

KENNEY DE PAIVA PORFIRIO

QUALIDADE DE OÓCITOS CAPRINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO
ALTERNATIVO CONTENDO ACP-407[®]

TERESINA
PIAUÍ – BRASIL
2017

KENNEY DE PAIVA PORFIRIO

QUALIDADE DE OÓCITOS CAPRINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO
ALTERNATIVO CONTENDO ACP-407®

Dissertação apresentada 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
PIAUI – BRASIL
2017

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

P836q Porfírio, Kenney de Paiva
Qualidade de oócitos caprinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACP - 407® / Kenney de Paiva Porfírio - 2017.
46 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.
Orientação: Prof.Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula

1. Caprino - Criopreservação de oócito 2. Crioprotetores alternativos 3. Pequenos ruminantes I. Título

CDD 636.390824

QUALIDADE DE OÓCITOS CAPRINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO
ALTERNATIVO CONTENDO ACP407®

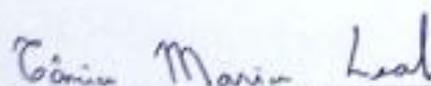
KENNEY DE PAIVA PORFIRIO

Dissertação Aprovada em: 03/02/2017

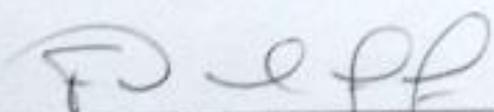
Banca Examinadora:



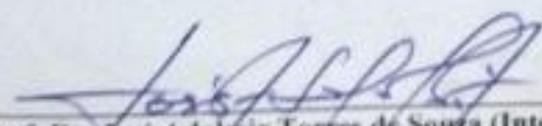
Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



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



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



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Interno) / DCCV/CCA/UFPI

Aos meus Pais, Manoel de Jesus Porfirio da Silva e Maria Áurea de Paiva Porfirio, aos meus irmãos, Kennedy de Paiva Porfirio e Kennya de Paiva Porfirio e a minha sobrinha Alice Alves Porfirio

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar forças para conquistar todos meus objetivos e por permitir que mais essa etapa tenha sido vencida na minha vida.

Aos Meus pais, Manoel de Jesus e Maria Áurea, pela educação que me deram, pelo amor e por sempre me darem conselhos em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos, Kennedy Porfirio e Kennya Porfirio, pela amizade e por sempre estarem por perto me apoiando.

A minha sobrinha e afilhada Alice Porfirio, por ser mais um motivo de alegria em nossa Família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, pela orientação, paciência, amizade e por sempre acreditar em mim.

A professora Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro, por ter me acolhido durante o período de minha pós graduação, pelos conselhos e pela amizade.

A todos professores que contribuíram com essa conquista, em especial aos professores Dra. Janaina de Fatima Saraiva Cardoso e Dr. Bruno Leandro Maranhão Diniz. Pessoas pelo qual tenho muita admiração e carinho.

A todos integrantes do Grupo de Pesquisa em Sanidade e Reprodução animal, pela amizade.

As pós graduandas, Marlene Sipaúba e Tuanny Damasceno, pela amizade e os bons momentos que passamos durante esses dois anos.

Aos amigos Alberto Neto, Mizael das Virgens, Gustavo Martins e Raphael Briseno, pelo apoio e pela ajuda no desenvolvimento da parte prática desse trabalho.

Ao grande amigo e Médico Veterinário, Jefferson Lustosa, por ter me auxiliado nas análises laboratoriais do experimento.

Ao Programa de Pós graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí por minha formação profissional.

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

Ao CAPES pela concessão de Bolsa de estudo.

Meu muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1Morfofisiologia do Complexo <i>Cumulus</i> Oócito	14
2.2Métodos de obtenção e classificação de oócitos	15
2.3 Criopreservação de Oócitos.....	17
2.4Criopreservação lenta.....	18
2.5Crioprotetores.....	19
2.6Análise da viabilidade	21
3.CAPITULO I.....	1
RESUMO	1
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS	3
Estudo da área	3
Coleta e processamento das amostras	3
Avaliação e Classificação dos oócitos.....	3
Envasamento e Criopreservação	4
Análise da viabilidade através da associação de sondas fluorescentes	4
Análise estatística.....	5
RESULTADOS.....	5
DISCUSSÃO.....	6
CONCLUSÃO	11
REFERÊNCIAS	12
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
PERSPECTIVAS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXO A	31
ANEXO B	32

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Classificação de óocitos.	17
Figura 2	Óocito viável apresentando coloração verde claro.	6
Figura 3	Óocitonão viável apresentando coloração vermelho claro.	6

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Recuperação e classificação de oócitos puncionados por agulha 21G acoplada em seringa de 5mL para posterior criopreservação.	5
Tabela 2	Análise da viabilidade de membrana plasmática de oócitos através da associação de sondas fluorescentes.	6

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ACP®	Água de Coco em Pó
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> Oócitos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EG	Etilenoglicol
FDA	Diacetato de Fluoresceína
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	Iodeto de Propídeo
LOPU	Aspiração Folicular por Laparoscopia
M	Molar
MG	Minas Gerais
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PM	Peso Molecular
SRD	Sem Raça Definida
UFPI	Universidade Federal do Piauí

RESUMO

PORFIRIO, K.P. QUALIDADE DE OÓCITOS CAPRINOS APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM MEIO ALTERNATIVO CONTENDO ACP-407[®]. 2017.47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

Objetivou-se avaliar a viabilidade de oócitos caprinos submetidos ao processo de criopreservação lenta em meio alternativo contendo ACP-407[®] após descongelação. Foram coletados 160 ovários, provenientes de 80 cabras púberes oriundas de abatedouros localizados na microrregião homogênea de Teresina. Após o abate os ovários foram imediatamente transportados para o laboratório em garrafa térmica com solução salina fisiológica a 35°C adicionada de 30ug/mL de sulfato de gentamicina. Os oócitos foram aspirados com agulha 21G acoplada a seringa de 5mL, posteriormente o aspirado foi colocado em tubos tipo *falcon* de 15 mL, onde permaneceram durante 15 minutos para que ocorresse a decantação dos Complexos *Cumulus*Oócitos (CCOs). O sedimento foi aspirado com o auxílio de uma pipeta de 100µL e colocados em placa de petri onde foram avaliados e classificados utilizando estereomicroscópio. Após a classificação os CCOs foram separados em três grupos, Grupo I (Glicerol - Controle), Grupo II (Etilenoglicol) e Grupo III (Etilenoglicol e ACP-407[®]), e envasados em palhetas francesas de 0,25 mL no qual foram submetidos ao processo de criopreservação lenta, em curva de criopreservação específica para embriões, em aparelho TK 3000[®]. Após o período mínimo de 10 dias os oócitos foram descongelados e avaliados através da associação de sondas fluorescentes (iodeto de propídeoacetato de carboxifluoresceína). Foram recuperados 139 CCOs, onde obteve-se uma taxa de recuperação de 1,73CCOs por par de ovários. Em relação a análise de viabilidade com a utilização de sondas fluorescentes o grupo contendo ACP-407[®] com etilenoglicol apresentou melhores resultados quando comparados ao grupo etilenoglicol ou glicerol, representando uma taxa de viabilidade de 16,6%, 7,4% e 6%, respectivamente. Portanto, a adição de ACP-407[®] ao crioprotetor etilenoglicol melhora a viabilidade dos oócitos caprinos pós descongelação.

