

DESENVOLVIMENTO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES EM CAPRINOS

LUDYMILA FURTADO CANTANHÊDE
MARCELO TIGRE MOURA
MAIANA SILVA CHAVES
PAULO FERNANDES DE LIMA
MARCOS ANTÔNIO LEMOS DE OLIVEIRA

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Pernambuco.

Autor para correspondência: maloufrpe@uol.com.br

Resumo: A criopreservação de embriões permite a conservação do material genético de caprinos por períodos indefinidos de tempo. O método de congelamento tradicional e a vitrificação são os principais métodos de criopreservação de embriões, diferindo pela velocidade de resfriamento e concentrações de crioprotetores. Além dos aspectos técnicos, o sistema de produção de embriões (*in vitro*, *in vivo*, micro-manipulação), a qualidade morfológica e o estágio de desenvolvimento são fatores determinantes para a eficiência da criopreservação. O objetivo desta revisão foi apresentar um breve histórico, aplicações, principais investigações e algumas perspectivas sobre a criopreservação de embriões em caprinos.

Termos para indexação: *Capra hircus*, criobiologia, reprodução.

DEVELOPMENT OF EMBRYO CRYOPRESERVATION IN GOATS

Abstract: The cryopreservation of preimplantation embryos allows the conservation of animal genetic material of goats for indefinite periods of time. The conventional freezing and vitrification are the main cryopreservation methods, differing for freezing duration and cryoprotectant concentration usage. Besides their technical details, embryo production system (*in vitro*, *in vivo* or micromanipulation), their quality based on morphology and developmental stage are major factors to cryopreservation efficiency. The aim of this review was to provide a brief history, applications, major research topics and some perspectives on embryo cryopreservation in goats.

Index terms: *Capra hircus*, cryobiology, reproduction.

Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900. Recife-PE/Brasil.

INTRODUÇÃO

O processo de criopreservação permite conservar as características celulares, genéticas e bioquímicas de células e tecidos por tempo indeterminado. A possibilidade de criopreservar embriões foi inicialmente demonstrada há quatro décadas em camundongos e bovinos (Whittingham et al., 1972; Wilmut, 1972ab; Wilmut e Rowson, 1973; Betteridge, 2006). A partir destes relatos, a tecnologia de criopreservação de embriões evoluiu em caprinos e possui aplicações nos contextos científico e comercial (Holtz, 2005; Paramio e Izquierdo, 2014), ao preservar material genético de espécies ameaçadas de extinção (Andrabi e Maxwell, 2007; Gama e Bressana, 2011; Mara et al., 2013), de animais de alto valor zootécnico ou transgênicos (Tibary et al., 2005; Paramio e Izquierdo, 2014), facilitar o transporte de germoplasma e reduzir o risco de transmissão de doenças (Chemineau et al., 1986), entre outras aplicações (Massip, 2001; Dobrinsky, 2002; Leibo, 2008).

Diversos fatores contribuem para a eficiência da criopreservação de embriões, como espécie, protocolo de criopreservação, qualidade e estágio de desenvolvimento embrionário (Massip, 2001; Dobrinsky, 2002). Apesar da crescente utilização da criopreservação de embriões em caprinos, a taxa de sobrevivência ao processo e desenvolvimento *in vivo* permanece inferior aos embriões a fresco, principalmente com embriões produzidos *in vitro* (PIV) (Leoni et al., 2009; Morató et al., 2011), hemi-embriões (Nowshari e Holtz, 1993), ou embriões após a retirada de biópsia do trofoblasto (Guignot et al., 2006, 2011).

O objetivo desta revisão foi descrever os principais relatos no estabelecimento de criopreservação de embriões em caprinos, apresentando as principais técnicas, esforços para aperfeiçoá-las e apresentar perspectivas sobre áreas promissoras de investigação.

MÉTODOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

A criopreservação consiste na exposição inicial do embrião à solução de proteção a congelamento (crioprotetor), que permite o equilíbrio entre o

embrião e a solução crioprotetora, pela retirada da água presente nas células e a substituição parcial ou total pelo crioprotetor. Em seguida, o embrião é exposto progressivamente a temperaturas abaixo de zero e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C). Ao final do período de armazenamento, o embrião é colocado em condições fisiológicas, após a remoção progressiva do crioprotetor (Massip, 2001).

