

## VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE GATAS DA CVU/UFNT

REZENDE, Costa Luiza<sup>2</sup>; LIMA, Ana Kelen Felipe<sup>3</sup>

### RESUMO

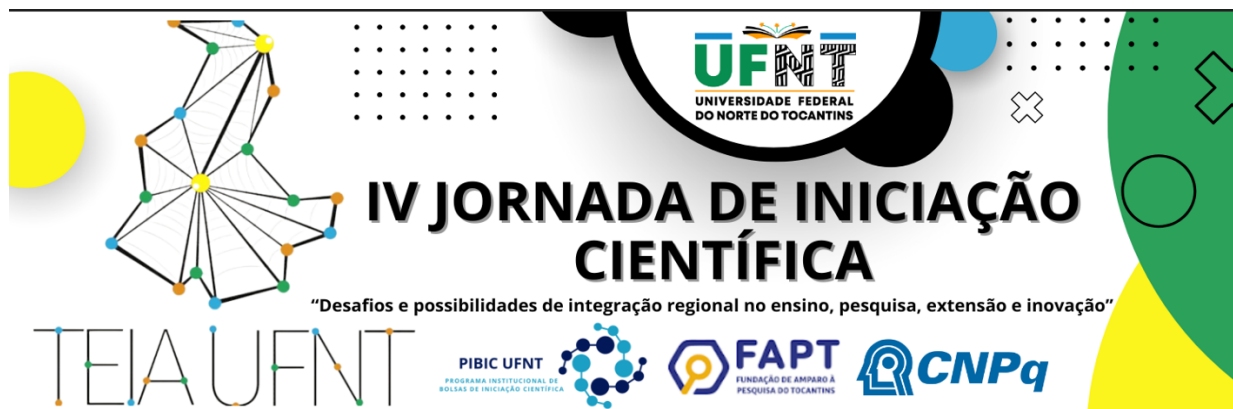
A criopreservação é uma técnica de preservação de material biológico a baixas temperaturas, garantindo viabilidade e funcionalidade celular após o reaquecimento. Dentre os métodos tem-se a vitrificação aplicada em diferentes espécies. O presente resumo teve como objetivo definir um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de gatas domésticas que mantivesse a normalidade dos folículos pré-antrais após o reaquecimento. Foram utilizados ovários coletados em cirurgias eletivas que posteriormente foram fragmentados e submetidos a diferentes combinações de crioprotetores intracelulares (DMSO e etilenoglicol) e extracelulares (ACP, sacarose e catalase). A análise histológica demonstrou que a presença de ACP extracelular associada à sacarose apresentou efeito protetor moderado sobre os folículos, enquanto a catalase não proporcionou benefícios significativos. As combinações de DMSO e etilenoglicol preservaram estágios mais avançados de desenvolvimento folicular, porém em concentrações elevadas causaram alterações morfológicas nos folículos primordiais. Conclui-se que o protocolo testado necessita de ajustes nas concentrações dos crioprotetores, podendo subsidiar o aprimoramento de técnicas de criopreservação voltadas à reprodução assistida e conservação de espécies ameaçadas.

**Palavras-chave:** Criopreservação; Crioprotetores; Conservação genética; Felinos; Folículos pré-antrais.

### I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



A pesquisa trabalhou sobre a criopreservação de tecido ovariano de gatas domésticas, visando estabelecer um protocolo de vitrificação que mantivesse a normalidade dos folículos pré-antrais após o reaquecimento. O estudo, inserido nas áreas de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, concentrou-se em reprodução animal e conservação de recursos genéticos, utilizando o gato doméstico como modelo experimental devido à sua semelhança filogenética com felinos silvestres e facilidade de manejo. As atividades incluíram coleta e preparo dos ovários, vitrificação e reaquecimento dos fragmentos, e análise da morfologia folicular, permitindo avaliar a eficácia de diferentes crioprotetores. Os resultados fomentaram o avanço das biotecnologias reprodutivas, aprimoramento de protocolos de criopreservação e formação acadêmica, fortalecendo o aprendizado prático e científico, com relevância para ensino, pesquisa e extensão.