Palavras-chave: Criopreservação de oócitos; Água de coco em pó; Caprino.

ABSTRACT

PORFIRIO, K.P. QUALITY OF GOATS OOCYTES AFTER CRIOPRESERVATION IN ALTERNATIVE MEANS CONTAINING ACP-407®. 2017. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

The aim of this study was to evaluate the viability of goat oocytes submitted to the slow cryopreservation process in an alternative medium containing ACP-407® after thawing. A total of 160 ovaries were collected from 80 pre - pubescent goats from slaughterhouses located in the homogeneous microregion of Teresina. After slaughter the ovaries were immediately transported to the laboratory in a thermos flask with physiological saline solution at 35°C added with 30ug/mL gentamicin sulfate. The oocytes were aspirated with a 21G needle attached to a 5mL syringe, and the aspirate was placed in 15mL falcon tubes, where they remained for 15 minutes for the decantation of Cumulus Oocyte Complexes (COCs). The sediment was aspirated with the aid of a 100µL pipette and placed in petri dish where they were evaluated and classified using a magnifying glass. After classification, the COCs were separated into three groups, Group I (Glycerol - Control), Group II (Ethylene Glycol) and Group III (Ethylene Glycol and ACP-407®), and packed in 0.25mL vats in which they were submitted to the slow cryopreservation, in specific curve for embryos In TK 3000® apparatus. After the minimum period of 10 days the oocytes were thawed and evaluated through the association of Fluorescent probes (propionate iodide and carboxyfluorescein diacetate). 139 COCs were recovered, where a recovery rate of 1.73 COCs per pair of ovaries was obtained. In relation to the feasibility analysis with the use of fluorescent probes the group containing ACP-407® with Ethylene glycol presented better results when compared with the group Ethylene glycol or Glycerol, representing a viability rate of 16.6%, 7.4% and 6%, respectively. Therefore, the addition of ACP-407® to the cryoprotectant ethylene glycol improvement the viability of oocytes goats thawing.

Keywords: Oocyte criopreservation; Coconut water powder; Goat.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um número expressivo de caprinos com aproximadamente 8,85 milhões de animais, onde a região Nordeste vem se destacando a cada dia na criação de caprinos, representando 91,6% deste total. Neste contexto, os estados da Bahia, Pernambuco e Piauí se destacam por liderarem o *ranking* apresentando 26,7%, 23,6% e 13,9%, respectivamente (IBGE, 2014).

Devido a suas grandes propriedades nutricionais os produtos provenientes de pequenos ruminantes vem se destacando cada vez mais no mercado. Esses produtos tais como, carne, leite e seus derivados fornecem nutrientes essenciais que são: proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais e vitaminas (BERCHIELLE et al., 2011; ALBENZO et al., 2016).

Atualmente tem sido observado uma grande procura por produtos cárneos de qualidade, onde para satisfazer as exigências dos consumidores o produto deve oferecer características intrínsecas desejáveis bem como um processo de produção politicamente correto (BIANCHINI et al., 2015). Essas características são de grande importância, uma vez que o consumidor está cada vez mais atento a qualidade dos produtos consumidos (CRUZ et al., 2016) e como consequência as cadeias produtivas e comerciais vêm sendo cada vez mais organizadas (ESTEVEZ et al., 2010).

As biotecnologias reprodutivas são ferramentas tecnológicas capazes de promover resultados amplos em programas de melhoramento genético nos rebanhos, como também de conservação de material genético de animais superiores e de espécies ameaçadas de extinção (FREITAS et al., 2013).

Nesse aspecto, visando maximizar a fertilidade de caprinos uma das estratégias é a utilização de tecnologias da reprodução onde a criopreservação de gametas está inserida neste contexto (PARAMIO e IZQUIERD, 2014). A criopreservação de oócitos configura-se como uma importante ferramenta propulsora de diversas biotecnologias, como também propicia a conservação de material genético para banco germoplasma (sêmen, embrião, folículo ovariano e oócitos) e possibilita o envio de material genético entre regiões e países, sem haver riscos sanitários (FREITAS et al., 2013).

Várias manipulações de crioprotetores têm sido propostas, no intuito de aumentar a sobrevivência das estruturas criopreservadas, levando em consideração aspectos importantes como permeabilidade da membrana celular, lipídios e água intracelular (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Dentro dessas manipulações a água de

coco tem demonstrado um grande potencial uma vez que fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos e femininos criopreservados (CARVALHO et al., 2006).

Uma das grandes preocupações atualmente está voltada a manutenção de espécies ameaçadas em extinção bem como de animais de alto valor genético. Dentro desse contexto, a criopreservação de germoplasma vem ganhando bastante destaque. Atualmente, diversos trabalhos vêm demonstrando a ação benéfica da água de coco sobre a conservação celular, como os trabalhos realizados por Carvalho et al. (2006), onde os mesmos relatam que a água de coco possui nutrientes necessários para sobrevivência de gametas e Silva et al. (2010), onde esses autores relatam a ação benéfica como meio de cultura para embriões bovinos. No entanto ainda há uma grande necessidade de estudos especialmente quanto a criopreservação de germoplasma, especialmente quando se refere a oócitos.

Sabendo-se das particularidades das técnicas de criopreservação celular, sobretudo as dificuldades de se reduzir ou evitar injúrias celulares provocadas ao longo do processo, induzidas por conta das baixas temperaturas, faz-se necessária a viabilidade de novos estudos a fim de se buscar alternativas de soluções para criopreservação de oócitos, bem como de outros tipos celulares e/ou tecidos. Neste contexto o uso da ACP-407[®] para essa finalidade poderá subsidiar pesquisas inerentes a reprodução animal assistida, como a produção *in vitro* de embriões.