Existem duas metodologias para criopreservação de embriões: a congelação e a vitrificação (Massip, 2001; Shaw e Jones, 2003; Seidel, 2006). A congelação utiliza curvas lentas (0,3-1,0 °C por minuto) ou rápidas (200-10.000 °C por minuto) de resfriamento associadas a crioprotetores de baixo peso molecular, como o glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol (EG), metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), entre outros (Bilton e Moore, 1976; Martino et al., 1996; Cognié et al., 2003; Loutradi et al., 2008).

A vitrificação é caracterizada pelo uso de crioprotetores com alto peso molecular e transferência direta dos embriões para o nitrogênio líquido (-196 °C), ou seja, resfriamento ultra-rápido (Vajta, 2000; Vajta e Kuwayama, 2006). O resfriamento rápido permanece como o fator fundamental da vitrificação, pois a alta viscosidade das soluções de vitrificação impedem a formação de cristais de gelo intracelular e extracelular, ocorrendo a formação do estado vítreo (Ali e Shelton, 1993; Shaw e Jones, 2003; Yavin e Arav, 2007).

CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE CAPRINOS

O primeiro relato de criopreservação de embriões por congelação e posterior nascimento em caprinos foi descrito em 1976 (Figura 1). Embriões caprinos mostraram resistência a conservação a 5 °C por períodos curtos ou armazenamento prolongado a -196 °C (Bilton e Moore, 1976). As investigações iniciais sobre a criopreservação de embriões caprinos foram inicialmente baseadas em resultados em bovinos (Tsunoda et al., 1987; Rao et al., 1988; Li et al., 1990), utilizando Glicerol, DMSO e EG como crioprotetores (Bilton e Moore, 1976; Chemineau et al., 1986; Li et al., 1990). Mais recentemente, outras alternativas foram investigadas para congelação de embriões caprinos (Tabela 1).

Diversos esforços foram executados para identificar crioprotetores e suas combinações que melhorassem a sobrevivência dos embriões caprinos criopreservados (Puls-Kleingeld et al., 1992; Le Gal et al., 1993; Fiéni et al.,

1995). Os crioprotetores EG e DMSO mostraram maior eficiência que o glicerol ou metanol (Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995; Martemucci e D'Alessandro, 2013), enquanto que o EG foi mais eficiente para embriões no estágio de mórula ou para o processo de congelação rápida (Fiéni et al., 1995; Martemucci e D'Alessandro, 2013).

Um fator determinante para a sobrevivência dos embriões submetidos a congelação é o estágio de desenvolvimento (Li et al., 1990; Puls-Kleingeld et al., 1992; Leibo et al., 1996), pois embriões mais desenvolvidos apresentam maior sobrevivência ao descongelamento (Li et al., 1990; Le Gal et al., 1993), maior taxa de reexpansão *in vitro* (Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995), taxa de prenhez e nascimentos (Le Gal et al., 1993). A eficiência da congelação de embriões no estágio de mórula tem se mostrado baixa (Li et al., 1990; Puls-Kleingeld et al., 1992; Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995; Nowshari e Holtz, 1995; Holtz, 2005; Al Yacoub et al., 2010), embora um relato tenha apresentado bons resultados (Le Gal et al., 1993). Esta limitação das mórulas à criopreservação, parece ser devido a alguma particularidade neste estágio específico do desenvolvimento, pois estes embriões também apresentam menor resistência à bipartição para produção de hemi-embriões (Nowshari e Holtz, 1995). Alternativamente, o cultivo *in vitro* de mórulas até o estágio de blastocisto permite que estes embriões sobrevivam a criopreservação com a mesma eficiência que os blastocistos produzidos *in vivo* (Nowshari e Holtz, 1995). Curiosamente, os blastocistos eclodidos caprinos apresentam boa criotolerância (Chemineau et al., 1986; Li et al., 1990; Le Gal et al., 1993), apesar da zona pelúcida ser considerada uma barreira auxiliar na adaptação do embrião ao processo de congelação (Holtz, 2005).

