foi realizado com os BL.

Nota-se, a partir de então, a formação de oito grupos por estágio embrionário (BX e BL), em que se têm dois grupos (SP - SEM e PH - COM) com quatro tratamentos cada um.

Experimento 2: Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento embrionário pós-vitrificação

O delineamento é similar ao experimento 1, entretanto, após o período de uma hora de cultivo pós-pressão, os embriões foram submetidos ao processo de vitrificação conforme descrito anteriormente. Os embriões do grupo SEM permaneceram 1,5 h em cultivo, sendo então vitrificados. Os parâmetros avaliados foram: taxa de eclosão e taxa de degeneração com 12, 24, 48 e 72 h após o aquecimento.

Experimento 3: Antioxidante na taxa de prenhez de embriões vitrificados

Com base nos resultados do experimento 2, dois grupos foram escolhidos para avaliar a taxa de prenhez: COM+CONT e COM+BME.

Foram utilizados 55 embriões produzidos a partir de ovócitos de abatedouro, inseminados com a mesma partida de um mesmo touro. Os BX de qualidade 1 foram divididos aleatoriamente em três grupos:

1. Grupo controle fresco (CONT. FRESCO): embriões produzidos *in vitro* e transferidos a fresco.
2. Grupo controle vitrificado (CONT. VITRIF): embriões vitrificados e aquecidos conforme já descrito. Permaneceram 12 h em cultivo antes da transferência.
3. Grupo BME (BME): embriões vitrificados e aquecidos conforme já descrito. Permaneceram 12 h em cultivo com suplementação de 100 µm de betamercaptoetanol antes da transferência.

As receptoras foram previamente sincronizadas e receberam embrião em D7, considerando-se o dia do cio como D0. Nesse experimento foi avaliada a taxa de prenhez com 30 dias e 60 dias.

Análise estatística

Todas as análises foram avaliadas pelo programa Prophet, versão 5.0, BBN Systems and Technologies, 1997.

Os dados relativos à taxa de eclosão e degeneração para os diferentes antioxidantes foram comparados utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis*. Os dados relativos ao efeito da pressão hidrostática e ao estágio embrionário foram comparados utilizando o teste de *Mann-Whitney*. Os resultados de taxa de prenhez foram submetidos ao teste qui-quadrado. Foram consideradas significativas diferenças com $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm D.P.

Resultados

Foram utilizados 4560 ovócitos e produzidos 1924 blastocistos (42,2%) nos três experimentos.

Experimento 1

No experimento 1 foram realizadas seis repetições, totalizando 489 embriões.

Os valores de eclosão e degeneração não diferiram entre os grupos quando se considera o estágio embrionário, ou seja, BX e BL. Entretanto, ao confrontá-los entre si, nota-se uma significância estatística, porém sem a influência dos tratamentos.

A taxa de eclosão média dos BX ficou em 77,2% com 24 h e em 19,6% para os BL. Com 48 h, esses índices foram para 94,2 e 71,6%, respectivamente. A taxa média de degeneração foi maior para o estágio BL,



com 4,2% em 24 h e 11,7% com 48 h, contra 0 e 4,2% dos embriões BX.

Esses resultados demonstram que não há qualquer tipo de interação entre o uso da pressão hidrostática previamente ao cultivo embrionário com substâncias antioxidantes, como o β -mercaptoetanol e a cisteamina.

Experimento 2

O presente experimento utilizou 664 embriões em oito repetições, divididos e analisados de maneira similar ao experimento 1, entretanto os embriões foram vitrificados uma hora após serem submetidos ou não à pressão hidrostática.

As taxas de eclosão e degeneração dos embriões BX foram similares em todos os tratamentos submetidos. De forma resumida, as médias de eclosão dos BX foram de 34,84% com 12 h de cultivo, 73,19% com 24 h, 93,34% com 48 h e 95,39% com 72 h. Já as taxas de degeneração foram de 0,5; 0,52; 1,36 e 2,63%, respectivamente.

Ao avaliar apenas BL, nota-se um efeito positivo do uso de antioxidante quando comparado ao controle. De acordo com a Tab. 1, o grupo BME + CYST foi significativamente superior ao grupo controle dentro dos parâmetros 48 e 72 h para eclosão e 24, 48 e 72 h para degeneração.

Experimento 3

Nesse experimento, os BX foram divididos aleatoriamente em três grupos: CONT FRESCO; CONT VIT e BME VIT.

Todos os embriões foram submetidos à pressão hidrostática antes da vitrificação. Duas repetições foram feitas nessa etapa e um total de 55 embriões foram transferidos (Tab. 2). O diagnóstico de gestação foi feito aos 30 e 60 dias após TE.