Essa dissertação apresenta a seguinte estrutura formal: uma introdução contendo o objetivo; Revisão de literatura; Capítulo I, contendo o artigo intitulado “Qualidade de oócitos caprinos após criopreservação em meio alternativo contendo Água de Coco em Pó (ACP-407[®])”, além de conclusões gerais, 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 *cumulusoócito*

As técnicas de reprodução assistida trouxeram muitas informações sobre a morfologia do oócito, pois para a realização destas técnicas muitas vezes é necessário o desnudamento oocitário, deixando-o livre das células do *cumulusoophorus*, o que permite a sua melhor observação antes e durante o processo de fertilização, permitindo correlacionarem-se parâmetros da morfologia oocitáriacom a qualidade e viabilidade embrionária (DE SANTIS et al., 2005; EBNER et al., 2006). Após o desnudamento é possível a avaliação de muitos parâmetros morfológicos oocitários, como a forma do oócito, a coloração e a granulação do citoplasma e núcleo, a regularidade e a espessura da zona pelúcida, o tamanho do espaço perivitelínico, a presença de vacúolos, a presença ou ausência da vesícula germinativa e do primeiro corpúsculo polar, assim como de sua morfologia (EBNER et al., 2006).

O oócito no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo *cumulusoócito*. O conjunto de células próximo a zona pelúcida, em intimo contato com o oócito por junções intercomunicantes é denominada corona radiata (GONÇALVES et al., 2008).

A zona pelúcia funciona como uma barreira para a fecundação entre espécies diferentes e é composta por três glicoproteínas que são produzidas exclusivamente pelo oócito em crescimento: ZP1, ZP2 e ZP3. Acredita-se que a proteína ZP3 é responsável pela ligação espécie-específica entre o espermatozoide e a zona pelúcida (GONÇALVES et al., 2008; ALBERTS et al., 2010). A glicoproteína ZP3 também estimula a absorção de cálcio que por sua vez induz o espermatozoide a sofrer a reação acrossômica (liberação das enzimas hidrolíticas do acrossomo que auxiliam o espermatozoide a atravessar a zona). A reação acrossômica também expõe diversas proteínas que se ligam ao ZP2 (mantendo o espermatozoide fortemente ligado a zona) e outras que fazem a ligação e fusão das membranas plasmáticas dos gametas (ALBERTS et al., 2010).

A ligação entre as membranas causa uma despolarização imediata da membrana do oócito em decorrência da abertura dos canais de íons que inverte a polaridade intra e extracelular, ocasionando um rápido bloqueio da poliespermia (ALBERTS et al., 2010). 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 espermatozoides (bloqueio da poliespermia) (MOORE, 2000).

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. A membrana vitelina (membrana plasmática do gameta feminino) participa ativamente nesse processo e, dessa forma, o espermatozoide é incorporado pelo ooplasma. O oócito ativado pela presença do espermatozoide responde inicialmente com a despolarização da membrana plasmática, hidrólise do fosfatidilinositolbifosfato (PIP₂), com o aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e síntese proteica (GONÇALVES et al., 2002).

Para impedir a penetração de mais de um gameta (policermia), observa-se rápida despolarização da membrana vitelina após a fecundação, fenômeno denominado de bloqueio vitelínico. Outro bloqueio (secundário) resulta da reação cortical, após a penetração espermática, que envolve a fusão da membrana plasmática do oócito, com a membrana dos grânulos corticais. Essa fusão é propagada como uma onda, envolvendo toda a superfície do oócito, a partir do ponto da fusão espermatozoide/oócito. O conteúdo dos grânulos corticais possui enzimas como as hidrolíticas, proteinases e peroxidases, que são depositadas no espaço perivitelino, provocando hidrólise parcial das proteínas da zona pelúcida, sendo transformadas em ZP1F, ZP2F e ZP3F (GONÇALVES et al., 2002).

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).

O corpúsculo polar é oriundo da primeira divisão meiótica, essa estrutura não participa da fertilização, mas a sua formação é um passo fundamental no processo de maturação oocitária, sendo sua visualização um indicativo importante de maturidade oocitária, fundamental para a avaliação do sucesso dos protocolos de maturação *in vitro* oocitária (EBNER, 2000).

2.2 Métodos de obtenção e classificação de oócitos

A principal fonte de ovários para punção de folículos ovarianos, em qualquer espécie doméstica, continua sendo em abatedouros (GONÇALVES et al., 2008). Seus

ovários constituem um modelo clássico de pesquisa. Neste caso, o bem estar animal é respeitado, uma vez que as fêmeas são sacrificadas para o consumo da carne e os ovários são perdidos (NUNES et al., 2010). Contudo, pequenos ruminantes apresentam menor recuperação e baixa qualidade de Complexo *Cumulus*Oócitos (CCOs) quando os ovários são provenientes de abatedouros.

Os oócitos em pequenos ruminantes podem ser obtidos por aspiração folicular, dissecação de folículos grandes (SAMAKE et al., 2000; NUNES et al., 2010), laparotomia, aspiração folicular guiada por ultrassonografia (LOPU) e laparoscopia (BALDASSARE et al., 2002; GONÇALVES et al., 2008; NUNES et al., 2010).

Na aspiração folicular a punção é realizada com uma agulha 18 ou 19G acoplada a uma seringa de 1mL ou bomba de vácuo (GONÇALVES et al., 2008). Outra técnica bastante utilizada em pequenos ruminantes é a dissecação de folículos grandes onde essa técnica que permite maior recuperação de (CCOs), porém é uma técnica mais demorada e necessita de profissional mais qualificado (NUNES et al., 2010).

A técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (LOPU) em pequenos ruminantes permite o uso da mesma fêmea por diversas vezes, entretanto, os protocolos de superovulação para indução e sincronização de estro, em geral, agridem a saúde dos animais, uma vez que esses protocolos levam a formação de anticorpos que diminui gradativamente a resposta ovulatória após repetidas aplicações podendo levar a formação de aderências ovarianas e fibrose (TERVIT, 1996; BALDASSARE et al., 1996; NUNES et al., 2010).

Por outro lado, a laparoscopia se destaca por ser pouco invasiva, proporcionando recuperação mais rápida e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea. Esta técnica tem sido utilizada para a obtenção de oócitos *in vivo* para uso na pesquisa fundamental e na produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes (BALDASSARRE et al., 2002; CORDEIRO, 2006).

De acordo com GONÇALVES et al. (2008) a técnica de laparotomia seria interessante em virtude do custo, porém devido os posteriores problemas após a realização da técnica como o comprometimento reprodutivo provocado por aderências que leva o descarte precoce do animal essa técnica atualmente está em desuso.

Os oócitos são classificados em uma escala de 1 a 4, (figura 1) considerando as características das células do *cumulus* e do citoplasma 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, por último, os oócitos de qualidade 4, são aqueles com oócitos desnudos e sem células do *cumulus* (LEIBFRIED e FIRST, 1979; GONÇALVES et al., 2008; STRINGFELLOW e GIVENS, 2010).