Após o processo de congelação, outra etapa determinante para o resultado final da criopreservação de embriões é a etapa de descongelação (Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995). A exposição à concentrações decrescentes de crioprotetores e adição de açúcares (sacarose, trealose, galactose) aumenta a sobrevivência dos embriões no processo descongelação (Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995). A proteção dos embriões contra o choque osmótico pela sacarose durante o descongelamento permite a transferência direta (Tabela 1), ou seja, transferência dos embriões para as receptoras sem avaliação morfológica após a descongelação (Le Gal et al., 1993; Kuleshova et al., 1999; Guignot et al., 2006). Apesar dos avanços sobre os fatores que

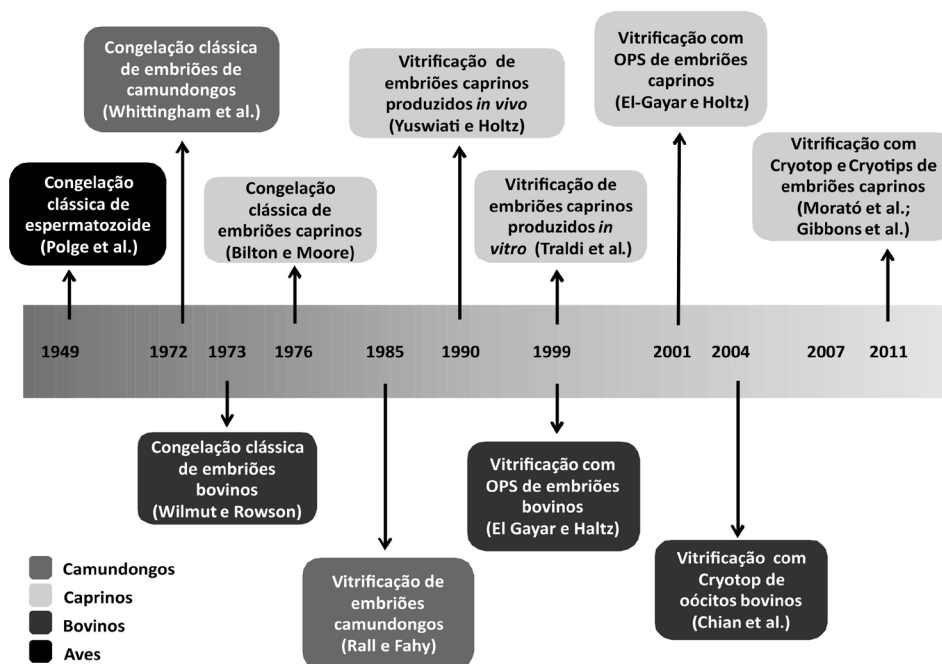
Tabela 1. Eficiência da Congelação de embriões caprinos.

Método	Criptotetor (es)	Produção de Embriões	Estádio do embrião	Re-Expansão <i>in vitro</i> (%)	Prenhez (%)	Sobrevivência embrionária (%)	Ref.
Congelação lenta	GLI / DMSO	<i>in vivo</i>	ND	12	ND	50	Bilton e Moore, 1976
Congelação lenta	GLI	<i>in vivo</i>	BL, BX, BE	80,7	68	30	Chemineau et al., 1986
Congelação lenta	GLI / EG	<i>in vivo</i>	MO, BL	0-67	ND	28-54	Le Gal et al., 1993
Congelação lenta / Bipartição	GLI + sacarose	<i>in vivo</i>	BL	78-83	18-54	9	Nowshari e Holtz, 1993
Congelação lenta	GLI / DMSO + EG	<i>in vivo</i>	MO, BL	0-60	NA	NA	Fieni et al., 1995
Congelação lenta	GLI + sacarose	<i>in vivo</i>	BL	94	54	41	Nowshari e Holtz, 1995
Congelação rápida	GLI + sacarose	<i>in vivo</i>	BL	ND	58	42	El-Gayar e Holtz, 2001
Congelação lenta	GLI / EG	<i>in vivo</i>	ND	NA	9-18	12-29	Guignot et al., 2006
Congelação lenta	EG	<i>in vivo</i>	MO, BL, BE	NA	33-50	19-42	Al Yacoub et al., 2010
Congelação lenta e rápida	EG / MET + sacarose	<i>in vivo</i>	MO, BL	34-73	28-66	ND	Martemucci e D'Alessandro, 2013

GLI: glicerol; DMSO: dimetilsulfóxido; EG: etilenoglicol; MET: metanol; MO: mórula; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido; ND: não determinado; NA: não avaliado.

influenciam a congelação de embriões caprinos, as investigações utilizam quase exclusivamente os embriões produzidos *in vivo* (El-Gayar et al., 2001; Begin et al., 2003; Guignot et al., 2011; Gibbons et al., 2011; Marmetucci e D’Alessandro, 2013).

Figura 1. Cronologia da criopreservação de gametas e embriões.



VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DE PEQUENOS RUMINANTES

A demonstração que os embriões caprinos sobrevivem ao processo de vitrificação (Figura 1), veio em sequência ao relato pioneiro em embriões de camundongos (Rall e Fahy, 1985; Yuswiati e Holtz, 1990). A partir de embriões produzidos *in vivo*, dois caprinos foram obtidos de mórulas e blastocistos vitrificados (Yuswiati e Holtz, 1990). O desenvolvimento da vitrificação de embriões permitiu a criopreservação de embriões PIV caprinos (Traldi et al., 1999; Leoni et al., 2009; Morató et al., 2011). Os embriões PIV de caprinos, ovinos e bovinos são menos resistentes a criopreservação (Massip, 2001; Cognié et al., 2003; Mermillod, 2011; Souza-Fabjan et al., 2014) e fatores como o sistema de PIV e a condição reprodutiva das doadoras de ovócitos

tem influência sobre a criotolerância de embriões (Rodriguez-Dorta et al., 2007; Leoni et al., 2009).

Embriões PIV cultivados em meio contendo soro sanguíneo acumulam mais lipídeos em seu citoplasma, que por sua vez afeta a viabilidade dos embriões após criopreservação (Abe et al., 1999). A redução da quantidade de lipídeos dos embriões PIV por centrifugação aumentou a tolerância à congelação (Leibo et al., 1995). Porém, a taxa de prenhez foi considerada baixa quando estes embriões foram transferidos para receptoras (Diez et al., 1996). Outra alternativa para reduzir a quantidade de lipídeos dos embriões PIV foi cultivá-los em meio sem soro ou através da suplementação com ácido hialurônico (Abe et al., 2002; Dattena et al., 2007; Block et al., 2009).

Diferentes combinações de crioprotetores têm sido testadas para vitrificar embriões caprinos (Guignot et al., 2006; Hong et al., 2007). Um nova alternativa de crioprotetor e a dimetilformamida (DMF), inicialmente testada para criopreservar sêmen caprino (Bezerra et al., 2011; Araújo-Lemos et al., 2014). Araújo-Lemos et al. (2015) compararam a vitrificação em duas combinações de crioprotetores (DMSO+ EG e DMF+EG), e a congelação com EG. A vitrificação com DMSO+EG foi a mais eficiente em todas as avaliações (ultra-estrutura, viabilidade celular e taxa de reexpansão *in vitro*).

A pesquisa sobre a vitrificação de embriões caprinos tem recebido bastante ênfase na avaliação de métodos alternativos, que buscam reduzir o volume contendo o(s) crioprotetor(es) para acelerar o processo de resfriamento e reduzir os riscos de choque osmótico (Kasai e Mukaida, 2004). O método “open pulled straw” (OPS) é baseado em palhetas ultrafinas (metade do diâmetro convencional), reduzindo o volume de vitrificação e acelerando o processo de resfriamento de aproximadamente 2.500 °C por minuto para 20.000 °C por minuto (Vajta et al., 1998; El-Gayar e Holtz, 2001). Esta aceleração do resfriamento reduz os riscos de desidratação e choque osmótico dos embriões e tornou a vitrificação aplicável para transferência direta, inclusive em caprinos (El-Gayar e Holtz, 2001; Rodriguez-Dorta et al., 2007). Diversos relatos demonstraram a aplicação da vitrificação com OPS em caprinos (El-Gayar e Holtz, 2001; Holtz, 2005; Guignot et al., 2006; Hong et al., 2007; Al Yacoub et al., 2010; Araújo-Lemos et al., 2014). A vitrificação com OPS foi testada como alternativa para mórulas (Holtz, 2005; Hong et al., 2007; Al Yacoub et al., 2010), embora essas investigações não tenham demonstrado

Tabela 2. Eficiência da vitrificação de embriões caprinos.