Discussão

Os resultados mostraram que não houve interação entre o uso da PH seguido de cultivo embrionário com substâncias antioxidantes. O uso da PH não influenciou a taxa de eclosão e de degeneração nesse primeiro experimento. Siqueira-filho (2009) testou diferentes tipos de pressão e tempo em embriões bovinos. Observou uma significativa melhora na taxa de eclosão com 48 h nos embriões submetidos à PH por uma hora e 60MPa. Em ovinos, resultados similares foram descritos por Bogliolo et al. (2010). Sabe-se que o uso da PH aumenta a expressão gênica global, inclusive de genes relacionados ao estresse oxidativo (Siqueira Filho et al., 2011). Por esse motivo, uma melhoria nos embriões submetidos à pressão hidrostática quando comparados aos do grupo controle é esperada, fato que não foi observado no presente trabalho.

Quando a variável estágio embrionário (BX vs. BL) foi levada em consideração, houve significância em todos os parâmetros analisados. Além do número de blastômeros viáveis, a cinética de desenvolvimento embrionário é um dos parâmetros usados para competência ovocitária, o que explicaria o comportamento dos dados obtidos de estágio embrionário (Rizos et al., 2002).

O presente experimento demonstra claramente a influência da utilização de substâncias antioxidantes nas taxas de sobrevivência embrionária de blastocistos desvitrificados (Tab. 1), principalmente em reduzir o índice de embriões degenerados. A taxa de degeneração de BL com 12, 24, 48 e 72 h para embriões cultivados com antioxidante foi de 5,9; 8,68; 16,67 e 20,14%, respectivamente. Já para os embriões do grupo controle, as taxas foram de 19,79; 32,29; 45,83 e 47,83% ($P < 0,05$).

Cabe ressaltar que nenhum dos tratamentos foi responsável por melhorias em embriões BX. Como citado anteriormente, a cinética de desenvolvimento embrionário possui alta correlação com qualidade embrionária. Os embriões vitrificados em D7 encontravam-se, em sua maioria, no estágio de blastocisto expandido (78%). A criotolerância, o número de células, a taxa de eclosão e degeneração são melhores nesse grupo embrionário. Portanto, ao criopreservar embriões, o objetivo de tal procedimento deve ser muito claro, uma vez que se recomenda vitrificar os melhores embriões (o estágio embrionário é um ponto a se considerar nesse momento). Para conservação de germoplasma animal de raças ameaçadas de extinção e para vacas com mérito genético comprovado e com pouca produção de embrião, a criopreservação de BL é justificável. Logo, os resultados aqui demonstrados e discutidos possuem interessante aplicação.

A terceira etapa deste trabalho consistiu em transferir os embriões e avaliar a taxa de prenhez com 30 e 60 dias. A escolha do BME para representar o tratamento antioxidante foi pelo potencial de neutralização de ROS. Sabe-se que a hidroxila dessa molécula é altamente reativa. Todos os embriões foram submetidos a 60 min de PH, com 60MPa. Os resultados não diferiram entre si (Tab. 2). O número de transferências não foi suficientemente alto para uma precisa avaliação estatística. Entretanto, ao observar a taxa de prenhez, nota-se um índice satisfatório para embriões produzidos *in vitro* criopreservados. O número de TE foi aquém do mínimo necessário para obter uma informação estatisticamente precisa. O grande entrave de desenvolver pesquisas com taxas de prenhez consiste no modelo trabalhado, pois o custo de manutenção de receptoras e outros fatores tornam essa etapa altamente onerosa. Ao se compararem as transferências - 55, os índices gestacionais são extremamente satisfatórios (31,6% - BME; 38,9% - fresco e 16,7% - controle vitrificado) quando comparados aos dados da literatura: Stewart et al. (2011) - 25,7%; Block et al. (2010) - 27,7%; Akiyama et al. (2010) - 34,8%.



Tabela 1. Efeito dos antioxidantes no desenvolvimento de blastocistos (BL) pós-vitrificação.