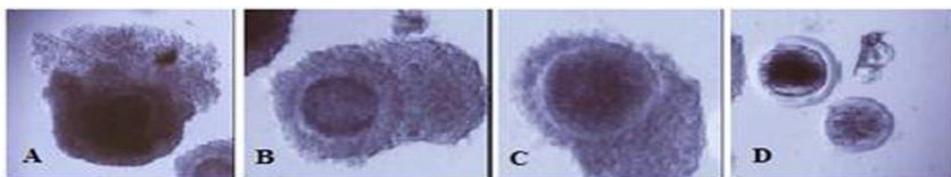


Figura 1. Classificação de oócitos de acordo com Strigfellow e Givens. **A:** Grau I; **B:** Grau II; **C:** Grau III; **D:** Grau IV. Fonte: STRINGFELLOW e GIVENS, 2010.

Morfologicamente, os oócitos são avaliados pela quantidade e qualidade das camadas de células do *cumulus* e a homogeneidade do citoplasma do oócito. Em geral, para caprinos e ovinos são selecionados para maturação apenas aqueles oócitos sem expansão das células do *cumulus*, citoplasma uniforme, levemente granuloso e coloração homogênea (NUNES et al., 2010).

Um dos fatores que influencia a qualidade do oócito recuperado é o transporte adequado do material coletado, seja ovário ou oócito. A temperatura, o meio e o tempo do transporte são aspectos fundamentais para preservação do material e com este objetivo cada autor tem uma maneira de fazê-lo. Este tempo também deve ser o mais curto possível, mas se realizado no período de até 3 horas parece não afetar a viabilidade dos CCOs (GONÇALVES et al., 2002).

2.3 Criopreservação de Oócitos

A criopreservação de oócitos (gameta feminino) é um passo crucial para a conservação da genética feminina (PRENTICE e ANZAR, 2011). Essa biotécnica reprodutiva propicia a preservação de material genético de espécies ameaçadas através de bancos de germoplasma animal e também estimula o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico (SARAGUST e ARAV, 2011; ALVES et al., 2013).

Atualmente, existem dois tipos de criopreservação de oócitos, criopreservação lenta e vitrificação. Na criopreservação lenta, baixas taxas de resfriamento e baixas concentrações de crioprotetores são usadas, enquanto na vitrificação utiliza altas taxas de resfriamento e altas concentrações de crioprotetores (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

A sensibilidade natural de oócitos na criopreservação pode ser atribuída a vários fatores, incluindo tamanho, forma, permeabilidade e conteúdo lipídico (BHATI et al., 2013). Uma vez criopreservado ou vitrificado, o germoplasma pode ser estocado por longo período sem que ocorra a deterioração (RIGGS et al., 2010).

Uma das grandes vantagens de se criopreservar oócitos imaturos é que, após a criopreservação e descongelamento, podem sobreviver e serem posteriormente maturados (MOAWAD et al., 2012). Além disso, na espécie bovina demonstraram melhor eficiência nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos, após o processo de vitrificação, indicando melhor resistência a crioinjúria (ZHOU et al., 2010).

A criotecnologia tem permitido significativos avanços na preservação e multiplicação de várias espécies. No entanto, o processo apresenta distintas limitações, sendo necessárias a evolução e a adaptação de diferentes protocolos de criopreservação de gametas de acordo com as características de cada espécie. De modo geral, a aplicabilidade dos resultados, tanto no Brasil como no mundo, apesar de estes serem promissores, apresenta baixa repetitividade, provavelmente devido à não padronização de protocolos adequados que garantam a viabilidade celular (SOUZA et al., 2014).

2.4 Criopreservação lenta

A criopreservação lenta é um processo onde a água extracelular se cristaliza, resultando em um gradiente osmótico que atrai a água do compartimento intracelular até que a vitrificação ocorra (SARAGUSTY e ARAV, 2011). Comumente essa técnica leva danos devido a cristalização e a consequente formação de gelo intracelular (PRENTICE e ANZAR, 2011).

Os protocolos mais difundidos mundialmente são aqueles com uso de congelação clássica (lenta), que necessita de equipamentos programáveis de elevado custo. A congelação lenta, como o nome já indica, é uma técnica lenta de criopreservação em que se tem como princípio o equilíbrio entre os crioprotetores e o compartimento líquido (GONÇALVES et al., 2008). Em relação a sua eficácia recentes

trabalhos como o de SANCHES et al. (2016) vem mostrando que a criopreservação lenta pode levar a resultados satisfatórios.

A congelação lenta consiste em um pré-equilíbrio e exposição dos embriões ou oócitos à solução crioprotetora, para que estes sejam, então, submetidos à queda de temperatura em máquina programável. Em uma primeira etapa, a temperatura atinge uma fase de pré-congelação a -7°C , momento em que ocorre a liberação do calor latente de fusão e o prejudicial aumento da temperatura, o qual é evitado pelo *seeding*, por meio do contato da palheta com um objeto metálico pré-refrigerado em nitrogênio líquido (geralmente uma pinça hemostática). Após sua manutenção em um período de equilíbrio de 10 a 15 minutos, os embriões são congelados lentamente, com redução de temperatura entre 0,3 e $1^{\circ}/\text{min}$, até atingir -30 a -35°C . Neste momento, tem-se a formação de gelo extracelular da água pura e conseqüente aumento da concentração do soluto extracelular. Ao se encontrar suficientemente desidratada, a célula terá uma concentração elevada de solutos capaz de impedir a cristalização do gelo, momento em que ocorre imersão da célula em nitrogênio líquido a -196°C (VAJTA e NAGY, 2006).

2.5 Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são substâncias orgânicas etêm a função de proteger a célula ou o tecido contra desidratação, resfriamento e outros danos que podem sercausados pela redução extrema da temperatura (MOURA, 2016).

Os crioprotetores pode ter efeitos consideráveis na competência dos oócitos, danos associados a criopreservação são as principais causas da má qualidade de oócitos vitrificados e descongelados (HOSSEINI et al., 2015). Porém, esses efeitos negativos podem ser reduzidos com a utilização de agentes crioprotetores, que permitem preservar as células a temperaturas extremamente baixas (ALVES et al., 2013).

Dentre os principais danos causados aos gametas femininos por protocolos de resfriamento e congelação, podem ser citados a toxicidade e choque osmótico provocados por agentes crioprotetores (SEKI et al.,2011).

Várias manipulações de crioprotetores têm sido propostas, no intuito de aumentar a sobrevivência das estruturas criopreservadas, levando em consideração aspectos importantes como permeabilidade da membrana celular, lipídios e água intracelular (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a criopreservação e aquecimento, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. A toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1986).

Os crioprotetores são divididos em duas categorias, intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes. Na primeira categoria tem-se destaque o Glicerol, com peso molecular (PM) 92,1, Etilenoglicol (PM) 62,1 (NIEMANN, 1991), e na segunda categoria estão a sacarose e glicose e água de coco em pó (CROWE, 1983; NUNES, 1997).