Método	Crioprotetor (es)	Produção de Embriões	Estádio do embrião	Re-Expansão <i>in vitro</i> (%)	Preenhez (%)	Sobrevivência embrionária (%)	Ref.
Convencional	GLI + Propanediol	<i>in vivo</i>	MO, BL	NA	22	~7	Yuswanti e Holz, 1990
Convencional	GLI + EG + galactose	<i>in vitro</i>	BL	60	NID	30	Traldi et al., 1999
OPS	DMSO + EG + sacarose	<i>in vitro</i>	BL	NA	100	64	El-Gayar e Holz, 2001
SSV -Cryoloop	EG + PVP + Trealose; DMSO + EG + Ficoll + Sacarose	<i>in vitro</i>	2-4 células	0-27	NA	NA	Begim et al., 2003
OPS;							
Transfêrência Direta	GLI + EG + galactose	<i>in vitro</i>	NID	NA	9-18	8-29	Guignot et al., 2006
Transfêrência Direta	GLI + EG + Sacarose	<i>in vitro</i>	BX, BE	NA	14-92	9-62	Rodríguez-Dorta et al., 2007
Convencional	GLI + EG + sacarose	<i>in vitro</i>	BL	40-62	NA	NA	Leoni et al., 2009
OPS	DMSO + EG	<i>in vitro</i>	MO, BL, BE	NA	0-82	0-70	Al Yacoub et al., 2010
Cryotop	DMSO + EG + sacarose	<i>in vitro</i>	BL, BX, BE	50-57	NA	NA	Morato et al., 2011
Cryo-tips	GLI + EG	<i>in vitro</i>	MO, BL	80-100/NID	0-63	0-63	Gibbons et al., 2011
Biopisa	GLI + EG + sacarose	<i>in vitro</i>	BL	NID	90	~43	Guignot et al., 2011
Convencional	EG + GLI	<i>in vitro</i>	MO, BL	75/NID	70	NID	Martenucci e D'Alessandro, 2013

GLI: glicerol; EG: etilenoglicol; PVP: polivinilpirrolidina; OPS: Open Pulled Strain; SSV: Solid-surface vitrification; MO: mórula; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido; BE: blastocisto eclodido; NID: não determinado; NA: não avaliado.

ser uma alternativa viável e consistente entre laboratórios. A vitrificação com OPS mostrou-se mais eficiente que a congelação de blastocistos (El-Gayar e Holtz, 2001; Al Yacoub et al., 2010), embora seja semelhante para blastocistos eclodidos (Al Yacoub et al., 2010). Adaptações na vitrificação com OPS, como a variação no tempo de equilíbrio na solução de vitrificação, uso de sacarose e transferência direta tem aumentado as taxas de sobrevivência dos embriões, de prenhez e nascimentos (Guignot et al., 2006; Hong et al., 2007). Apesar do potencial da vitrificação com OPS, existe o risco de contaminação por agentes bacterianos e virais, pois a palheta permanece aberta durante o armazenamento em nitrogênio líquido (Fountain et al., 1997).

Outras variações no método de vitrificação com objetivos semelhantes ao OPS foram avaliadas com embriões caprinos: cryotop (Morató et al., 2011), cryo-tips (Gibbons et al., 2011), cryoloop e “solid-surface vitrification” (Begin et al., 2003). O uso de cryo-tips permitiu estabelecer prenhez a partir de blastocistos, embora as mórulas não tenham sobrevivido ao procedimento (Gibbons et al., 2011). Além disso, o método cryoloop permitiu a obtenção de blastocistos a partir de embriões clivados vitrificados (2-4 células), demonstrando pela primeira vez a criopreservação de embriões caprinos antes do período de compactação durante o desenvolvimento embrionário (Begin et al., 2003). Embriões em estágios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis ao processo de criopreservação (Li et al., 1990; Leibo et al., 1996), embora as razões não estejam elucidadas.

Este aumento da criotolerância em estádios mais avançados pode estar relacionado ao maior número de células com menor volume, aumentando a permeabilidade do crioprotetor, que por sua vez apresentaria um efeito mais homogêneo sobre as células do embrião (Garcia-Garcia et al., 2006).

PERSPECTIVAS

A criopreservação de embriões de caprinos tornou-se economicamente viável, sendo aplicada para conservação e comercialização de recursos genéticos da espécie. As comparações diretas entre os métodos de criopreservação demonstram que a vitrificação tem apresentado resultados superiores (Guignot et al., 2006; Al Yacoub et al., 2010; Martemucci e D’Alessandro, 2013). Os principais avanços na criopreservação de embriões caprinos advêm da adaptação de protocolos de outras espécies (Tsunoda et

al., 1987; Rao et al., 1988; Li et al., 1990; Begin et al., 2003; Hong et al., 2007). Além disso, as avaliações dos embriões criopreservados permanecem essencialmente restritas a sobrevivência pós-descongelamento/ aquecimento, contagem do número de células e o desenvolvimento após o cultivo *in vitro* (El-Gayar, 2001; Holtz, 2005; Guignot et al., 2011), nem sempre apresentam correlação positiva com o desenvolvimento *in vivo* (Le Gal et al., 1993; Traldi et al., 1999). Estas metodologias utilizadas para avaliar a qualidade dos embriões criopreservados contribuem pouco para determinação dos fatores que causam resultados conflitantes, como na criopreservação de mórulas (Le Gal et al., 1993; Holtz, 2005) e nas comparações entre eficiência de criopreservação considerando o estágio de desenvolvimento do embrião e os protocolos de criopreservação (Fieni et al., 1995; Al Yacoub et al., 2010). Por isso, as exigências ou particularidades espécie-específicas para a criotolerância permanecem essencialmente desconhecidas em caprinos.

