

TUANNY CREUSA MEDEIROS DAMASCENO

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE OÓCITOS OVINOS APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO ALTERNATIVO CONTENDO ACP-408®**

TERESINA, PI

2019

TUANNY CREUSA MEDEIROS DAMASCENO

**ANÁLISE DA VIABILIDADE DE OÓCITOS OVINOS APÓS
CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO ALTERNATIVO CONTENDO ACP-408®**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

TERESINA, PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

D155a Damasceno, Tuanny Creusa Medeiros

Análise da viabilidade de oócitos ovinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP-408®. / Tuanny Creusa Medeiros - 2019.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

1. Ovinos 2. Oócitos 3. Criopreservação 4. Água de coco em pó
I. Título

CDD 636.3

ANÁLISE DA VIABILIDADE DE OÓCITOS OVINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO
EM MEIO ALTERNATIVO CONTENDO ACP-408[®]

TUANNY CREUSA MEDEIROS DAMASCENO

Dissertação Aprovada em: 30/05/2017

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Pesquisadora. Dra. Tânia Maria Leal (Externa) / EMBRAPA



Prof. Dr. Francisco Solano Feitosa Junior (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Rômulo José Vieira (Interno) / DCCV/CCA/UFPI

*A toda minha família, especialmente meus pais **Tania Maria dos Reis Medeiros e Carlos Alberto Damasceno** pelo companheirismo e confiança que sempre depositam em mim.*

(Dedico e ofereço)

AGRADECIMENTOS

À DEUS, único digno de toda honra e louvor;

Aos meus pais, Tania Maria dos Reis Medeiros e Carlos Alberto Damasceno, por sempre estarem me apoiando em todas as decisões que tomo e pelas orações e amor demonstrado;

Ao orientador Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, por estar sempre chamando atenção para o correto, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pela orientação e pelos conselhos dados, sendo para mim uma pessoa de grande admiração;

Aos colaboradores e amigos Alberto Pereira Neto, Kenney de Paiva Porfirio e Marlene Sipaúba de Oliveira que estavam sempre dispostos a viajar para as atividades de campo e para ajudar com as análises laboratoriais;

Aos professores e funcionários da Pós-graduação em Ciência Animal da UFPI;

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), especialmente ao Prof. Dr. José Adalmir Torres de Sousa e toda sua equipe.

Aos proprietários e funcionários de abatedouros, por permitirem a nossa entrada e nos receberam da melhor forma possível, nos deixando à vontade para a realização das colheitas;

A amizade de Tyssia de Souza Alves, Leopoldo Marçal e Rebeca Tavares pelo incentivo e horas de descontração;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido;

À todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a conclusão desta pesquisa com sugestões e críticas o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Pág
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Morfofisiologia do complexo <i>cúmulus</i> oócito (CCO)	15
2.2 Métodos de obtenção e classificação de oócitos.....	16
2.3 CRIOPRESERVAÇÕES DE OÓCITOS.....	18
2.3.1 Princípios gerais da criopreservação	18
2.3.2 Criopreservação lenta.....	19
2.3.3 Vitrificação (Criopreservação ultrarrápida)	20
2.4 Crioprotetores	21
2.4.1 Crioprotetores penetrantes (intracelulares)	21
2.4.2 Crioprotetores não penetrantes (extracelulares).....	23
2.5 Análise de viabilidade oocitária.....	24
CAPÍTULO 1 - ANÁLISE DA VIABILIDADE DE OÓCITOS OVINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO ALTERNATIVO CONTENDO ACP-408® ..	25
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	2
ANÁLISE ESTATÍSTICA	4
RESULTADOS	4
DISCUSSÃO	5
CONCLUSÃO.....	9
REFERÊNCIAS	9
CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO A- Parecer da Comissão de Ética e Experimentação Animal	35
ANEXO B- Ficha para avaliação da viabilidade de oócitos	36

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Classificação morfológica de qualidade de oócitos.....	18
Figura 2. Fotografia de oócitos de ovelhas corados para análise (100X) de viabilidade após criopreservação através da associação de sondas fluorescentes de IP+ FDA pela técnica de fluorescência: A: oócito não viável (seta) apresentando coloração vermelho claro; B: oócito viável (seta) apresentando coloração verde claro.....	5

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Classificação de oócitos ovinos obtidos por aspiração folicular por agulha 21 G acoplada a seringa de 5mL em ovários oriundos de abatedouros de Teresina-PI.....	4
Tabela 2. Análise da viabilidade de membrana plasmática de oócitos utilizando a associação de sondas fluorescente Iodeto de Propídeo e Diacetato de Carboxifluoresceína.....	5

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ACP®	Água de Coco em Pó
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCOs	Complexos <i>Cumulus</i> Oócitos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMSO	Dimetilsufóxido
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i>
EG	Etilenoglicol
FDA	Diacetato de Fluoresceína
GJCs	Junções GAP comunicantes
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IP	Iodeto de Propídeo
LH	Hormônio Luteinizante
LOPU	Aspiração Folicular por Laparoscopia
M	Molar
MG	Minas Gerais
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
Pág	Página
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PM	Peso Molecular
SRD	Sem Raça Definida
UFPI	Universidade Federal do Piauí
ZP	Zona pelúcia

RESUMO

DAMASCENO, Tuanny Creusa Medeiros. **Análise da viabilidade de oócitos ovinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP-408[®]**. 2017. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

Objetivou-se analisar a viabilidade de oócitos ovinos submetidos a criopreservação lenta em meio alternativo contendo ACP-408[®] após descongelação. Foram coletados 188 ovários de 94 ovelhas púberes de abatedouros da microrregião de Teresina-PI. Os ovários foram transportados ao laboratório em garrafa térmica contendo solução fisiológica a 37°C e 30 µg/mL de sulfato de gentamicina. Posteriormente, os folículos foram puncionados para obtenção dos Complexos *Cumulus* Oócitos (CCOs), com agulha de calibre 21G acoplada a seringa de 5mL. Logo, o aspirado foi depositado em tubos tipo *falcon* de 15 mL, por um período de 15 minutos para que houvesse decantação dos CCOs. O sedimento foi aspirado através de pipeta e colocadas em placas de Petri, onde foram avaliados e classificados por meio de um estereomicroscópio. Após a classificação, os CCOs foram separados em três grupos: Grupo I (Glicerol/Controle), Grupo II (Etilenoglicol), Grupo III (Etilenoglicol + ACP-408[®]) e envasados em palhetas de 0,25 mL. Seguidamente foram submetidos a criopreservação lenta, em curva de criopreservação específica para embriões em aparelho TK-3000[®]. Os oócitos foram descongelados e avaliados através das sondas de iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína. Foram recuperados 190 COCs com taxa de recuperação de 2,02 COCs por par de ovários. Na análise de viabilidade com sondas fluorescentes, o grupo contendo etilenoglicol e ACP-408[®] obteve resultado de 18,51%, enquanto os grupos contendo etilenoglicol e glicerol obtiveram taxas de viabilidade de 12,5% e 9,09%, respectivamente. Portanto, o grupo contendo ACP-408[®] e etilenoglicol demonstrou uma taxa de viabilidade de oócitos ovinos semelhantes aos crioprotetores padrões comerciais, pós descongelação.