O glicerol é considerado quimicamente um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxilas, os quais podem aceitar um grupo de hidrogênio da molécula de água em seis sítios diferentes. Esse crioprotetor provoca estresse osmótico, mudanças na organização, na fluidez e na permeabilidade da membrana e mudanças em sua composição lipídica (OLIVEIRA et al., 2013).

A criopreservação em glicerol é um dos métodos mais difundidos para a criopreservação de embriões bovinos sendo, por isso denominado método convencional (GONÇALVES et al., 2008). Porém, quando presente em grandes concentrações pode levar danos a membrana plasmática (GARCIA et al., 2012).

Apesar dos efeitos benéficos, o glicerol apresenta certa toxicidade às células, sendo necessária a identificação de sua concentração ideal para cada espécie (HOLT, 2000).

O etilenoglicol é considerado um álcool que possui quatro pares de elétrons isolados, os quais podem ligar a mais elétrons isolados. Os átomos de hidrogênio podem ligar aos quatro sítios e posteriormente doar dois desses átomos (KEITH, 1998).

Esse crioprotetor tem sido utilizado em diversos protocolos para a criopreservação de germoplasma em várias espécies, devido principalmente ao seu baixo peso molecular quando comparado a outros crioprotetores, o que proporciona rápida entrada e saída na célula durante o período de equilíbrio e reidratação, respectivamente, o que permite a reidratação direta após o aquecimento (VOELKEL e HU, 1992).

Nos dias atuais o etilenoglicol é o crioprotetor de eleição, com elevadas taxas de sobrevivência embrionária, aproximando-se daquelas obtidas com embriões frescos (GONÇALVES et al., 2008).

Os açúcares (sacarose e glicose) como substâncias crioprotetoras não apresentam citotoxicidade, mesmo quando se acumulam em grande quantidade. Em comparação com os crioprotetores tradicionais, esses açúcares mostram alta eficiência na estabilização de membranas celulares durante o congelamento (HUBALEK, 2003). Desta forma, inibem a cristalização e, portanto, ajuda na preservação desses organismos em condições adversas (MORGAN et al., 2006).

Devido a variações físico-químicas da água de coco e disponibilidade de frutos em estágios ideais, elaborou-se um meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP[®], ACP Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil), caracterizado pela padronização e estabilização da água de coco por meio de um processo de desidratação e subsequente formulação de meios de conservação específico para células e tecidos (SALGUEIRO et al., 2002), mantendo os mesmos constituintes bioquímicos da água de coco *in natura*, tendo a vantagem de ser facilmente estocado, transportado e preparado (VIVEIROS et al., 2010).

A água de coco em pó tem como insumo básico o líquido endospermico do coco que, em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento e supera a toda e qualquer outra tecnologia de conservação, uma vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. Daí a grande vantagem da água de coco em pó, uma vez processada, não modifica sua composição até sua utilização, garantindo um padrão confiável (PINTO et al., 2015).

Por ser uma solução estéril, ligeiramente ácida, composta de gorduras neutras, além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo, a água de coco fornece os nutrientes necessários para manter a sobrevivência e viabilidade dos gametas masculinos e femininos criopreservados (CARVALHO et al., 2006).

De acordo com Cezar et al. (2015), estudos realizados com gametas de várias espécies animais mostraram que a água de coco verde (endosperma da *Cocosnucifera*L.) pode ser usada com sucesso na preservação dos folículos préantrais de caprinos e ovinos, sêmen de ovelhas, porcos e humanos. Essa solução foi testada também como meio de conservação e maturação de oócitos imaturos de ovários bovino e como meio de cultura para embriões de camundongos e bovinos (SILVA et al., 2010).

2.6 Análise da viabilidade

O estudo da viabilidade celular após a descongelação embrionária é uma forma de se avaliar *in vitro* os métodos de criopreservação (GUAITOLINI et al., 2012). Dentre as técnicas para avaliação *in vitro* pós-descongelação podemos citar o uso de corantes fluorescentes, os quais coram células vivas e mortas (HARDY, 1997).

A utilização de sondas fluorescentes por meio de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo são métodos que vêm sendo utilizados amplamente nos últimos anos em diversas espécies (RIJSSELAERE et al., 2005; SILVA et al., 2012).

Sondas fluorescentes que apresentam afinidade pelo DNA têm sido atualmente utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática das células espermáticas (SILVA e GADELLA, 2006).

De acordo com HARDY. (1997) o uso de corantes fluorescentes para a análise de viabilidade apresenta superioridade sobre as técnicas de microscopia.

O método utilizado pela associação de diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídeo (IP) pode ser utilizado para avaliar tanto o estado fisiológico e a integridade da membrana (TSAI et al., 2010).

As células mortas são permeáveis ao iodeto de propídeo (IP) e se coram em vermelho ou laranja. Este método permite uma boa estimativa da porcentagem de células mortas, contudo pode haver uma subestimativa das células mortas se estas estiverem circundadas por células vivas impedindo que o IP penetre nas células (PRYOR et al., 2011). O IP serve apenas para identificar as células não viáveis, uma vez que só pode penetrar as membranas nucleares danificadas e manchas de ácidos nucleicos (THAI et al., 2010). Outros autores como SHU et al. (2009) e ABEEL e STEIRTEGHEM (2000) também relatam o sucesso na análise com a utilização de (IP) para avaliar membrana plasmática íntegra e lesada. Por outro lado, o FDA pode penetrar as membranas deócitos e ser hidrolisado pela esterase intracelulares para o composto fluorescente polar fluoresceína que se acumula nas células íntactas (TSAI et al., 2008), uma vez detectada a presença de esterases ativas, se coram em azul e a coloração final conferida é verde claro (BRAMER et al., 2015).

O grupo acetil das moléculas de FDA confere a capacidade de penetrar nas membranas celulares, por difusão passiva. 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. No entanto, em células mortas, como há uma desorganização das membranas, a penetração pelas moléculas de FDA não é seguida pela clivagem das ligações éster que as ligam aos grupos acetato e, portanto, não se verifica o brilho característico da fluoresceína (BRAMER et al., 2015).

365 **REFERÊNCIAS**

366

367 ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FOLCH, J. Performance of
368 a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in
369 ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 81–87, 2002.

370

371 ALMINANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos?
372 **Animal Reproduction**. v.12, p.418-427, 2015.

373 BLUME, H., MARQUES JR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e
374 criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução**
375 **Animal**v.18, p.97-104, 1994.

376 CARNEIRO, G. F.; SILVA, S. V.; MEDEIROS, L. R. D.; GOMES NETO, O. C.;
377 PROCÓPIO, O. C. S. Utilização Prática de Sêmen Congelado. In: **I Simpósio**
378 **Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos**, 2007.