## II. BASE TEÓRICA

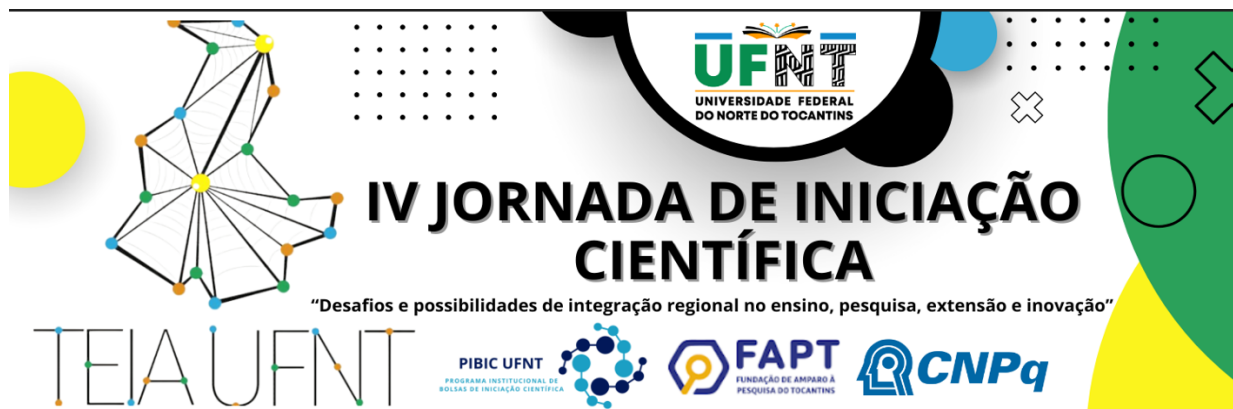
Os estudos de Santos et al. (2008), foram fundamentais para compreender os métodos de criopreservação de tecido ovariano e os efeitos dos crioprotetores sobre a viabilidade celular.

Mazur (1980) ajudou a entender os princípios biológicos do congelamento e a resposta das células às baixas temperaturas. Segundo Luvoni e Lima (2012) o uso do gato doméstico como modelo experimental e sobre a aplicação da vitrificação em tecidos ovarianos, trouxeram importantes contribuições para os felinos. A revisão de literatura também incluiu autores como, Yeoman, Lin e Gonçalves, que abordam as vantagens da vitrificação em relação à congelação lenta. Trabalhos mais recentes, como os de Amorim, Rodrigues, Silva e Gomes, contribuíram para o entendimento do papel dos crioprotetores e antioxidantes na preservação da morfologia folicular.

Assim, a metodologia foi baseada em revisões atualizadas e comparações

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



entre diferentes protocolos, adaptando as técnicas para as condições da pesquisa, objetivando melhorar a eficiência da preservação do tecido ovariano de gatas e contribuir para a conservação de espécies.

### III. OBJETIVOS

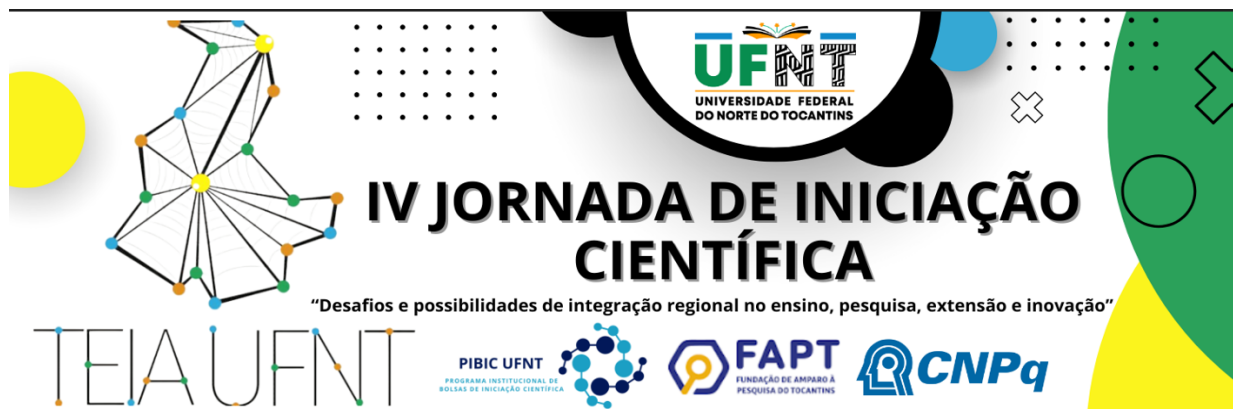
Por objetivo geral, definir um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de gatas que mantivesse a normalidade de folículos pré-antrais após o reaquecimento do tecido, analisando a morfologia e a viabilidade desses folículos. Para os objetivos específicos, envolvia a investigação do efeito da presença de ACP extracelular, sacarose (SAC) e catalase na composição da solução de vitrificação, em diferentes concentrações e a interação de diferentes combinações de crioprotetores intracelulares (DMSO E ETILENOGLICOL).