Palavras-chave: Oócitos; Ovinos; Água de coco em pó.

ABSTRACT

DAMASCENO, Tuanny Creusa Medeiros. **Analysis of the viability of oocytes sheep after cryopreservation in alternative environment containing ACP-408[®]**. 2017. 48f. Dissertation (MSc. in Animal Science), Federal University of Piauí, Teresina, 2017.

The objective of this study was to analyze the viability of ovine oocytes submitted to slow cryopreservation in an alternative medium containing ACP-408[®] after thawing. 188 ovaries were collected from 94 pubescent sheep from the Teresina-PI micro-region. The ovaries were transported to the laboratory in a thermos flask containing physiological solution at 37°C and 30µg / mL of gentamicin sulfate. Afterwards, the follicles were punctured to obtain the Cumulus Oocyte Complexes (CCOs), with a 21G gauge needle attached to a 5mL syringe. The aspirate was then placed in 15 mL Falcon tubes for a period of 15 minutes for of the CCOs. The sediment was aspirated through a pipette and placed in Petri dishes, where they were evaluated and classified by means of a stereomicroscope. After classification, the CCOs were separated into three groups: Group I (Glycerol / Control), Group II (Ethylene Glycol), Group III (Ethylene Glycol + ACP-408[®]) and packed in 0.25 mL vats. Then they were submitted to slow cryopreservation, in a cryopreservation curve specific for embryos in TK-3000[®] apparatus. The oocytes were thawed and evaluated through propidium iodide probes and carboxyurelscein diacetate. A total of 190 COCs were recovered with a recovery rate of 2.02 COCs per ovarian pair. In the feasibility analysis with fluorescent probes, the group containing ethylene glycol and ACP-408[®] obtained a result of 18.51%, while the groups containing ethylene glycol and glycerol obtained viability rates of 12.5% and 9.09%, respectively. Therefore, the group containing ACP-408[®] and ethylene glycol demonstrated a sheep oocyte viability rate similar to standard commercial cryoprotectants after thawing.

Keywords: Oocytes; Sheep; Coconut water powder.

1. INTRODUÇÃO

O registro do rebanho nacional de ovinos no Brasil é de 18 milhões de animais no país, dos quais 11,6 milhões estão no Nordeste (IBGE, 2016). Nesse contexto, a ovinocultura, no Brasil, tem se intensificado nos últimos anos, destacando-se entre os variados ramos do agronegócio, principalmente por suas características de ciclo produtivo curto o que resulta no giro financeiro rápido, alta lucratividade e boa adaptabilidade animal, além da viabilização de pequenas propriedades, o que faz da ovinocultura uma das atividades pecuárias com retorno econômico garantido (ROCHA, 2014).

Entretanto na região Nordeste o sistema adotado pelos produtores ainda é na maioria das vezes, o de criação extensivo e alguns semi-intensivos, com técnicas rudimentares de produção e reprodução, resultando em baixo valor genético dos animais produzidos. Diante disso, é necessário assumir estratégias reprodutivas práticas e lucrativas, objetivando aumentar os índices produtivos acompanhado com o progresso genético (CROCOMO et al., 2012).

Nesse cenário, as biotecnologias reprodutivas são ferramentas tecnológicas capazes de promover resultados amplos em programas de melhoramento genético de rebanhos ovinos (PARAMIO; IZQUIERDO, 2016) e para isso, estudos têm sido realizados visando facilitar o uso do gameta feminino e, atualmente, a técnica mais promissora é a criopreservação de oócitos, desejável por razões biológicas e comerciais, que consiste no armazenamento e na preservação de materiais biológicos sob baixas temperaturas como em nitrogênio líquido, que é utilizada (-196°C), permitindo que as células vivas reduzam drasticamente seu metabolismo (FAUSTINO et al., 2011).

A disponibilidade de oócitos viáveis após a criopreservação permitiria maior flexibilidade em experimentos que exigem o uso simultâneo de grande número de gametas, aumentando a viabilidade de materiais para pesquisa básica, além de permitir o estabelecimento de um banco de oócitos (FAGUNDES et al., 2004), propiciando a conservação de material genético para banco germoplasma com a função de preservar os recursos genéticos de espécies em risco de extinção e possibilitar o transporte de material genético a vários países, diminuindo a ocorrência de riscos sanitários (PRADIEÉ, 2013).

Segundo Freitas et al. (2013) durante o processo de criopreservação é necessário diminuir ao máximo a transformação da água intracelular das células em cristais de gelo quando realizado o processo de resfriamento, pois à medida em que a temperatura

decrece, o tamanho dos cristais de gelo aumenta o que representa um risco à integridade das membranas e organelas. Em razão disso a adição de um agente crioprotetor representa um fator chave para o sucesso da criobiologia, sendo indispensável sua presença para que as células possam resistir às injúrias resultantes do procedimento de criopreservação. E devido as dificuldades de se reduzir ou evitar injúrias celulares provocadas ao longo do processo de criopreservação, faz-se necessária a realização de novos estudos a fim de se buscar alternativas de soluções viáveis para criopreservação de oócitos, bem como de outros tipos celulares e/ou tecidos. No presente estudo, o meio crioprotetor utilizado, será adicionado ao ACP-408[®] (água de coco de forma liofilizada).

Recentes estudos realizados com a água de coco aplicadas a reprodução animal revelam que a mesma pode ser utilizada com sucesso na preservação de diversos tipos celulares (CESAR et al., 2015). Uma das principais propriedades da água de coco é atribuída à atividade antioxidante, por seu conteúdo de ácido ascórbico e glutatona (SILVA et al., 2010). Nesse sentido, a realização desse estudo foi de contribuir para a área de criobiologia e a utilização do ACP-408[®] poderia incentivar pesquisas para tal finalidade, referente reprodução animal e auxiliar na implementação de um protocolo viável de congelação lenta, além de viabilizar a implantação de bancos de germoplasma animal.

