



Liofilização celular e sua aplicação na reprodução animal

Lyophilization and its application in animal reproduction

A.B. Medeiros, R.A. Oliveira, I. Pivato¹

Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

¹Correspondência: pivato@unb.br

Resumo

A liofilização ou criodesidratação é um método alternativo de preservação celular. Ela pode auxiliar a preservação de células espermáticas, pois facilita o armazenamento e o transporte nacional ou internacional, uma vez que dispensa o uso de nitrogênio líquido para armazenamento. A liofilização pode manter espermatozoides viáveis por vários anos, quando armazenados a 4°C, e por horas, quando em temperatura ambiente. Além de dispensar o uso do nitrogênio líquido, ainda tem a vantagem de permitir que os espermatozoides sejam separados em muitas alíquotas, para uso posterior, mesmo quando o sêmen acondicionado em palhetas é liofilizado, o que pode simplificar e ampliar o uso de espermatozoides liofilizados nas técnicas de reprodução assistida. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo abordar a importância da liofilização como método de preservação espermática para a reprodução animal, mediante discussão sobre o histórico da biotécnica, os processos físicos envolvidos, os danos decorrentes, sua aplicação, bem como suas vantagens e limitações.

Palavras-chave: bovino, criodesidratação, criopreservação, espermatozoides, reprodução.

Abstract

Lyophilization, or freeze-drying, is an alternative method of cellular preservation. This practice can assist the preservation of sperm cells, facilitating the storage and also the domestic or international transport, by eliminating the need of liquid nitrogen for storage. Lyophilization can maintain sperm viable for several years when stored at 4°C, and for hours at room temperature. In addition to exempting the use of liquid nitrogen, also has the advantage of allowing sperm to be separated into many aliquots for later use, even when the sperm stored in straws is lyophilized. What you can simplify and expand the use of freeze-dried spermatozoa in assisted reproduction techniques. Therefore, this paper aimed to describe the importance of lyophilization as a method of sperm preservation for animal reproduction, discussing the biotech history, the physical processes involved, the damages arising, the application, as well as their advantages and limitations.

Keywords: bovine, cryopreservation, freeze-drying, reproduction, sperm.

Introdução

Diante da atual necessidade de desenvolvimento biotecnológico e científico, a preservação e a manutenção de materiais biológicos vêm ganhando destaque no cenário mundial. Há vários métodos de preservação celular, entretanto não há um método ideal ou universal que garanta a perfeita conservação das características morfológicas, fisiológicas e genéticas do material biológico.

Para conservação de células espermáticas, destacam-se a refrigeração, a criopreservação e a liofilização, sendo esta última um método alternativo, que ainda não se encontra disponível comercialmente (Martins et al., 2007).

Apesar de o sêmen de muitos mamíferos ser criopreservado por congelamento e usado para produção de prole tanto por via inseminação artificial (IA) quanto por fertilização *in vitro* (FIV), a liofilização tem sido proposta como um método alternativo para preservação de sêmen, visto que é uma técnica utilizada para conservação de alimentos, medicamentos, vacinas, materiais biológicos e plasma sanguíneo (Hochi et al., 2011).

Nos métodos convencionais de criopreservação, existe a dependência do nitrogênio líquido para manter a viabilidade dos gametas, demandando cuidados em relação ao armazenamento e ao transporte. A liofilização poderia ser muito útil, por não depender do nitrogênio líquido, e os espermatozoides liofilizados poderiam ser armazenados a 4°C, durante cinco anos ou mais, com manutenção da fertilidade espermática, e transportados ou mantidos por até três meses em 24°C, sem qualquer necessidade de nitrogênio líquido ou gelo seco (Kaneko e Serikawa, 2012a, b).

Entretanto, os estudos com células espermáticas não apresentaram resultados satisfatórios comercialmente, pois há a necessidade de combinar a liofilização à técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para viabilizar o desenvolvimento embrionário (Keskintepe et al., 2002). A ICSI, por sua



vez, ainda apresenta baixas taxas de desenvolvimento embrionário na espécie bovina, mesmo quando se utiliza espermatozoides não liofilizados (Gómez et al., 1998).