379 CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; Jr, G.A.M. Água-de-coco:
380 Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Ciências agrárias**, v. 27, p.
381 437-452, 2006.

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

386

387 DU,J.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K.
388 Humanspermatozoaglycerolpermeabilityandactivationenergydeterminedbyelectroparam
389 agneticresonance. **BiochimBiophys Acta**. P.1-11,1994.

390 EMILIANI, S.; VAN DEN BERG, M.; VANNIN, A.S.; BIRAMANE, J.; ENGLERT,
391 Y. Comparação do Etilenoglicol, 1,2 propalenediol e glicerol para criopreservação lenta
392 de zigotos, 4-celulas embrionárias e blastocistos de ratos. **Human Reproduction**.v.15,
393 p.905-910, 2000.

394 FABJAN-SOUSA, J.M.G.; LOCATELY, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; TOUZE,
395 J.L.; PERRAU, C. In vitro production of small ruminant embryos: late improvements
396 and further research. **Theriogenology**, v.81, p.1149-1162, 2014.

397

398 FAHY, G.M.; LEVY, D.I.; ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical
399 properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**. v.24.
400 p.196 –213.1987.

401

402 FREITAS V. J. F.; ANDRADE M. L. L.; CAJAZEIRAS, J. B.; LUZ J. V. Produção *in*
403 *vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta**
404 **Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 781-786, 2007.

- 405 GALIZA, M. **Água de coco em pó facilita a difusão dos benefícios do produto “in**
406 **natura”**. In: <http://memoria.cnpq.br/noticias/100504.htm> , acesso em 12 de novembro de
407 2016.
- 408 GARNER, L.D.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of
409 spermatozoal and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**. v.34, p.127-
410 138,1986.
- 411 GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; In: __. **Biotécnicas**
412 **Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. Ed. – São Paulo: Roca, 2008.
- 413 GUNASENA, K.T.; LAKEY, J.R.T.; VILLINES, P.M.; CRITSER, E.S.; CRITSE, J.K.
414 Allogeneic and Xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic
415 mice. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 226-231, 1997.
416
- 417 HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
418 integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-
419 352, 1990.
- 420 JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by
421 simultaneous staining with fluorescein diacetatepropidium iodide. **Journal Histochemic**
422 **and Cytochem**.v.33, p. 77-79, 1985.
- 423 LIMA, G.L.; COSTA, L.L.; CAVALCANTI, D.M.; RODRIGUES, C.M.; FREIRE,
424 F.A.; FONTENELE-NETO, J.D. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles
425 using a powdered coconut water (ACP)-based medium. **Theriogenology**.v.71, p. 146-
426 152, 2010.
427
- 428 MANDAWALA, A.A.; HARVEY, S.C.; ROY, T.K.; FOWLER, K.E. Cryopreservation
429 of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospect. **Theriogenology**.
430 v.86, p.1637-1644, 2016.
- 431 MARIA, A.N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de
432 Piracanjuba. **Dissertação** apresentada à Universidade Federal de Lavras
433 LAVRAS, MINAS GERAIS – BRASIL, 2005.
434
- 435 MARQUES, A. L. V.; SILVA, O. P. A água de coco e o cultivo de cogumelos. **Revista**
436 **Brasileira de Patologia Clínica**, v.17, p.7-9, 1982..
- 437 NUNES, J.F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes**. 1 ed.
438 Fortaleza. Tecnograf, 2010.
439
- 440 OHASHI, O.M.; BARUSELLI, P.S. Biotecnica da reprodução animal aplicadas em
441 bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.
442 **Biotecnica aplicadas a reprodução animal**. Editora Roca, 2ª edição, p.105-123, 2008.
443

- 444 PRYOR, J.H.; LOONEYA, C.R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D.C.; LONGC, C.R.
445 Cryopreservation of invitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation
446 and post - thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.
447
- 448 PADILHA, L.C. Maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas santa inês submetidas a
449 sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia. **Dissertação**
450 **apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias** – Unesp, Câmpus de
451 Jaboticabal (Reprodução Animal). 2012.
452
- 453 PAULA, N.R.O.; TEIXEIRA, D.I.A.; LOPESJUNIOR, E.S.; FREITAS, V.J.F.;
454 RONDINA, D. Responsiveness to progestagen-eCG-Cloprostenol treatment in goat
455 food restricted for long period and refed. **Reproduction in Domestic Animals**.v.40,
456 p.108-110, 2005.
457
- 458 PEGG, D.The history and principles of cryopreservation.**Seminars in Reproductive**
459 **Medicine**.v.20, p.5-13, 2002.
- 460 SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation
461 by slow freezing and vitrification.**Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.
- 462 SILVA, A.E.; CAVALCANTE, L.F.; RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. The
463 influence of powdered coconut water (ACP-318[®]) in *in vitro* maturation of
464 canine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**.v.45, p.1042-1046, 2010.
- 465 SMITH, J.F.; TERVIT, H.R.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A. Effect of aspiration
466 system on the recovery and development of sheep follicular oocytes.**Proceedings of**
467 **Australian Society for Reproduction Biology**, v. 26, p.16, 1994.
468
- 469 SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos
470 protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de**
471 **Reprodução Animal**. v.38, p.98-102, 2014.
472
- 473 STEPONKUS, P.L.; MYERS, S.P.; LYNCH, D.V.; PITT, R.E.; LIN, T.T.;
474 MACINTYRE, R.J. **Cryobiology of Drosophilanelanogaserembryos**. In: Lee RE,
475 Denlinger DL, editors. *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall; p. 408-423,
476 1991.
477
- 478 TSAI, S.; SPINIKGS, E.; KUO, F.W.; LIN, N.C.; LIN,C. Use of adenosine triphosphate
479 assay, and simultâneosataining with flurescein diacetate and propidium iodide, to avalue
480 the effects of cryoprotectants on hard coral (Echinopora spp.)
481 oocytes.**Theriogenology**.v.73, p.605-611, 2010.
482
- 483 UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.;
484 SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial
485 insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c).
486 **Theriogenology**, v.77, p.1959-1963, 2012.
487
- 488 VAJTA, G. Vitrification in humam and domestic animals embryology: work in
489 progress. **Reproduction and Fertility**. V.25, p.719-727, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de oócitos é uma biotecnologia reprodutiva que permite a criação de bancos de germoplasma no qual os gametas femininos podem ser conservados por tempo indeterminado. Essa biotecnologia pode ser utilizada com sucesso em casos de infertilidade, animais de alto padrão genético e até mesmo em animais em risco de extinção.