Essa dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: uma introdução contendo o objetivo; Revisão de literatura; Capítulo I, contendo o artigo intitulado: Análise da viabilidade de oócitos ovinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP-408[®]; além de; Considerações finais; Referências e Anexos. O capítulo foi organizado na forma de artigo científico de acordo com as normas do periódico internacional “Small Ruminant Research” (QUALIS 2014: 0921-4488, SMALL RUMINANT RESEARCH, ZOOTECNIA/RECURSOS PESQUEIROS, CLASSIFICAÇÃO: A2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfofisiologia do complexo *cúmulus* oócito (CCO)

O oócito é o gameta feminino, constituído pelo ooplasma, pela zona pelúcida, membrana plasmática, e núcleo, apenas visível no oócito imaturo. As diversas organelas que o constituem apresentam uma distribuição celular diferente de acordo com a fase em que se encontra o oócito. Esta célula contém forma esférica e devido a isso, tem uma elevada razão de área/volume de superfície, sendo cercada por uma zona pelúcida, por um conjunto de células denominada corona radiata e várias camadas de células granulosa que formam os complexos *cumulus* oócitos (SILVA, 2015). É considerado a maior célula existente nos mamíferos (MOUSSA et al., 2014).

As interações que ocorrem entre as células do *cumulus* (CC) e oócito desses complexos citado, acontecem ininterruptamente e desempenham um papel importante na aquisição de competência do oócito. A comunicação mantida entre o oócito e CC por meio de uma extensa rede de junções *gap* comunicantes, permite a passagem de duas vias de transferência de moléculas pequenas e são essenciais para o seu crescimento e posterior fertilização (PRATES et al., 2013). Isto é extremamente importante para a obtenção de alta qualidade dos oócitos, capaz de suportar a maturação (LOURENÇO, 2012).

Souza-Fabjan et al. (2016), relata que foi previamente demonstrado em ratos, bovinos, e os porcos que a remoção de CC no começo da maturação *in vitro* (MIV) é prejudicial para a fecundação e desenvolvimento embrionário. No entanto, dependendo da finalidade biotecnológica, a remoção de CC pode ser necessária.

Bioquimicamente a estrutura da zona pelúcida da maioria de oócitos e mamíferos é bastante simples, composta por três glicoproteínas, ZP1, ZP2, ZP3, as quais se combinam para formar uma camada em torno do oócito em crescimento. A proteína ZP3 é responsável pela ligação espécie-específica entre o espermatozoide e a zona pelúcida e estimula também a absorção de cálcio, induzindo o espermatozoide a sofrer a reação acrossômica (liberação das enzimas hidrolíticas do acrossomo que auxiliam o espermatozoide a atravessar a zona). A reação acrossômica ativa diversas proteínas que se ligam ao ZP2, mantendo o espermatozoide fortemente ligado a zona. A ligação entre as membranas causa uma despolarização imediata da membrana do oócito em decorrência da abertura dos canais de íons, ocasionando um rápido bloqueio da poliespermia. Além disso, o aumento de cálcio citosólico gera um segundo bloqueio espermático de longa

duração, chamada de reação cortical, que é uma mudança nas propriedades da zona pelúcida que a torna impermeável a outros (KOHAYA et al., 2011).

A fusão do oócito com o espermatozoide ocorre após a penetração, especificamente pelo contato entre o segmento equatorial do gameta masculino e a membrana plasmática do gameta feminino. O oócito ativado pela presença do espermatozoide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, com o aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e síntese proteica (COX et al., 1993).

Em seguida, para impedir a penetração de mais de um gameta (polispermia), observa-se despolarização da membrana vitelina após a fecundação, fenômeno denominado de bloqueio vitelínico. O segundo bloqueio resulta da reação cortical, após a penetração espermática. Essa fusão envolve toda a superfície do oócito, a partir do ponto da fusão espermatozoide/oócito. O conteúdo dos grânulos corticais possui enzimas que irão, provocar hidrólise parcial das proteínas da zona pelúcida, sendo transformadas em ZP1F, ZP2F e ZP3F). O espaço perivitelínico, região entre a zona pelúcida e a membrana plasmática da célula, apresenta microvilosidades em toda a sua extensão (responsáveis pelo aumento da área de contato para facilitar a obtenção dos nutrientes que vêm do meio externo (PORTO, 2015).

2.2 Métodos de obtenção e classificação de oócitos

Várias técnicas para obtenção de CCOs podem ser utilizadas, e estas influenciam na quantidade e na morfologia dos CCOs recuperados e, conseqüentemente, na competência no desenvolvimento oocitário (FERRAZ et al. 2016). Em ovários oriundos de abatedouro, os COCs podem ser obtidos por meio da técnica do fatiamento dos ovários (*slicing*) ou do método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou bomba a vácuo (BERNARDI, 2005).

De acordo com Wani, (2000), a técnica de *slicing* ovariano, possibilita o acesso a folículos localizados profundamente dentro do córtex do ovário, resultando na recuperação de maior quantidade de COCs do que o método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa, no qual ainda há maior possibilidade de perda de COCs. Entretanto, esse método possui a desvantagem de ser uma técnica demorada além de gerar muitos debris, os quais dificultam a posterior identificação dos COCs, somado a isso há a necessidade de maior treinamento do indivíduo que a efetua (WANI, 2002).

Outra técnica utilizada é de aspiração folicular, sendo esta considerada mais simples, rápida e permite a obtenção de COCs de melhor qualidade, caracterizada pela presença de generosa quantidade de células do *cumulus*. A quantidade e a qualidade dos COCs recuperados por meio da aspiração folicular dependem, entretanto, dos aspectos físicos envolvidos em tal técnica, podendo haver discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos (RODRIGUEZ et al, 2015).

No que diz respeito ao processo *in vivo*, os COCs são recuperados por meio da aspiração folicular com bomba a vácuo, podendo ser realizada por laparoscopia ou laparotomia. Esta última de uso questionável por ser uma técnica cirúrgica invasiva que predispõe a aderências ovarianas, dificulta colheitas repetidas e pode levar as doadoras à infertilidade, o que resulta em uma técnica não satisfatória (ARAÚJO et al., 2015).