O objetivo desta revisão é abordar a importância da preservação de materiais biológicos, em especial de espermatozoides, por meio da liofilização. Para tanto, são apresentados o histórico, o processo físico envolvido, os danos decorrentes do processo, sua aplicação, suas vantagens e, por fim, suas limitações.

Histórico da liofilização

Liofilização: diversos produtos

A liofilização, criodesidratação ou congelamento a seco é uma forma alternativa de preservação celular. Pode ser definida como o processo de secagem de uma substância congelada, no qual a maior parte da água é removida por sublimação (Martins, 2006).

Historicamente, o primeiro produto liofilizado surgiu em 1911, com o vírus da raiva (Terroni et al., 2011). Porém, a liofilização só atingiu a escala industrial durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945). Os Estados Unidos da América investiram centenas de milhões de dólares em inúmeras possibilidades de desenvolvimento de substitutos do sangue e de plasma sanguíneo, para o tratamento dos soldados feridos nos campos de batalha que requeriam transfusões de sangue, pois não havia quantidade suficiente de sangue fresco disponível (Kumar et al., 2011).

A indústria farmacêutica, na década de 1950, desenvolveu medicamentos liofilizados, como antibióticos à base de penicilina (Kumar et al., 2011). Paralelamente ao surgimento das penicilinas liofilizadas, pesquisas acerca da liofilização de peptídeos, proteínas, anticorpos, enzimas e hormônios foram sendo aprofundadas e, posteriormente, comercializadas para fins terapêuticos. Desde então, surgiram as vacinas liofilizadas, os antibióticos e também as vitaminas (Terroni et al., 2011).

A partir da década de 1960, surgiram alimentos liofilizados no mercado, inclusive os fornecidos aos astronautas em missão no espaço (Adams, 2002).

A revolução da biotecnologia, na década de 1990, levou ao aumento da demanda por produtos liofilizados, bem como de pesquisas mais especializadas no campo da liofilização (Kumar et al., 2011). Desde essa época, a técnica foi se expandindo para outros campos de pesquisa, como o da reprodução.

Liofilização de células espermáticas

A ideia de realizar a liofilização em células espermáticas surgiu em meados de 1949, quando um grupo de pesquisadores noticiou que 50% dos espermatozoides de galináceos liofilizados recuperaram sua motilidade após a reidratação, entretanto a fertilidade nunca fora determinada. Além de estudos com espermatozoides de galináceos, houve também, na época, tentativas com espermatozoides humanos (Hochi et al., 2011).

Em 1992, Katayose et al. relataram que núcleos de espermatozoides liofilizados de camundongos e humanos retinham sua habilidade de se desenvolver em pró-núcleo e sintetizar DNA, mesmo quando microinjetados após seis meses de estocagem.

Apesar de alguns relatos de sucesso em relação à motilidade após reidratação de espermatozoides de galináceos, a reprodutibilidade era sempre um tema questionável. Em 1998, foi relatada pela primeira vez a possibilidade de se liofilizar sêmen de camundongo sem perder a capacidade de reprodutibilidade e de desenvolvimento embrionário e sem que houvesse necessidade de motilidade espermática ou membrana plasmática totalmente íntegra. Isso só foi possível por meio da combinação da liofilização com a técnica de ICSI em ovócitos maduros. Essa teoria foi comprovada ao se microinjetar apenas a cabeça dos espermatozoides de camundongos, resultando em desenvolvimento embrionário (Wakayama e Yanagimachi, 1998).

Kusakabe et al. (2001) demonstraram que era possível manter a integridade cromossomal de espermatozoides de camundongos liofilizados com EGTA [Ethyleneglycol-bis (β -aminoethylether) - N,N,N',N' -tetra aceticacid], o que mostrou que quase 100% dos ovócitos microinjetados apresentaram cariótipo normal. Comprovou-se, portanto, que o núcleo espermático era tolerante à liofilização, e isto se atribuiu às ligações das pontes de dissulfeto com as protaminas, que são as ligações presentes nos espermatozoides maduros, conhecidas por serem bastante estáveis.