Avaliações mais informativas como avaliação da expressão gênica ou proteômica em embriões, fetos e placentas (Boonkusol et al., 2006; Dahli et al., 2007; Saenz-de-Juan et al., 2014), análises epigenéticas (Bakhtari et al., 2014), e avaliações funcionais mais sofisticadas (Martino et al., 2013) apresentam maior potencial para elucidar os fatores que reduzem a criotolerância e melhor prever a viabilidade dos embriões criopreservados. O aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação nestes contextos contribuirá para tornar biotecnologias como a bipartição de embriões, análises por biópsia, produção de animais transgênicos e a clonagem por transferência nuclear mais atrativas nos âmbitos científico e comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H., YAMASHITA, S., ITOH, T., SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and –fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. **Mol. Reprod. Dev.** v.53, p.325–335, 1999.

ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T., HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture system using serum-free or serumcontaining media. **Mol. Reprod. Dev.** v.61, p.57–66, 2002.

AL YACOUB, A.N., GAULY, M., HOLTZ, W. Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. **Theriogenology**, v.73, p.1018–1023, 2010.

ALI, J., SHELTON, J. N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.99, p.471-477, 1993.

ANDRABI, S.M.H., MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Anim. Reprod. Sci.** v.99, p.223–243, 2007.

ARAÚJO-LEMOS, P.F.B., FREITAS NETO, L.M., MELO, J.V., MOURA, M.T., LIMA, P.F, OLIVEIRA, M.A.L. Comparison of different cryoprotectant regimes for vitrification of ovine embryos produced *in vivo*. **Small Ruminant Research**. v.119, p.100-106, 2014.

ARAÚJO-LEMOS, P.F.B, FREITAS NETO, L.M., MOURA, M.T., MELO, J.V., LIMA, P.F, OLIVEIRA, M.A.L. Comparison of vitrification and conventional freezing for cryopreservation of caprine embryos. **Zygote**. p.1–9, 2015.

BAKHтари, A., RAHMANI, H., BONAKDAR, E., JAFARPOUR, F., ASGARI, V., HOSSEINI, S., HAJIAN, M., EDRISS, M., NASR-ESFAHAN, M. The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst. **Cryobiology**. v.69, p.419–427, 2014.

BEGIN, I., BHATIA, B., BALDASSARE, H., DINNYES, A., KEEFER, C.L. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2-to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology** v.59, p.1839-1850, 2003.

BETTERIDGE, K.J. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. **Theriogenology**. v.65, p.905–913, 2006.

BEZERRA, F.S., CASTELO, T.S., ALVES, H.M., OLIVEIRA, I.R., LIMA, G.L., PEIXOTO, G.C., BEZERRA, A.C., SILVA, A.R. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. **Cryobiology**. v.63, p.263-266, 2011.

BILTON, R.J., MOORE, N.W. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. **Aust J Biol Sci.** v.29, p.125-9, 1976.

BLOCK, J., BONILLA, L., HANSEN, P.J. 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.7, p.1063–1071, 2009.

BOONKUSOL, D., GAL, A.B., BODO, S., GORHONY, B., KITTYANANT, Y., DINNYES, A. Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Mol Reprod Dev.** v.73, p.700-708, 2006.

CHEMINEAU, P., PROCUREUR, R., COGNIÉ, Y., LEFÈVRE, P.C., LOCATELLI, A., CHUPIN, D. Production, freezing, and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. **Theriogenology.** v.26, p.279-290, 1986.

CHJAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAS, T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. **J. Reprod. Dev.** v.6, p.685-696, 2004.

COGNIÉ, Y., BARIL, G., POULIN, N., MERMILLOD, P. Current status of embryos technologies in sheep and goat. **Theriogenology.** v.59, p.171-188, 2003.

DATTENA, M., MARA, L., BIN, T.A.A., CAPPAL, P. Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. **Mol. Reprod. Dev.** v.1, p.42–47, 2007.