Atualmente preconiza-se a foliculocentese laparoscópica, ou seja, a recuperação de COCs por meio da aspiração folicular com agulha acoplada à bomba a vácuo guiada por laparoscópio, também conhecida como laparoscopia guiada por ultrassonografia (LOPU), foi relatada pela primeira vez em ovinos em 1974. Caracteriza-se por ser uma técnica minimamente invasiva, podendo ser realizada sucessivas vezes sem comprometer a fertilidade das fêmeas doadoras. Porém exige mão de obra qualificada e o uso de equipamentos de elevado custo. Este procedimento permite a produção de cordeiros a partir de fêmeas de alto valor genético, nas quais os procedimentos convencionais de produção e transferência de embriões não são aplicáveis, como é o caso de fêmeas pré-púberes, gestantes, e de fêmeas com infertilidade temporária ou irreversível (BALDASSARE, 2008).

A colheita oocitária também pode ser realizada por punção folicular guiada por ultrassonografia via vaginal, porém são necessárias melhorias nessa técnica, pois a quantidade de estruturas adquiridas com essa técnica, é mais baixa que o obtido por laparoscopia (GONÇALVES et al., 2008). Posteriormente a etapa de obtenção oocitária, faz-se necessário a classificação desses oócitos. Pois há grandes variações quanto aos padrões morfológicos de qualidade de oócito entre as espécies. A classificação dos COCs mais utilizada na área de pesquisa, é segundo o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010), em uma escala de 1 a 4 (Figura 1) considerando as características das células do cumulus (cobertura do oócito) e do citoplasma (ooplasma) do oócitos. Oócitos com qualidade 1, são aqueles com cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração

marrom. Já os oócitos de qualidade 2, são aqueles de cumulus compactos parcialmente presentes em volta do oócito ou rodeados por completo, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo. Já nos oócitos de qualidade 3, as células do cumulus estão presentes, porém expandidas, apresenta ooplasma contraído, degenerado ou fragmentado e os oócitos de qualidade 4, são aqueles com oócitos desnudos e ausência de células do *cumulus*.

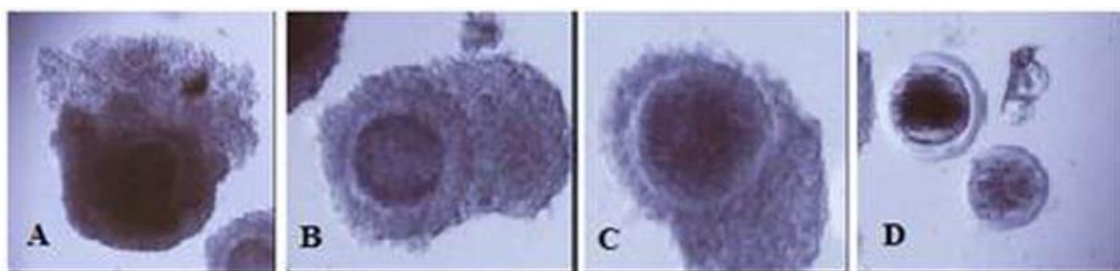


Figura 1 - Classificação de oócitos de acordo com, Stringfellow e Givens. A: Grau I, B: Grau II, C: Grau III, D: Grau IV. Fonte: Stringfellow e Givens, 2010.

No que se refere a qualidade do oócito recuperado, esta se dá por meio de muitas características, mas principalmente pela presença ou ausência de células do *cumulus*. A função destas células no desenvolvimento completo da competência dos oócitos tem sido investigado (GOTTARDI et al., 2012). Nunes et al., (2010) relata que em pequenos ruminantes, os oócitos sem expansão das células do *cumulus*, citoplasma uniforme, levemente granuloso e coloração homogênea são geralmente selecionados para maturação.

2.3 CRIOPRESERVAÇÕES DE OÓCITOS

2.3.1 Princípios gerais da criopreservação

A criopreservação de oócitos é muito importante na preservação das espécies em risco de extinção e na preservação dos recursos genéticos em animais selvagens e domésticos, constituindo uma ferramenta importante no desenvolvimento de técnicas eficientes de reprodução assistida (CARRILHO, 2013).

Atualmente a criopreservação dos oócitos pode ser realizada por dois métodos: a congelamento lento e a vitrificação. Na criopreservação lenta, são utilizadas baixas taxas de resfriamento e baixas concentrações de crioprotetores (SARAGUSTY; ARAV, 2011) e a capacidade de um material biológico sobreviver ao processo de criopreservação está diretamente ligada à sua resistência às etapas do procedimento de congelamento lento utilizado. Esse processo é constituído por cinco etapas fundamentais: 1) exposição ao

agente crioprotetor; 2) resfriamento e redução gradual da temperatura; 3) estocagem em nitrogênio (N₂) líquido a -196° C; 4) descongelação ou aquecimento e 5) remoção do agente crioprotetor. O outro processo de criopreservação, a vitrificação, é a solidificação de uma solução, a uma temperatura muito baixa, utilizando concentrações muito elevadas de crioprotetores impedindo a formação de cristais de gelo, através do aumento da viscosidade conseguida por velocidades de arrefecimento muito elevadas (MUKAIDA; OKA, 2012). Essa ausência de cristais de gelo é resultado da passagem do fluido para um estado sólido não estruturado semelhante a um vidro, fenómeno que dá nome à técnica (SILVA, 2015).

A criopreservação envolve o controle de muitas variáveis como o tipo de crioprotetor utilizado, o método empregado para a sua adição e remoção, as taxas de arrefecimento e aquecimento, a fase de desenvolvimento dos oócitos, a presença ou ausência de células de cumulus entre outros. E o desenvolvimento de métodos bem sucedidos para a criopreservação de oócitos requer a compreensão dos efeitos de cada variável e a interação entre eles (DÍEZ et al., 2005, 2012).

A criopreservação de oócitos imaturos aponta grandes vantagens quanto, a pós criopreservação e descongelação, pois estes podem sobreviver e serem posteriormente maturados (MOAWAD et al., 2012). Na espécie caprina por exemplo, os oócitos imaturos obtiveram uma taxa significamente maior de sobrevivência e morfologias normais após o processo de criopreservação por vitrificação, indicando melhor resistência a crioinjúria (SANTOS et al., 2006).

Entretanto, a criopreservação de oócitos da maioria das espécies de mamíferos tem sido desafiadora devido à sua extrema sensibilidade a baixas temperaturas durante o processo de criopreservação. Além disso é uma tecnologia em desenvolvimento que necessita ainda, de muitos estudos para a evolução e a adaptação de diferentes protocolos de criopreservação de gametas de acordo com as características de cada espécie (CIANI et al., 2012).