Kaneko et al. (2003) observaram que outro fator também interferia na integridade cromossomal: o valor do pH da solução de liofilização. Os resultados em relação à integridade cromossomal e à habilidade de desenvolvimento embrionário eram melhores quando os espermatozoides eram liofilizados em meio levemente alcalino (pH entre 8,0-8,2).



Liofilização de células espermáticas bovinas

O primeiro estudo com espermatozoides bovinos liofilizados e reidratados foi descrito por Leidl (1954), no qual os espermatozoides apresentaram-se imóveis e com algumas alterações morfológicas, como maior porcentagem de cabeça amorfa ou separada. Apesar de vários relatos anteriores, foi em meados de 1990 que houve uma revolução nos sistemas de conservação de gametas masculinos, ao se sugerir que não havia necessidade de que os espermatozoides estivessem vivos no sentido convencional para resultar em um desenvolvimento embrionário normal. Os avanços nas pesquisas do campo da liofilização espermática bovina estiveram estagnados até o surgimento da combinação da técnica de ICSI na utilização do sêmen liofilizado (Hochi et al., 2011). Comprovou-se que era possível realizar a fecundação com os espermatozoides liofilizados, os quais não possuíam boa motilidade, por meio dessa biotécnica (Kimura e Yanagimachi, 1995), visto que, na ICSI, a microinjeção de espermatozoides é feita diretamente dentro dos ovócitos. Keskinetepe et al. (2002) realizaram experimentos combinando a técnica de liofilização com a ICSI e comprovaram a capacidade de espermatozoides bovinos suportarem o processo de liofilização e gerarem desenvolvimento embrionário normal.

Posteriormente, Martins et al. (2007) realizaram estudos inéditos com espermatozoides liofilizados de bovinos da raça Nelore no Brasil, nos quais foram comparados diferentes meios para a liofilização. Pela primeira vez, conseguiram demonstrar que a solução de EGTA, bastante utilizada em camundongos, também era eficiente para preservar núcleo, acrossomo e mitocôndrias de espermatozoides bovinos. Nesse estudo, ao avaliarem as taxas de blastocistos após ICSI com espermatozoides liofilizados bovinos, provaram que tanto a solução de EGTA quanto o meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) e trealose eram eficientes.

Já existem estudos com várias espécies, com espermatozoides liofilizados em diferentes soluções de proteção, e as melhores taxas de fecundação e formação embrionária foram obtidas utilizando-se trealose e EGTA, associadas à ICSI (Martins et al., 2008). Choi et al. (2011) obtiveram produção de embriões e o nascimento de um potro com o uso de espermatozoides equinos liofilizados na ICSI. Kaneko e Serikawa (2012b) também conseguiram nascimentos em ratos ao utilizarem sêmen liofilizado e mantido por cinco anos a 4°C.

Princípios do processo de liofilização

Diferentemente da desidratação convencional, que depende do fenômeno de evaporação, a liofilização baseia-se no fenômeno da sublimação, ou seja, da direta transição do estado sólido (gelo) para o estado gasoso, sem passar pelo estado líquido. Para evitar o estado líquido na liofilização, é necessário gerar um vácuo durante o processo, mantendo a temperatura suficientemente baixa e à baixa pressão atmosférica. Além disso, é necessário fornecer suficiente energia (calor latente) dentro do equipamento, simultaneamente, para compensar a transição de fase (Hochi et al., 2011).

O processo de liofilização consiste em três etapas principais: o congelamento, a desidratação primária e a desidratação secundária. A etapa de congelamento é a mais crítica, pois a microestrutura formada durante o processo é que determina a qualidade do produto final (Kumar et al., 2011). Nas três etapas supracitadas, destacam-se os principais processos: congelamento, sublimação, dessorção (processo no qual uma substância é liberada em determinada superfície), bombeamento de vácuo e condensação (Liu et al., 2008).