PERSPECTIVAS

A água de coco em pó (ACP-407[®]) poderá se constituir um eficiente meio adicionado aos crioprotetores convencionais capaz de criopreservar e manter a sobrevivência de e viabilidade de oócitos caprinos, tornando-se mais uma alternativa mercadológica para a reprodução animal, uma vez que apresenta baixo custo. Contudo ainda são necessários mais estudos a cerca de uma curva de criopreservação específica para oócitos caprinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, A.R.B.; LIOW, B.S.L.; RAHMAN, A.N.M.A.; CHAN, A.W.K. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, v.70, p.765–771, 2008.
- ALBENZIOA, M.; SANTILLOA, A.; AVONDO, M.; NUDDAC, B.A.; CHESSA, S.; PIRISI, D.A.; BANNIF, E.S. Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health. **Small Ruminant Research**, v.135, p.3–12, 2016.
- ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FOLCH, J. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, p. 81–87, 2002.
- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da célula**. 5ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, 2010.
- ALMINANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos? **Animal Reproduction**. v.12, p.418-427, 2015.
- ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; BELETTI, M.E.; LÚCIO, A.C.; JACOMINI, J.O. Criopreservação de folículos pré-antrais caninos com glicerol e etilenoglicol. **Archives of Veterinary Science**, v.18, p.08-13, 2013.
- BALDASSARRE, H.; CASTRO, T.E. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 35, n. 1-2, p. 145-150, 1994.
- BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; MATOS, D. G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v.45, p.707-717, 1996.
- BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**.v.57, p.275-284, 2002.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. 2th ed. FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 2011.
- BHATI, M.H.; YAQOUB, S.H.; KHAN, F.A.; WAHEED, S.M.; SHARMA, V.; VAJTA, G.; GANAI, N.A.; SHAH, R.A. Open pulled straw vitrification of in vitro matured sheep oocytes using different cryoprotectants. **Small Ruminant Research**. v. 112, p.136–140, 2013.
- BIANCHINI, B.D.; MATOS, A.J.; PIAS, G.M.; CHAGAS, R.A.; LOPES, P.R.S.; CORRÊA, G.F. Caracterização do consumidor da carne ovina na cidade de dom pedrito – RS. **Anais do VII Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão Universidade Federal do Pampa**. 2015.

- BLUME, H., MARQUES JR, A. P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v.18, p.97-104, 1994.
- BRAMMER, S.P.; TONIAZZO, C.; POERSCH, L.B. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-8, 2015.
- CARNEIRO, G. F.; SILVA, S. V.; MEDEIROS, L. R. D.; GOMES NETO, O. C.; PROCÓPIO, O. C. S. Utilização Prática de Sêmen Congelado. In: **I Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos**, 2007
- CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; Jr, G.A.M. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Ciências agrárias**, v. 27, p. 437-452, 2006.
- COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. **A Célula: uma abordagem molecular**. Editora Artmed, Porto Alegre, RS, 2007.
- CORDEIRO M.F. **Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal**. 2006. 59f. Tese (Doutorado) –Programa de Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CROWE, J.; CROWE, L.; MOURADIAN, R. Stabilization of biological membranes at low water activities. **Cryobiology**, v. 20, p. 346-356, 1983.
- CRUZ, B.C.; SANTOS, C.L.; AZEVEDO, J.A.G.; SILVA, D.A. Avaliação e composição Centesimal e as características físico químicas da carne de ovinos. **Pubvet**, v.10, p.147-162, 2016.
- DE SANTIS, L.; CINO, I.; RABELLOTTI, E.; CALZI, F.; PERSICO, P.; BORINI, A. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. **Reproductive Biomed Online**.v.11, p. 36-42, 2005.
- DU, J.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Human spermatozoa glycerol permeability and activation energy determined by electro paramagnetic resonance. **BiochimBiophysActa**. P.1-11,1994.
- EBNER, T.; YAMAN, C.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M.; FEICHTINGER, O. G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. **Humam Reproduction**.v.15, p.427-430, 2000.
- EBNER, T.; MOSER, M.; TEWS, G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? **ReproductiveBiomedOnline**. v.12, p.507-512, 2006.

EMILIANI, S.; VAN DEN BERG, M.; VANNIN, A.S.; BIRAMANE, J.; ENGLERT, Y. Comparação do Etilenoglicol, 1,2 propalenediol e glicerol para criopreservação lenta de zigotos, 4-celulas embrionárias e blastocistos de ratos. **HumanReproduction**. v.15, p.905-910, 2000.

ESTEVES, R.M.G.; OSORIO, J.C.S.; OSORIO, M.T.T.; MENDONÇA, G.; OLIVEIRA, M.M.; WIEGAND, M.; VILANOVA, M.S.; CORREA, F.; JARDIM, R.D. Avaliação in vivo e da carcaça e fatores determinantes para o entendimento da cadeia da carne ovina. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.16, p. 101-108, 2010.

FABJAN-SOUSA, J.M.G.; LOCATELY, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; TOUZE, J.L.; PERRAU, C. In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**, v.81, p.1149-1162, 2014.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FAHY, G.M.; LEVY, D.I.; ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**. v.24. p.196 –213.1987.

FREITAS V. J. F.; ANDRADE M. L. L.; CAJAZEIRAS, J. B.; LUZ J. V. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 781-786, 2007.

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, SP: MedVet, p. 201, 2013.

GALIZA, M. **Água de coco em pó facilita a difusão dos benefícios do produto “in natura”**. In: <http://memoria.cnpq.br/noticias/100504.htm> , acesso em 12 de novembro de 2016.

GARCÍA, B.M.; FERRUSOLA, C.O.; APARICIO, I.M.; MIRÓ-MORÁN, A.; RODRIGUEZ, A.M.; BOLAÑOS, J.M.G.; FERNÁNDEZ, L.G.; SILVA, C.M.B.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effect on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, n. 77, p.1280–1289, 2012.

GARNER, L.D.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**. v.34, p.127-138, 1986.

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.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; In: __. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. Ed. – São Paulo: Roca, 2008.
- 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.
- HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p. 205-229, 2003.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 37, p.1-55, 2014.
- JONES, K.H.; SENFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.33, p. 77-79, 1985.
- KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.62, p.1056-1065, 1998.
- 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.
- LIMA, G.L.; COSTA, L.L.; CAVALCANTI, D.M.; RODRIGUES, C.M.; FREIRE, F.A.; FONTENELE-NETO, J.D. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP)-based medium. **Theriogenology**. v.71, p. 146-152, 2010.
- MARIA, A.N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba. **Dissertação** apresentada à Universidade Federal de Lavras LAVRAS, MINAS GERAIS – BRASIL, 2005.
- MANDAWALA, A.A.; HARVEY, S.C.; ROY, T.K.; FOWLER, K.E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospect. **Theriogenology**. v.86, p.1637-1644, 2016.
- MARQUES, A. L. V.; SILVA, O. P. A água de coco e o cultivo de cogumelos. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, Rio de Janeiro, v.17, n.1, p.7-9, 1982.