2.3.2 Criopreservação lenta

Em 1949, alguns pesquisadores como Christopher Polge, descobriram por engano a propriedade crioprotetora de glicerol e assim abriu o campo de congelação lenta. Esta técnica possui a vantagem da utilização de baixas concentrações de crioprotetores, os quais são associados com toxicidade química e choque osmótico e proporciona resultados

aceitáveis para oócito de espécies que não são sensíveis ao frio, por exemplo: rato, gato, coelho e humano, enquanto que os maus resultados foram relatados em outras espécies e, em especial, aqueles são sensíveis ao resfriamento, por exemplo: suínos, bovinos (ARAV, 2014).

Santos et al. (2006), descreveram que o método de congelação mais utilizado para gametas femininos é o lento, onde as células são expostas a baixas concentrações de crioprotetor, por um período que varia de 20 a 60 minutos, acondicionadas em congelador programável estabilizado a temperatura de -5°C , seguido de cristalização manual com objeto metálico congelado em nitrogênio líquido e de resfriamento lento ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) até -32°C . As células ou tecidos criopreservados devem ser descongelados de forma rápida, a fim de reduzir a ação tóxica dos agentes criopreservantes (ALVES, 2010).

Entretanto, possui como desvantagem, o tempo de exposição do oócito para os crioprotetores. Em razão disso, a taxa de refrigeração ideal deverá ser lenta o suficiente para permitir a desidratação e para evitar a congelação intracelular, mas rápida o suficiente para evitar os efeitos de toxicidade dos crioprotetores. Vale ressaltar, que a sobrevivência de alguns tipos de células é reduzida, mesmo antes do início da congelação (AIDAR, 2015).

2.3.3 Vitriificação (Criopreservação ultrarrápida)

A Vitriificação é um método de criopreservação para se atingir uma rápida preservação do material sem a necessidade de aparelhos programáveis de congelação em que a velocidade de redução da temperatura é brusca (aproximadamente $-23000^{\circ}\text{C} / \text{min}$). Essa técnica induz a solidificação de uma solução de extrema viscosidade, que a baixas temperaturas, minimiza a formação de cristais de gelo. Este processo é obtido por uma combinação de concentrações elevadas de agentes crioprotetores, juntamente com taxas de resfriamento ultrarrápidas. Adicionalmente, a vitriificação combina vantagens como a facilidade de uso e melhor relação custo-benefício, o que garante uma maior flexibilidade para amostras que exigem criopreservação imediata (VAJTA et al., 1998; BHAT et al., 2005; GRIVEAU et al., 2015).

Existem muitos fatores que influenciam a eficiência da vitriificação, entre estes estão os crioprotetores, técnicas, volume da solução de criopreservação, tempo de procedimento e variáveis que dependentes do tipo celular (oócito ou embrião). Entretanto o problema do estresse osmótico resultante da exposição a elevadas concentrações de

crioprotetores pode levar a alterações dramáticas no volume celular durante o equilíbrio (PRENTICE-BIENSCH et al., 2012). Além disso, uma taxa de resfriamento ultrarrápida pode ser considerada como um dos requisitos para o sucesso da vitrificação (SEKI; MAZUR, 2012). Em razão disso, estratégias utilizadas na vitrificação, como a associação de crioprotetores, ótimo tempo de exposição e aumento na taxa de resfriamento, são comumente empregados objetivando reduzir a toxicidade e lesão osmótica induzida (ARAV, 2014).

2.4 Crioprotetores

O sucesso da criopreservação lenta depende de uma delicada e complexa interação entre importantes variáveis, que envolve tanto questões físicas, como o volume da solução de criopreservação e as taxas de resfriamento. Além disso, para reduzir ou evitar as injúrias induzidas pelas baixas temperaturas é essencial a adição de substâncias que proporcionem uma crioproteção celular durante a redução da temperatura. Essas substâncias, conhecidas como agentes crioprotetores são de suma importância para o sucesso da criopreservação, a adição de um agente crioprotetor representa um fator influente para o sucesso da criobiologia, sendo indispensável sua presença para que as células possam resistir às injúrias resultantes do procedimento de criopreservação que agem protegendo a célula durante o período de estocagem em baixas temperaturas, prevenindo a formação de gelo intracelular e possíveis danos causados pela desidratação (JARK et al., 2016).

Entretanto, os metabólitos resultantes da degradação dos crioprotetores pela célula podem ser tóxicos para as células, sendo este um fator limitante para o sucesso da utilização dos mesmos. Nesse contexto, dependendo do local de ação, os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes ou não penetrantes (DUAN et al., 2017).

2.4.1 Crioprotetores penetrantes (intracelulares)

Os crioprotetores penetrantes são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula, ou seja, atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula e ligam-se ao hidrogênio das moléculas de água intracelular, aumentando a viscosidade da solução de congelação, conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma, promovendo a estabilização para que não ocorra o rompimento no momento da congelação Além disso, os crioprotetores também agem

prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água. Dentre os crioprotetores penetrantes destacam-se, o etilenoglicol, glicerol, o dimetilsulfóxido e o propanodiol (AYE et al., 2010), com exceção do glicerol que possui baixa solubilidade em água, o DMSO, PROH e o ETG possuem alta solubilidade, penetrando rapidamente nas células, tornando-se, assim, os mais recomendados para criopreservar gametas (CHIAN et al., 2004; GOSDEN; NAGARO, 2002).

O etilenoglicol (1,2-etanodiol) com peso molecular 62,1, é um álcool que possui quatro pares de elétrons isolados, os quais podem ligar a mais elétrons isolados. Tem sido considerado o mais empregado para a conservação de folículos ovarianos pré-antrais isolados ou inclusos em tecido ovariano, oócitos e embriões, obtendo-se resultados satisfatórios e promissores. Isso devido, principalmente ao seu baixo peso molecular quando comparado a outros crioprotetores, o que promove rápida entrada e saída na célula durante o período de equilíbrio e reidratação, respectivamente, o que permite a reidratação direta após o aquecimento (VOELKEL; HU, 1992).

Outro crioprotetor bastante utilizado e aceitável é o glicerol, ou 1,2,3-propanotriol ($C_3H_8O_3$) ocorre naturalmente em formas combinadas, como com ácidos graxos nos triglicerídeos, em todos os óleos graxos animais e vegetais, sendo isolado quando estes óleos são saponificados com hidróxido de sódio ou potássio no processo de manufatura de sabões. O glicerol possui peso molecular 92,1 e é considerado o crioprotetor padrão na criopreservação de gametas masculinos (COSTA et al., 2002).