Congelamento

O congelamento diminui a atividade química por redução da movimentação molecular. Para o processo de liofilização, inicialmente se depositam os frascos com espermatozoides em uma caixa de isopor, onde são mantidos a 5 cm da superfície líquida do nitrogênio e, então, são pré-congelados em vapor de nitrogênio a cerca de -80°C (Simões, 2012).

Desidratação primária

Simultaneamente ao congelamento, gera-se vácuo no interior do equipamento, e é também fornecido ao produto congelado grande fonte de energia (calor latente) sob baixa pressão atmosférica, a fim de manter a temperatura acima da temperatura crítica, resultando no produto sublimado. O aumento da temperatura acima desse nível resulta em defeitos de processamento indesejáveis durante a liofilização, enquanto a diminuição da temperatura abaixo do nível pode resultar em inaceitável lentidão no processo de secagem (Kramer et al., 2009).

Durante esse processo de sublimação, aproximadamente 90% do total de água do produto são removidos, constituindo-se quase totalmente de “água livre” (Hochi et al., 2011). A remanescente quantidade de água, chamada de “água ligada”, será removida na desidratação final, ou secundária (Hochi et al., 2008).

Conforme o gelo sublima, formam-se poros no interior do produto que está sendo desidratado. O



objetivo da desidratação primária é encontrar condições de operação para o processo de liofilização, minimizando a duração dessa etapa pela maximização da velocidade de remoção da água sublimada na interface. Isto deve ser realizado sem que ocorra o derretimento da camada congelada (Boss et al., 2004).

Desidratação secundária

A remanescente quantidade de “água ligada” do processo de sublimação será removida durante essa etapa da liofilização. A “água ligada” é que limita a integridade estrutural do produto, portanto qualquer interação físico-química entre a água e a matéria seca tem de ser quebrada antes de a água ser completamente removida no processo chamado dessorção, o que requer mais energia que a necessária para o processo de sublimação. Nessa etapa, uma elevada temperatura, sob baixa pressão atmosférica (inferior àquela fornecida na desidratação primária), é fornecida ao produto sublimado para remover a umidade sublimada e resultar no produto liofilizado final (Hochi et al., 2008). A desidratação secundária inicia-se, teoricamente, quando todo o gelo foi removido por sublimação (Boss et al., 2004).

Função e integridade dos espermatozoides após a liofilização

De acordo com resultados obtidos por Martins et al. (2007), o componente celular mais afetado pela liofilização foi a membrana plasmática dos espermatozoides. Além da membrana plasmática, a organização dos microtúbulos foi comprometida na maioria dos tratamentos realizados no experimento. E isto explicaria a ausência/reduzida motilidade dos espermatozoides liofilizados, pois são os microtúbulos as estruturas responsáveis pela movimentação espermática. Por outro lado, o acrossoma e as mitocôndrias foram bem preservados em todos os tratamentos. Nos tratamentos com trealose, os acromossomas apresentaram-se mais intactos que nos outros tratamentos. O processo de liofilização pode afetar negativamente tanto características estruturais como funcionais do espermatozoide (Hochi et al., 2011).

Meios protetores no processo de liofilização

Substâncias núcleo-protetoras

Os primeiros protetores nucleares descritos para a liofilização espermática foram o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA). Atualmente são utilizados: o soro fetal bovino, a solução não fisiológica quelante de cálcio chamada EGTA, a solução de trealose 0,2M, e o TCM 199 (Martins et al., 2007).