DHALI, A., ANCHAMPARUTHY, V.M., BUTLER, S.P., PEARSON, R.E., MULLARKY, I.K., GWAZDAUSKAS, F.C. **Theriogenology.** v.68, p.1292-1298, 2007.

DIEZ, C., LE BOURHIS, Y., HEYMAN, Y., RENARD, J.P. Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. **Theriogenology.** v.45, p.166, 1996.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**. v.57, p.285-302, 2002.

EL-GAYAR M., HOLTZ W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. **J Anim Sci**. v.79, p.2436-2438, 2001.

FIÉNI F., BECKERS, J.P., BUGGIN, M., BRUYAS, J.F., PERRIN, J., DAUBIÉ, M., TAINURIER, D. Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos. **Reprod. Nutr. Dev**. v.35, p.367-373, 1995.

FOUNTAIN, D.M., RALSTON, M., HIGGINS, N., GORLIN, J.B., UHL L., WHEELER C., ANTIN J.H., CHURCHILL W.H., BENJAMIN R.J. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. **Transfusion**. v.37, p.585-591, 1997.

GAMA, L.T., BRESSANA, M.C. Biotechnology applications for the sustainable management of goat genetic resources. **Small Ruminant Research**. v.98, p.133–146, 2011.

GARCIA-GARCIA, R.M., GONZALEZ-BULNES, A., DOMINGUEZ, V., VEIGALOPEZ, A., COCERO, M.J. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. **Cryobiology**. v.52, p.108-113, 2006.

GIBBONS, A., CUETO, M.I., BONNET, F.P. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. **Small Ruminant Research**. v.95, p.61–64, 2011.

GUIGNOT, F., BOUTTIER, A., BARIL, G., SALVETTI, P., PIGNON, P., BECKERS, J.F., TOUZÉ, J.L., COGNIÉ, J., TRALDI, A.S., COGNIÉ, Y., MERMILLOD, P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. **Theriogenology**. v.66, p.1004-1011, 2006.

GUIGNOT, F., PERREAU, C., CAVARROC, C., TOUZÉ, J.L., POUGNARD, J.L., DUPONT, F., BECKERS, J.F., RÉMY, B., BABILLIOT, J.M., BED'HOM, B., LAMORINIÈRE, J.M., MERMILLOD, P., BARIL, G. Sex and PRNP Genotype Determination in Preimplantation Caprine Embryos. **Reprod Dom Anim**. v.46, p.656–663, 2011.

HOLTZ, W. Recent developments in assisted reproduction in goats. **Small Ruminant Research**. v.60, p.95-110, 2005.

HONG, Q.H., TIAN, S.J., ZHU, S.E., FENG, J.Z., YAN, C.L., ZHAO, X.M., LIU, G.S., ZHENG, S.M. Vitrification of Boer Goat Morulae and Early Blastocysts by Straw and Open-Pulled Straw Method. **Reprod Dom Anim** v.42, p.34–38, 2007.

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

KULESHOVA, L.L., MACFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O., SHAW, J.M. Sugars exert a major influence on vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology** v.38, p.119-130, 1999.

LE GALL, F., BARIL, G., VALLET, J.C., LEBOEUF, B. *In vivo* and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. **Theriogenology**. v.40, p.771-777, 1993.

LEIBO, S.P., POLLARD, J.W., MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of reassembled *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**. v.43, p.265, 1995.

LEIBO, S.P., MARTINO, A., KOBAYASHI, S., POLLARD, J.W. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Anim. Reprod. Sci.** v.42, p.45-53, 1996.

LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**. v.69, p.37–47, 2008.

LEONI, G.G., SUCCU, S., SATTÀ, V., PAOLO, M., BOGLIOLO, L., BEBBERE, D., SPEZZIGU, A., MADEDDU, M., BERLINGUER, F., LEDDA, S., NAITANA, S. *In vitro* production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. **Reprod Fertil Dev**. v.21, p.901-908, 2009.

LI, R., CAMERON, W.N., BATT, P.A., TROUNSON, A.O. Maximal survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. **Reprod. Fertil. Dev.** v.2, p.345-350, 1990.

LOUTRADI, K.E., KOLIBIANAKIS, E.M., VENETIS, C.A., PAPANIKOLAOU, E.G., PADOS, G., BONTIS, I., TARLATZIS, B.C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertil Steril**. v.90, p.186-193, 2008.

MARA L., SARA CASU, CARTA A., DATTEA M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. **Animal Reproduction Science**. v.138, p.25–38, 2013.