E em razão disso, vários pesquisadores realizaram experimentos para verificar a sua eficiência na criopreservação de células. Amorim et al. (2006) avaliando a eficiência do glicerol na preservação de folículos primordiais isolados ovinos, obtiveram taxas de sobrevivência altas. Rodrigues et al. (2004) utilizando glicerol na espécie ovina, e na congelação de tecido ovariano caprino, demonstraram que é possível preservar folículos pré-antrais inclusos no tecido, de folículos morfologicamente normais, mantendo também a normalidade das características ultraestruturas. E Gonçalves et al. (2014) afirmaram que a congelação em glicerol é o método mais difundido para a criopreservação de embriões bovinos.

2.4.2 Crioprotetores não penetrantes (extracelulares)

Com o objetivo de otimizar a eficácia das soluções de congelação, frequentemente são utilizadas substâncias que, apesar de não penetrarem na célula, auxiliam no processo de criopreservação. Nessa categoria destacam-se: sacarose, glicose e água de coco em pó que possuem ação crioprotetora comprovada, conferindo maior estabilidade à célula quando esta é exposta a baixas temperaturas (NUNES, 2010).

Estas substâncias possuem a capacidade de preservar a integridade estrutural e funcional da membrana celular devido à interação com proteínas e glicoproteínas de membrana. Dentre os crioprotetores extracelulares, a sacarose, carboidrato composto por uma frutose e uma glicose, é utilizada com bastante frequência nas soluções de criopreservação, pois além de sua capacidade crioprotetora, essa substância age como um tampão osmótico contra o estresse celular causado durante a adição e remoção do crioprotetor intracelular. A sacarose já foi utilizada com sucesso na crioproteção de oócitos caprinos (SHARMA et al., 2006) e humanos (COTICCHIO et al., 2004; KEROS et al., 2009) tecido ovariano de diferentes espécies caprino (SANTOS et al., 2006) ovino (CECCONI et al., 2004; ONIONS et al., 2008) bovinos (LUCCI et al., 2004).

No tocante às inovações biotecnológicas, buscando um meio alternativo, utilizou-se a Água de coco (*Cocus nucifera*) para a conservação a princípio, principalmente de células espermáticas. Caracterizada por ser uma solução natural e estéril, composta de sais, ligeiramente ácida, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, eletrólitos diversos, e indutores da divisão celular, fornecendo assim os nutrientes necessários para a conservação de gameta masculino e feminino (GONÇALVES et al., 2014).

E em razão dos excelentes resultados obtidos com estudos utilizando a água de coco in natura, um grupo de pesquisadores elaborou um meio de conservação à base de água de coco sob a forma de pó (ACP® - ACP Biotecnologia, Brasil). Este produto manteve os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe. A utilização da água de coco em pó, implica em inúmeras vantagens, pois esta, confere estabilidade e longevidade de prateleira, não apresenta problemas de acondicionamento, supera toda e qualquer tecnologia de conservação existente, mantém as propriedades inerentes do produto original (água de coco) e uniformidade do produto (NUNES; SALGUEIRO, 2011).

2.5 Análise de viabilidade oocitária

A análise de viabilidade do oócito após descongelação é um fator influente nos resultados de criopreservação (GUAITOLINI et al., 2012). Oliveira, (2013) relata, que as sondas fluorescentes e algumas variedades de corantes utilizados para avaliar essa célula têm-se destacado como o método de sucesso em experimentos. Rodriguez-Martinez et al., (1997) citaram que o desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando sondas fluorescentes para verificação do DNA, de enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou membranas, tem sido apontado como ferramenta auxiliar na determinação da funcionalidade de vários tipos de célula, após a prática de congelação/descongelação

O primeiro relato de uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana foi com sêmen humano utilizando brometo de etídio (GARAY, 2012). Por conseguinte, vários tipos de sondas fluorescentes vêm sendo usadas para analisar a viabilidade de algumas células, como o brometo de etídio, e diacetato de fluoresceína (FDA), todavia, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesadas (VASCONCELOS FILHO, 2010). Por ser um corante fluorescente muito estável e apresentar êxito nos resultados em microscopia de fluorescência, o IP vem sendo utilizado em vários trabalhos. Alves (2010) por exemplo, em seu experimento, empregou o IP no processo de avaliação de criopreservação lenta de folículos pré-antrais caninos.

O outro tipo de sonda, o diacetato de fluoresceína tem seu princípio baseado de que apenas células vivas convertem o FDA em fluoresceína. A utilização desse corante na avaliação do estado fisiológico e a integridade da membrana apresenta como vantagem a velocidade na obtenção de resultados. E sua ação se dá pela detecção da presença de esterases ativas, exibindo cor de excitação azul e a coloração final conferida é verde claro. A capacidade de penetrar nas membranas celulares por difusão passiva, é proveniente da presença do grupo acetyl das moléculas de FDA. E após a entrada das moléculas, as esterases presentes nas células clivam as ligações éster, liberando os grupos acetato e induzindo, desse modo, o brilho típico da fluoresceína, que fica retida no citoplasma (BRAMER et al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de oócitos propicia a preservação de material genético de espécies domésticas e ameaçadas ou em risco de extinção, por meio de bancos de germoplasma animal, como também estimula o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, podendo ser utilizada como sucesso em casos de infertilidade adquirida. O desenvolvimento de um aditivo ACP-408[®] ao meio crioprotetor padrão etilenoglicol, além de desenvolver um produto regional e com propriedades bioquímicas benéficas aos oócitos, também visa o depósito de patente já em andamento.

Neste cenário, os resultados obtidos demonstram a necessidade de pesquisas adicionais na busca do aperfeiçoamento de novas estratégias com a utilização do aditivo ACP-408[®] no processo de criopreservação de oócitos ovinos, para posterior utilização em programas de produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA NETO, A. S.; LUZ, J. V.; ANDRADE, M. M. L. L.; FREITAS, V. J. F. F. Efeito do método de colheita sobre a taxa de recuperação e a Qualidade oocitária em ovinos do nordeste brasileiro. **Ciência Animal**. p. 97-102, 2010.

AIDAR, N. B. Criopreservação de Sêmen Equino. **Monografia** (Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, p. 52, 2015.

ALVES, K. A. Isolamento e criopreservação de folículos pré-antrais caninos. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. f. 56, 2010.

AMORIM, C. A.; RONDINA, D.; LUCCI, C. M.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GIORGETTI, A. Permeability of ovine primordial follicles to different cryoprotectants. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1077-108, 2006.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 1-186. 2014.

ARAÚJO, E. A. B.; OLIVEIRA, S. N.; TABEL, A. F.; BITTENCOURT, R. F.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Aspiração Folicular Videolaparoscópica Comparativa em Ovelhas Dorper e Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, p. 98-104, 2016.