Segundo estudos realizados por Martins et al. (2007), apesar de os microtúbulos serem mais afetados nos tratamentos com EGTA e trealose, foi nesses tratamentos que o núcleo espermático apresentou-se mais bem conservado, chegando a apresentar cerca de 95% dos espermatozoides com DNA intacto nos tratamentos com trealose 0,2M. Ou seja, o meio com trealose não é capaz de evitar os danos na membrana plasmática, mas, em compensação, é capaz de garantir a estabilidade nuclear, característica essencial para a viabilidade de espermatozoides liofilizados. O EGTA suplementado com trealose é uma associação que, quando em concentrações apropriadas, melhora a integridade do DNA espermático, mas não melhora a taxa de fertilização nem de desenvolvimento embrionário (Men et al., 2013).

Protocolo de liofilização espermática

Devido à grande dificuldade encontrada na preservação das estruturas celulares durante o processo de liofilização, ainda não há um protocolo padrão bem definido, mas estudos vêm sendo realizados a fim de melhorar os resultados de fertilização com espermatozoides liofilizados. Atenção especial é dada para a solução de liofilização, pois já é sabido que algumas substâncias são capazes de proteger o DNA espermático dos danos físicos causados pelo processo de liofilização (Hara et al., 2014). Para fins de comparação, é possível observar, na Tab. 1 abaixo, algumas das diferentes metodologias já utilizadas para liofilização espermática.

Uma solução tampão contendo Tris-HCl, EGTA e NaCl tem sido a mais utilizada nos dias atuais para a suspensão de espermatozoides e liofilização (Hara et al., 2011). Essa solução de liofilização consiste em: 10mM de Tris-HCl, 50mM de EGTA e 50mM de NaCl, com pH estabilizado em 8,0 (Hara et al., 2014). O ajuste do pH para 8,0 é feito, pois Kaneko et al. (2003) comprovaram que os resultados em relação à integridade cromossomal e à habilidade de desenvolvimento embrionário são melhores quando os espermatozoides são liofilizados em meio alcalino (pH entre 8,0-8,2).

O EGTA, por ser um agente quelante de cálcio, é essencial para prevenir a deterioração dos espermatozoides durante a liofilização e subsequente preservação a 4°C, principalmente por inibir a atividade das endonucleases (Kaneko e Nakagata, 2006).

Apesar das diferentes concentrações, soluções e até mesmo diferentes tempos utilizados, os protocolos baseiam-se em:

Tabela 1. Relação entre metodologias e tipos de células mais comumente utilizadas no processo de liofilização espermática ao longo dos anos.

Material	Metodologia	Referência
Espermatozoides bovinos	Sêmen fresco, diluído em citrato de sódio e gema de ovo, resfriado a +5°C, ao qual se adicionou glicerol, permanecendo 12h para equilíbrio. Logo após, o sêmen foi embalado em frascos e colocado no dissecador em temperatura de -79°C. O condensador do equipamento era operado com oxigênio líquido, que era completado a cada 3-4h. O tempo de dissecação foi de 4-5 dias.	Leidl, 1954
Espermatozoides bovinos	Descongelamento de uma palheta de sêmen, centrifugada em gradiente de silano-sílica (Enhance-S-plus); <i>pellet</i> ressuscitado em TALP e centrifugado novamente. O <i>pellet</i> foi diluído em DMEM com 10% de SFB, concentração de 50.000 células/mL. Aliquotas de 100µL da suspensão foram alocadas em tubos de microcentrífuga, passados em NL, sendo realocados em frascos de congelamento resfriados a -47°C e colocados em liofilizador comercial ¹ por 18h.	Keskintepe et al., 2002
Espermatozoides bovinos	Centrifugação dos espermatozoides em Percoll e TALP, adição da solução de liofilização: EGTA, trealose, exposição ao vapor de NL por 1h, contato com o NL por alguns segundos e liofilização por 12-16h.	Martins et al., 2007
Espermatozoides equinos	Centrifugação dos espermatozoides em meio leite desnatado-glucose. O <i>pellet</i> foi ressuscitado em DMEM com 10% de SFB, concentração de 50.000 células/mL. Aliquotas de 100µL da suspensão foram alocadas em frascos de 2mL e colocados em liofilizador comercial ² por 30 h.	Choi et al., 2011
Espermatozoides murinos	Espermatozoides da cauda do epidídimo, suspensos em 1mL de solução TE buffer, em temperatura ambiente por 10 min. Foram coletados 800µL do sobrenadante, que foi dividido em alíquotas com volumes de 100µL em ampolas de vidro, estas foram passadas em NL 20 s e colocadas em liofilizador comercial ³ por 4h.	Kaneko e Serikawa, 2012b