MARTEMUCCI, G., D'ALESSANDRO, A.G. Efficiency of FSH/LH treatments for *in vivo* production of embryos and their cryopreservation by different methods in goats. **Small Ruminant Research**. v.114, p.264–271, 2013.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod**. v.54, p.1059–1069, 1996.

MARTINO, N.A., DELL'AQUILA, M.E., CARDONE, R.A., SOMOSKOI, B., LACALANDRA, G.M., CSEH, S. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. **Reprod Biol Endocrinol**. v.11, p.27, 2013.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Anim**. v.36, p.49-55, 2001.

MORATÓ, R., ROMAGUERA, R., IZQUIERDO, D., PARAMIO, M.T., MOGAS, T.F. Vitrification of *in vitro* produced goat blastocysts: Effects of oocyte donor age and development stage. **Cryobiology**. v.63, p.240–244, 2011.

NOWSHARI, M.A., HOLTZ, W. Transfer of Split Goat Embryos Without Zonae Pellucidae Either Fresh or After Freezing. **Journal Animal Science**. v.71, p.3403-3408, 1993.

NOWSHARI, M.A., HOLTZ, W. *In vitro* culture of goat morulae to blastocysts before freezing. **Theriogenology**. v.44, p.983-988, 1995.

PARAMIO, M., IZQUIERDO, D. Assisted reproduction technologies in goats. **Small Ruminant Research**. v.121, p.21–26, 2014.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666-666, 1949.

PULS-KLEINGELD, M., NOWSHARI, M.A., HOLTZ, W. Cryopreservation of goat embryos by the one- step or three-step equilibration procedure. In: Lokeshwar RR (ed), **Recent Advances in Goat Production**. New-Delhi: Nutan Printers, 1992. pp.1388-1391.

RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

RAO, V.H., SARMAH, B.C., AGRAWAL, K.P., ANSARI, M.R., BHATTACHARYYA, N.K. Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. **Animal Reproduction Science**, v.16, p.261-264, 1988.

RODRÍGUEZ-DORTA, N., COGNIÉ, Y., GONZÁLEZ, F., POULIN, N., GUIGNOT, F., TOUZÉ, J.L., BARIL, G., CABRERA, F., ALAMO, D., BATISTA, M., GRACIA, A., MERMILLOD, P. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. **Theriogenology**. v.68, p.908-913, 2007.

SAENZ-DE-JUANO, M.D., MARCO-JIMENEZ, F., SCHMALTZ-PANNEAU, B., JIMENEZ-TRIGOS, E., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., PEÑARANDA, D.S., JOUNEAU, L., LECARDONNEL, J., LAVARA, R., NATURIL-ALFONSO, C., DURANTHON, V., VICENTE, J.S. Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. **Reproduction**, v.147, p.789-801, 2014.

SEIDEL, G.E. Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology** v.65, p.228–235, 2006.

SOUZA-FABJAN, J.M.G., PANNEAU, B., DUFFARD, N., LOCATELLI, Y., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F., MERMILLOD, P. *In vitro* production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. **Theriogenology**. v.81, p.1149–1162, 2014.

TIBARY, A., ANOUASSI, A., KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. **Theriogenology**. v.64, p.618–638, 2005.

TRALDI, A.S., LEBOEUF, B., COGNIÈ, Y., POULIN, N., MERMILLOD, P. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. **Theriogenology**. p.175, 1999.

TSUNODA, Y., TOKUNAGA, T., OKUBO, Y., SUGIE, T. Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. **Theriogenology**, v.28, p.317-322, 1987.

VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., 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**. v.1, p.53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci**. v.60-61, p.357-364, 2000.

VAJTA,G.,KUWAYAMA,M.Improvingcryopreservationsystems.**Theriogenology**. v.65, p.236-244, 2006.

WHITTINGHAM, D.G., ALIBI, S.P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. **Science**. v.178, p.411-414, 1972.

YAVIN, S., ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**. v.67, p.81-89, 2007.

YUSWIATI, E., HOLTZ, W. Successful transfer of vitrified goat embryos. **Theriogenology**. v.34, p.629-632, 1990.

WILMUT, I.The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Sci II**. v.11, p.1071-1079, 1972a.

WILMUT, I.The low temperature preservation of mammalian embryos. **J Reprod Fertil**. v.31, p.513-514, 1972b.

WILMUT, I., ROWSON, L.E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Vet Rec**. v.92, p.686-690, 1973.