AYE, M.; DI GIORGIO, C.; DE MO, M.; BOTTA, A.; PERRIN, J.; COURBIERE, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 1905–1912, 2010.

BALDASSARRE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: **Aisen EG. Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: Medicina Veterinária, p.179-183, 2008.

BHAT, S. N.; SHARMA, A; BHAT, S. V. Vitrification and glass transition of water: insights from spin probe ESR. **Physical Review Letters**, v. 95, p. 235702. 2005.

BARBOSA, R. T.; POLISSENI, J.; GUERRA, M. O.; CAMARGO, L. S. A.; PETERS, V. M. Avanços Tecnológicos da Criopreservação de ovócitos. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 32 - 35, 2009.

BERNARDI, M. L. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinaea**, v.33, p.1-16, 2005.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A. E.; DE KRUIF A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**. v. 47, p. 1221- 1236, 1997.

BRAMMER, S. P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L. B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-8, 2015.

CABODEVILA, J.; TERUEL, M. Criopreservación de embriones bovinos. **In:** Biotecnología de La Reproducción, pp 149–174. Ed GA Palma. Buenos Aires: Gustavo A. Palma, 2001.

CARRILHO, D. Comparação Entre o Congelamento Lento e a Vitricificação na Criopreservação de Tecido Ovariano de Suínos. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília, Brasília, 71f. 2013.

CECCONI, S.; CAPACCHIETTI, G.; RUSSO, V.; BERARDINELLI, P.; MATTIOLI, M.; BARDONI, B. In vitro growth of preantral follicles isolated from cryopreserved ovine ovarian tissue. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 12-17, 2004.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CÉSAR, J. M. S.; PETROIANU, VASCONCELOS, L. S.; CARDOSO, V. N.; MOTA, L. G.; BARBOSA, A. J. A.; SOARES, C. D. V.; OLIVEIRA, A. L. Estudo preliminar da água de coco para preservação de enxertos teciduais em transplante. **Revista Colégio Brasileiro de Cirurgões**. v. 42, p. 043-048, 2015.

CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 29-36, 2006.

CHAND, S.; LUZUNSI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 1295-1304, 1994.

CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 685-696, 2004.

CIANI F, COCCHIA N, ESPOSITO L AVALLONE L. Fertility Cryopreservation. In Advances in Embryo Transfer, Rijeka: InTech. Fertility cryopreservation. University of naples federico ii italy. p. 225–248. Ed. B. 2012

COCCHIA, N.; ESPOSITO, L.; AVALLONE, L. Fertility Cryopreservation. Advances in Embryo Transfer. **InTechopen**, 2012.

COCCHIA, N.; CIANI, F.; RUSSO, M.; EL RASS, R.; ROSAPANE, I.; AVALLONE, L.; TORTORA, G. E.; LORIZIO, R. Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture, **Cryobiology**, v. 60, p. 229-34, 2010.

COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; TORRES, C. A. A.; FAGUNDES, L. M.; GIOSO, M. M. Criopreservação de Ovócitos de Bovinos Imaturos Desnudos ou Não, utilizando o Etilenoglicol pelo Método da Vitricificação. **Revista Brasileira Zootecnia**. v. 31, p. 1122-1129, 2002.

COTICCHIO, G.; BONU, M. A.; BORINI, A.; FLAMIGNI, C. Oocyte cryopreservation: a biological perspective. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 115, p. s2-s7, 2004.

COX, J.; HORMAZABAL, J. E.; SANTA MARIA, A. Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. **Theriogenology**, v.40, p. 1259-1267, 1993.

CROCOMO, L. F.; FILHO, M. W. C.; LANDIM ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.36, p.25-31, 2012.

DÍEZ, C.; DUQUE, P.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; RODRÍGUEZ, A.; FERNÁNDEZ, L.; DE LA VARGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; FACAL N.; CARBAJO, M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. **Theriogenology**, v. 64, p. 317–333, 2005.

DÍEZ, C.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; GÓMEZ, E. Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 76–83, 2012.

DUAN, W.; LOPEZ, M. J.; HICOK, K. Adult multipotent stromal cell cryopreservation: pluses and pitfalls. *Veterinary Surgery*, v.47, p.19-29, 2017.

EROGLU, A.; BAILEY, S. E.; TONER, M.; TOTH, T. L. Successful cryopreservation of mouse oocytes by using low concentrations of trehalose and dimethylsulfoxide. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 70-78, 2009.

FAGUNDES, L. M.; COSTA, E. P.; TORRES, C. A. A.; FILHA, W. S. A.; GUIMARÃES, J. D. Congelamento de Ovócitos Desnudos ou Não, Maduros e Imaturos de Bovinos, Utilizando o Etileno Glicol pelo Método Convencional. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, p. 2026-2036, 2004.

FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, p. 3-15, 2011.

FERRAZ, V. J. F.; MORAES JÚNIOR, F. J.; FEITOSA, M. L. T.; ALMEIDA, H. M.; BEZERRA, D. O.; PESSOA, G. T.; ALBUQUERQUE, D. M. N.; CARVALHO, M. A. M. Técnica de fatiamento do ovário para obtenção de oócitos em cutias (*Dasyprocta prymnolopha*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p. 204-208, 2016.

FREITAS, V. J. F. et al. Criopreservação de oócitos e embriões. In: OLIVEIRA, M.E.F. et al; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. (Eds.). **Biotécnicas Reprodutivas Em Ovinos e Caprinos**, 1. ed., São Paulo: MedVet, p. 201, 2013.

GARAY, R. M. Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal do ejaculado de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrino*) e ensaio de ligação da membrana perivitelinica de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, p. 65, 2012.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GONÇALVES P.B.D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J. R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. p. 179-194, 2002.

GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Ed. São Paulo: ROCA, 2008.

GOSDEN, R.; NAGANO, M. Preservation of fertility in nature and ART. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 3-11, 2002.

GOTTARDI, F. P.; BARRETTO, L. S. S.; GONÇALVES, F. S.; PERRIL, S. H. V.; MINGOTIL, G. Z. Efeito das células do *cumulus* e cisteamina durante o cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.204-208, 2012.

GRIVEAU, J. F.; LOPES, M.; JOUVE, G.; VEAU, S.; RAVEL, C.; MORCEL K. La vitrification : principes et résultats. **Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 44, p. 485-495, 2015.