EGTA: (10mM de Tris-HCl, 50mM de EGTA e 50mM de NaCl, com pH estabilizado em 8,0); NL: nitrogênio líquido; SFB: soro fetal bovino; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's *medium*; ¹FTS Systems Inc., StoneRidge, NY; ²Advantage; Virtis Industries, Gardiner, NY, USA; TE buffer: Tris-EDTA buffer; ³Freeze-drying systems 77530, Labconco, Kansas City, MO, USA.

Centrifugação da amostra

A amostra é centrifugada em gradiente de Percoll (45-90%) para remoção de plasma seminal. Sequencialmente a amostra é ressuscitada por mais duas vezes em meio TALP (Tyrode's albumen lactate pyruvate), para capacitação dos espermatozoides e remoção residual de Percoll (Martins et al., 2007).

Adição da solução de liofilização

Após centrifugação do sêmen, remove-se o sobrenadante e é adicionada ao *pellet* de espermatozoides formado a solução de liofilização, que, na maioria dos estudos, é a solução tampão de EGTA (10mM de Tris-HCl, 50mM de EGTA e 50mM de NaCl, com pH estabilizado em 8,0; Hara et al., 2014).

Segundo experimentos realizados por Martins et al. (2007) com bovinos Nelore, considerou-se ajustar a concentração para 10×10^6 espermatozoides/100µL solução de liofilização. Em alguns estudos, a suspensão espermática (sêmen e solução de liofilização), adicionada a tubos de 1,5mL, é deixada por 10-30 min a 37°C para permitir que os espermatozoides se dispersem sobre a solução de liofilização (Kaneko e Nakagata, 2006; Martins et al., 2007). Já outros preferem ressuspender os espermatozoides na solução de liofilização por duas vezes (Hara et al., 2014).



Liofilização

Posteriormente, expõe-se a amostra em vapor de nitrogênio líquido (-80°C) por aproximadamente 1 hora, para depois imergi-la por alguns segundos em nitrogênio líquido (-196°C; Kaneko e Nakagata, 2006; Martins et al., 2007; Simões, 2012). A amostra, então, é colocada no aparelho de liofilização com a pressão previamente estabilizada e após 12-16 h de liofilização. O recipiente do produto liofilizado deve ser selado de forma adequada, seja sob vácuo ou após enchimento com gás não reativo, como nitrogênio ou argônio. Desse modo, o produto pode ser preservado, teoricamente, numa prateleira durante anos, a 4°C, ou em temperatura ambiente, quando transportado por certos períodos (Kaneko e Nakagata, 2006; Hochi et al., 2011).

Reidratação e ICSI

Imediatamente antes de realizar a ICSI, a amostra de espermatozoides liofilizados é reidratada adicionando-se aproximadamente 100µL de água ultrapura (Milli-Q®). Realizam-se novamente as avaliações de motilidade, vigor, alterações morfológicas, concentração e outras para, em seguida, centrifugar a amostra por três minutos (700 x g) e ressuspender o *pellet* com 0,5mL de meio TALP. Depois de ressuspendido, centrifuga-se novamente, e então a amostra pode ser utilizada na ICSI (Martins et al., 2007).

Considerações finais

A liofilização possui grande potencial de se tornar, no futuro, um dos melhores métodos de conservação de espermatozoides, já que possui independência de nitrogênio líquido e, conseqüentemente, de botijões de criopreservação. Isto tornaria o transporte de sêmen muito mais fácil, dispensaria os custos com aquisição e manutenção dos botijões de criopreservação e também reduziria o risco de contaminação e acidentes.