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.

MOORE, K.; PERSAUD MARK, T.V.N.; TORCHIA, G. **Embriologia Básica**. 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, RJ, 2000.

MORGAN, C. A., HEERMAN, N., WHITE, P.A., VESEY, G. Preservation of micro organisms by drying; a review. **Journal of microbiological methods**, v.66, p.183-193, 2006.

MOURA, B.V.C.S.; PENNA, L.F.V.S.; LOPES, M.H.C.; SOARES, W.; SOUZA, J.H.K.L. Fertility preservation methods literature review, **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.13, p.56-64, 2016.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

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

OHASHI, O.M.; BARUSELLI, P.S. Biotecnica da reprodução animal aplicadas em bubalinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotecnica aplicadas a reprodução animal**. Editora Roca, 2ª edição, p.105-123, 2008.

OLIVEIRA, C.G.; OLIVEIRA, B.M.M.; CELEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.37, p.23-28, 2013.

PADILHA, L.C. Maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia. **Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal (Reprodução Animal)**. 2012.

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

PEGG, D. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**. V.20, p.5-13, 2002.

PINTO, A.C.L.; VIEIRA, M.R.; LIMA, D.L.F.; ALVES, F.A.F.; SANTOS, R.L. Água de coco em pó como suplemento hidroeletrólítico e energético para atletas. **Revista Brasileira de Medicina e Esporte**, v.21, p.12-18, 2015.

PRENTICE, J.R.; ANZAR, M. Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics. **Lume**, v.11, p.37-43, 2011.

- PRYOR, J.H.; LOONEYA, C.R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D.C.; LONGC, C.R. Cryopreservation of invitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post - thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.
- RIGGS, R.; MAYER, J.; DOWLING-LACEY, D.; CHI, T.F.; JONES, E.; OEHNINGER, S. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. **Fertility and Sterility**, 93 109–115,2010.
- RIJSSELAERE, T.; SOOM, V.A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**. v.64, p.706-719, 2005.
- SALGUEIRO, C.C.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L.Utilization of extenders based on coconut water *in natura* and powder on the does artificial insemination at fixed time. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 96-98, 2002.
- SANCHES, B.V.; LUNARDELLI, P.A.; TANNURA, J.; CARDOSO, B.L.; PEREIRA, M.C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A.C.; ARNOLD, D.R.; SENEDA, N.N. A new directtransferprotocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v.85, p.1147-1151, 2016.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification.**Reproduction**, v.141, n.1, p.1-19, 2011.
- SAMAKE, S.; AMOAH, E.A.; MOBINI, S.; GAZAL, O.; GELAYE, S.In vitro fertilization of goat oocytes during the nonbreeding season.**Small Ruminant Research**. v.35,p.49–54, 2000.
- SEKI, S.; KOUYA, T.; TSUCHIYA, R.; VALDEZ J.R, D.M.; JIN, B.; KOSHIMOTO, C.; KASAI, M.; EDASHIGE, K. Cryobiological properties of immature zebrafish oocytes assessed by their ability to be fertilized and develop into hatching embryos. **Cryobiology**.v.62, p.8-14, 2011.
- 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, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm.**Theriogenology**.v.77, p.1722-1726, 2012.
- SHU, Y.; WATT, J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer.**Fertility and Sterility**, v.91, n.2, 2009.
- SMITH, J.F.; TERVIT, H.R.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A. Effect of aspiration system on the recovery and development of sheep follicular oocytes.**Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 26, p. 16, 1994.

SOUZA, A.L.P.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.38, p.98-102, 2014.

STEPONKUS, P.L.; MYERS, S.P.; LYNCH, D.V.; PITT, R.E.; LIN, T.T.; MACINTYRE, R.J. **Cryobiology of Drosophilanelanogaserembryos**. In: Lee RE, Denlinger DL, editors. *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall; p. 408-423, 1991.

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

TSAI, S.; RAWSON, D.M.; ZHANG, T. Studies on cryoprotectant toxicity to early stage zebrafish (*danio rerio*) ovarian follicles. **CryoLetters**. v.29, p.477-483, 2008.

TSAI, P.S.; HAEFTEN, V.T.; GADELLA, B.M. Preparation of the cortical reaction: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. **Biology of Reproduction**. v.84, p.327-335, 2011.

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 227-238, 1996.

UCHOA, D.C.; SILVA, T.F.P.; CARDOSO, J.F.S.; MOTA FILHO, A.C.; JUCÁ, R.P.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). **Theriogenology**, v.77, p.1959-1963, 2012.

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

VAJTA, G. Vitrification in human and domestic animals embryology: work in progress. **Reproduction and Fertility**. V.25, p.719-727, 2013.

VAN DEN ABBEEL, E.; VAN STEIRTEGHEM, A. Zona pellucidadamaga to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in-vitro viability. **Human Reproduction**, v.15, p.373-378, 2000.

VIVEIROS, A.T.M.; NASCIMENTO, A.F.; ORFÃO, L.H. Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochiloduslineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. **Theriogenology**, 74, p.551-556. 2010.

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

ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, n.1, p.66-72, 2010

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética e Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universidade Federal do Piauí - Teresina, Piauí - Brasil - CEP: 64049-000
 Telefone (88) 3213-0734 - e-mail: comite@ufpi.edu.br

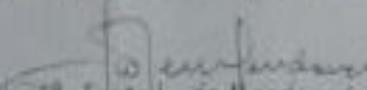


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto Intitulado "Qualidade de óocitos caprinos após criopreservação em meio alternativo contendo ACPE" protocolo nº 108/15, sob a responsabilidade de **NEY RÔMULO DE OLIVEIRA PAULA**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.895, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/11/2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Fevereiro/ 2016
Espécie/Linhagem	Caprino/ Sem predileção
Nº de Animais	60
Peso/ Idade	36 Kg/ Pubere
Sexo	Fêmeas
Origem	Abatedouros locais da Região Metropolitana de Teresina-PI.

Teresina, 27 de Novembro de 2015.


 Prof^a. Ivete L. de Mendonça
 Coordenadora do Comitê de Ética em Experimentação Animal - UFPI

ANEXO B – Ficha para a avaliação da viabilidade dos oócitos

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE OÓCITOS ATRAVÉS DE SONDAS FLUORESCENTES

Grupo: _____

Data: __/__/____

Classificação (Grau I)	FDA + IP	
	Membrana íntegra	Membrana Lesionada

Classificação (Grau II)	FDA + IP	
	Membrana íntegra	Membrana Lesionada

Classificação (Grau III)	FDA + IP	
	Membrana íntegra	Membrana Lesionada

Obs.: _____