GUAITOLINI, C. R. F.; TAFFAREL, M. O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, A. M. J.; FREITAS, B. P. M. C.; LOPES, C. M. D.; LANDIN-ALVARENGA, B. F. C.; OLIVEIRA, B. C. A.; LUZ, D. M. R. Post-thaw viability of *in vivo* produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. **Theriogenology**. v.78, p.576 –582, 2012.

HUANG, J.; LI, Q.; ZHAO, R.; LI, W.; HAN, Z.; CHEN, X.; XIAO, B.; SHUYUN, W.; JIANG, Z.; HU, J.; LIU, L. Effect of sugar on maturation rate of vitrified-thawed immature porcine oocytes. **Animal Reproduction science**, v. 106, p. 25-35, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2016 Produção da Pecuária Municipal, <https://www.ibge.gov.br//estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/>. Acessado em 17 de julho de 2018.

JARK, P.; RAPOSO, T. M. M.; TRINDADE, A. B.; ALVES, A. E.; APPARICIO, M. Criopreservação de tecidos gonadais para conservação da fertilidade em canídeos e felídeos: realidade ou promessa? **Investigação- UNIFRAN**, v.15, p.14-20, 2016.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 24, p. 1670-1683, 2009.

KOHAYA, N.; FUJIWARA, K.; ITO, J.; KASHIWAZAKI, N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. **Journal of Reproduction and Development**. v. 57, p. 675-680, 2011.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**. v.48, p.76-86, 1979.

LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; TEIXEIRA, L.; NUNES, J. F.; CARMINDA, S. B.; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B. Criopreservação de sêmen de tambaqui com acp® adicionado de gema de ovo. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 6, p. 23-29, 2011.

LOURENÇO, B. S. L. T. Seleção de oócitos para as técnicas de Reprodução Assistida com base nos estudos com células do cumulos. 2012. **Dissertação (Mestre em Bioquímica)** - Universidade de Coimbra, 2012.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÃO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1101-1114, 2004.

MOAWAD, A. R.; FISHER, A. P.; JIE ZHU, A.; INCHUL CHOI, A; POLGAR, B. Z.; DINNYES, C. D. A.; KEITH, H. S.; CAMPBELL, L. In vitro fertilization of ovine oocytes vitrified by solid surface vitrification at germinal vesicle stage. **Cryobiology**, v. 65, p. 139-144, 2012.

MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X.; ZENG, F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. **Science China. Life Sciences**, v. 57, p. 903-914, 2014.

MUKAIDA T, OKA C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. V. 26, p. 789-803, 2012.

NUNES, J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes**. 1 ed. Fortaleza. Tecnograf, 2010.

NUNES, J. F.; SALGUEIRO C. C. M. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p.176-184, 2011.

OLIVEIRA, R.A. Avaliações *in vitro* da fertilidade do sêmen equino. **Pubvet**, Londrina, v. 7, Art. 1646, 2013.

ONIONS, V. J.; MITCHELL, M. R. P.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human Reproduction**, v. 23, p. 606-618, 2008.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, p. 152-159, 2016.

PORTO, F. **Histologia e Embriologia**. 1 ed. Rio de Janeiro. 2015.

PRADIEÉ, J. Antioxidantes na produção *in vitro* de embriões e criopreservação de sêmen de ovinos. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)** - Universidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, p. 70, 2013.

PRATES, E.G.; ALVES, S. P.; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M. C.; BESSA, R. J. B.; PEREIRA, R. Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t10, c12 CLA) and forskolin. **In Vitro Cellular e Development Biology**, v. 49, p. 335-345, 2013.

PRENTICE-BIENSCH, J. R.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R. J.; ANZAR, M. Vitrification of immature bovine cumulus-oocyte complexes: effects of cryoprotectants, the vitrification procedure and warming time on cleavage and embryo development. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 73, 2012.

RAMOS, A. A; POLISSENI, J.; S. A., W. F.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; FOLHADELLA, D. S.; NOGUEIRA, L. A. G. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 35, p. 2285-2289, 2006.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 211-227, 2004.

SILVA, M. C. M. S. Criopreservação de oócitos: efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) Universidade de Lisboa. Lisboa. p. 67, 2015.

SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PLoS One**, v. 7, p.6058, 2012.

ROCHA, J. B. Panorama da ovinocaprinocultura na microrregião de Itapetinga-Ba. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia). Bahia. 2014.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., LARSSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 9, p. 297-308, 1997.

RODRIGUEZ, M. G. K.; AMBROGI, M.; VRISMAN, D. P.; MACIEL, G. S.; FELICIANO, M. A. R.; TEIXEIRA, P. P. M. Aspiração Folicular por Laparoscopia em ovinos. **Investigação- UNIFRAM**. p. 55-60, 2015.

SANTOS, J. R. Composição Física dos Cortes Comerciais da Carcaça de Ovinos Santa Inês Terminados em Pastejo e Submetidos a Diferentes Níveis de Suplementação. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**. Universidade Federal de Campina Grande. Patos, 2007.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.

A.; MELO, M. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 250-255, 2006.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO J.R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v.327, p. 167-176, 2008.

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

SEKI, S.; MAZUR, P. Ultra-rapid warming yields high survival of mouse oocytes cooled to -196°C in dilutions of a standard vitrification solution. **PLoS One**, v. 7, p.6058, 2012.

SHARMA, G. T.; KHARCHE, S. D.; MAJUMDAR, A. C. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization. **Small Ruminant Research**, v. 64, p. 82-86, 2006.

SHAW, J. M.; JONES, G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction**, v. 9, p. 583-605, 2003.

SHIRAZI A, SHAMS-ESFANDABADI N, HOSSEINE SM. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. **Small Ruminant Research**, v. 58, p. 283-286, 2005.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP[®]) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 767-774, 2006.

SILVA, A.E.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. The influence of powdered coconut water (ACP-318[®]) in *in vitro* maturation of canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. v.45, p.1042-1046, 2010.

SILVA, C. Criopreservação de oócitos : efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). 2015.

SOUZA-FABJAN, M. G.; LOCATELLI, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; RIBRIO, R. I. T. P. B.; FREITAS, V. F. F.; MERMILLOD, P. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for *in vitro* embryoproduction. **Theriogenology**, v. 86, p. 1989-1998, 2016.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the international Embryo Transfer Society. **Internacional Embryo Transfer Society**, p. 200, 2010.

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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VASCONCELOS FILHO, W. F; Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino. 2010. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)**, Rio de Janeiro. 2010.

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

WANI, N.A.; WANI, G.M.; KHAN, M.Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting technique on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36: p. 63-67, 2000.

WANI, N. A. *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 44, p. 89-95, 2002.