Antioxidante	Pressão	n	Taxa de eclosão (Média ± D.P) %				Taxa de degeneração (Média ± D.P) %			
			12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Controle vitrificado	SEM	16	8,33 (±23, 57)	14,58 (±27, 37)	50,0 (±47,14) ^A	50,0 (±47,14) ^A	16,67 (±23, 57)	35,42 (±44,04) ^A	41,67 (±49,60) ^A	45,83 (±46,93) ^A
	COM	17	0	10,42 (±19,80)	25,0 (±21,82) ^A	29,17 (±26,35) ^A	22,92 (±36,66)	29,17 (±36,46) ^A	50,0 (±34,50) ^A	50,0 (±34,50) ^A
BME	SEM	18	6,25 (±17,68)	22,92 (±36,66)	47,92 (±46,66) ^{AB}	62,50 (±44,32) ^{AB}	4,17 (±11,79)	8,33 (±23,57) ^{AB}	27,08 (±39,78) ^{AB}	27,08 (±39,78) ^{AB}
	COM	18	0	27,08 (±35,57)	39,58 (±41,73) ^{AB}	52,08 (±43,13) ^{AB}	0	12,50 (±23,15) ^{AB}	35,42 (±44,04) ^{AB}	43,75 (±42,67) ^{AB}
CYST	SEM	19	18,75 (±25,88)	25,0 (±37,80)	64,58 (±30,13) ^{AB}	79,17 (±29,21) ^A	6,25 (±17,68)	6,25 (±17,68) ^{AB}	6,25 (±17,68) ^{AB}	6,25 (±17,68) ^{AB}
	COM	20	4,17 (±11,79)	10,42 (±19,80)	52,08 (±33,85) ^{AB}	56,25 (±21,71) ^A	10,42 (±19,80)	10,42 (±19,80) ^{AB}	16,67 (±23,57) ^{AB}	25,0 (±28,17) ^{AB}
CYST + BME	SEM	19	6,25 (±17,68)	39,58 (±32,04)	79,17 (±23,15) ^B	79,17 (±23,15) ^B	10,42 (±19,80)	10,42 (±19,80) ^B	10,42 (±19,80) ^B	10,42 (±19,80) ^B
	COM	18	6,25 (±17,68)	18,75 (±25,88)	72,92 (±23,46) ^B	72,92 (±23,46) ^B	4,17 (±11,79)	4,17 (±11,79) ^B	4,17 (±11,79) ^B	8,33 (±15,43) ^B

^{A,B}Diferentes sobrescritos na coluna diferem significativamente.

Tabela 2. Prenhez de embriões vitrificados, cultivados ou não com antioxidante.

GRUPO	n	P30	%	P60	%
CONT FRESCO	18	9	50	7	38,9
CONT VIT	18	4	22,2	3	16,7
BME VIT.	19	7	36,8	6	31,6

CONT= grupo controle; VIT = vitrificado; BME = 100 µm de betamercaptoetanol; P30 = taxa de prenhez aos 30 dias; P60 = taxa de prenhez os 60 dias.



Conclusões

O parâmetro “estágio embrionário” deve ser levado em consideração no momento em que o embrião será vitrificado, uma vez que os dados discriminados neste estudo mostram benefícios dessas ferramentas apenas em embriões BL.

São necessários testes complementares como análise da expressão gênica de fatores relacionados com o estresse oxidativo, mensuração de radicais livres na gota de cultivo, transferência de um maior número de embriões para que se alcance um desfecho mais concreto quanto aos dados demonstrados.

Referências

- Akiyama K, Kobayashi J, Sato Y, Sata R, Ohashi M, Sasaki E, Oda Y, Ogawa Y, Ueda S, Nabenishi H, Matoba S.** Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Anim Sci J*, v.81, p.461-466, 2010.
- Bagis H, Akkoc T, Taskin C, Arat S.** Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.e332-337, 2010.
- Block J, Bonilla L, Hansen PJ.** Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci*, v.93, p.5234-5242, 2010.
- Bock I, Mamo S, Polgar Z, Pribenszky C.** Changes in gene expression of mouse blastocysts treated with high hydrostatic pressure pulse. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.145-146, 2008.
- Bogliolo L, Ariu F, Uccheddu S, Strina A, Rosati I, Zedda MT, Ledda S.** High hydrostatic pressure treatment improves the quality of in vitro-produced ovine blastocysts. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.202-202, 2010.
- De Matos DG, Furnus CC.** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, v.53, p.761-771, 2000.
- Furnus CC, De Matos DG, Picco S, Garcia PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL.** Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci*, v.109, p.88-99, 2008.
- Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langroodi M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaied S, Nasr-Esfahani MH.** Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *J Assisted Reprod Geneti*, v.26, p.355-364, 2009.
- 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.
- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA.** Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v.71, p.1289-1297, 2009.
- 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*, v.57, p.137-141, 2008.
- Pribenszky C, Molnar M, Cseh S, Solti L.** Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure. *Acta Vet Hung*, v.52, p.479-487, 2004.
- Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, v.313, n.6003, p.573-575, 1985.
- Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Alberio RH.** Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, v.118, p.19-24, 2010.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.234-248, 2002.
- Siqueira Filho E.** Pressão hidrostática: efeito na vitrificação, ultraestrutura e expressão gênica de embriões bovinos. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.
- 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.
- Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, Hansen PJ, BILBY TR.** Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *J Dairy Sci*, v.94, p.3437-3445, 2011.
- Stringfellow DA, Seidel SM (Ed.).** Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Champaign, IL: IETS, 1999.



- Stroud B, Callesen H.** IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. *Anim Reprod*, v.9, p.210-216, 2012.
- Vajta G.** Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.357-364, 2000.
- Vajta G, Kuwayama M.** Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, De Kruif A.** Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, v.38, p.905-919, 1992.
-