Entretanto, ainda há grande necessidade de aperfeiçoamento da técnica, especialmente na sua utilização na espécie bovina.

Referências

- Adams D. Waking up to world coffee crisis. St. Petersburg Times online, Aug. 11, 2002. Disponível em: http://www.sptimes.com/2002/08/11/Worldandnation/Waking_up_to_world_co.shtml.
- Boss EA, Filho RM, Toledo ECV. Freeze drying process: real time model and optimization. Chem Eng Process, v.43, p.1475-1485, 2004.
- Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. Reproduction, v.142, p.529-538, 2011.
- Gómez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WMC. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. Theriogenology, v.49, p.1143-1154, 1998.
- Hara H, Abdalla H, Morita H, Kuwayama M, Hirabayashi M, Hochi S. Procedure for bovine ICSI, not sperm freeze-drying, impairs the function of the microtubule-organizing center. J Reprod Dev, v.57, p.428-432, 2011.
- Hara H, Tagiri M, Hwang I, Takahashi M, Hirabayashi M, Hochi S. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. Cryobiology, v.68, p.354-360, 2014.
- Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. Mol Reprod Dev, v.75, p.890-894, 2008.
- Hochi S, Abdalla H, Hara H, Hirabayashi M. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. J Reprod Dev, v.57, p.557-563, 2011.
- Kaneko T, Nakagata N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. Cryobiology, v.53, p.279-282, 2006.
- Kaneko T, Serikawa T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. Cryobiology, v. 64, p. 211-214, 2012a.
- Kaneko T, Serikawa T. Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. PlosOne, v.7, n.4, p.e35043, 2012b.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. Biol Reprod, v.68, p.136-139, 2003.
- Katayose H, Matsuda J, Yanagimachi R. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. Biol Reprod, v.47, p.277-284, 1992.
- Keskintepe L, Pacjoleczyk G, Machnicka A, Norris K, Curuk M, Khan I, Brackette BG. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. Biol Reprod, v.67, p.409-415, 2002.
- Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. Biol Reprod, v.52, p.709-720, 1995.
- Kramer T, Kremer DM, Pikal MJ, Petre WJ, Shalaev EY, Gatlin LA. A procedure to optimize scale-up for the primary drying phase of lyophilization. J Pharm Sci, v.98, p.307-318, 2009.



- Kumar GP, Prashanth N, Kumari BC.** Fundamentals and applications of lyophilization. *J Adv Pharm Res*, v.2, p.157-169, 2011.
- Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R.** Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.98, p.13501-13506, 2001.
- Leidl MD.** The current situation of freeze drying of semen. *Vacuum*, v.4, p.48-52, 1954.
- Liu Y, Zhao Y, Feng X.** Energy analysis for a freeze-drying process. *Appl Therm Eng*, v.28, p.675-690, 2008.
- Martins CF.** Liofilização de espermatozoides bovinos: viabilidade estrutural e funcional. 2006. 110f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências Biológicas, Brasília, DF, 2006.
- Martins CF, Bão SN, Dode MN, Correa GA, Rumpf R.** Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology*, v.67, p.1307-1315, 2007.
- Martins CF, Dode MN, Junior RG, Bão SN, Sereno JRB, Rumpf R.** Conservação de espermatozoides bovinos por liofilização (freeze-drying). Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.30p. (Documentos, 216).
- Men NT, Kikuchi K, Nakai M, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Linh NV, Nguyen BX, Nagai T, Tajima A.** Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, v.80, p.1033-1044, 2013.
- Simões BDC.** Liofilização como ferramenta de preservação de sêmen humano. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Natal, RN, 2012.
- Terroni HC, De Jesus JM, Artuzo LT, Ventura LV, Santos RF, Damy-Benedetti P.** Liofilização. *Rev Cient Unilago*, v.1, p.271-284, 2011.
- Wakayama T, Yanagimachi R.** Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*,v.16, p.639-641, 1998.
-