### IV. METODOLOGIA

Os ovários utilizados foram coletados de gatas submetidas a cirurgias eletivas, respeitando os princípios éticos em experimentação animal. Após a coleta, foram lavados, transportados em solução fisiológica a 4°C e fragmentados em porções de 3 x 3 x 1 mm. Tais fragmentos foram submetidos a diferentes soluções de vitrificação contendo crioprotetores intracelulares (DMSO e etilenoglicol) e extracelulares (ACP, sacarose e catalase). Uma amostra de cada par de ovários foi fixada em formol a 10% para controle fresco. As amostras vitrificadas foram armazenadas em nitrogênio líquido e, após uma semana, reaquecidas em banho-maria a 37°C, com remoção gradual dos crioprotetores em meio MEM suplementado com soro fetal bovino. A avaliação da preservação folicular foi realizada por histologia clássica, com cortes corados em PAS-hematoxilina e observados em microscópio óptico. Todos os

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Reprodução da Universidade Federal do Norte do Tocantins, Campus de Ciências Agrárias de Araguaína. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, considerando  $P < 0,05$  como nível de significância.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

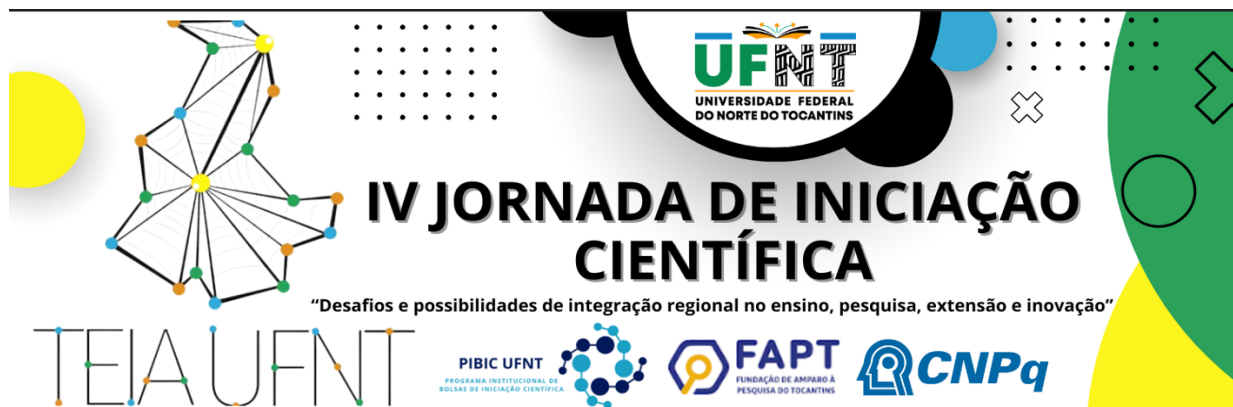
Durante a realização do experimento, foi possível observar que o processo de vitrificação e reaquecimento, desencadeia diferentes respostas morfológicas nos folículos pré-antrais conforme a composição das soluções testadas. A presença de ACP extracelular associada à sacarose apresentou efeito protetor moderado, contribuindo para a preservação da morfologia folicular após o reaquecimento. Em contrapartida, a adição de catalase não promoveu benefícios significativos, indicando que sua concentração ou associação com os demais componentes pode ter sido ineficiente. As combinações de DMSO e etilenoglicol preservaram de forma parcial estágios mais avançados de desenvolvimento folicular, mas em concentrações elevadas causam degeneração dos folículos primordiais. Recomenda-se a continuidade das pesquisas com ajustes nas concentrações e a associação de antioxidantes alternativos, visando reduzir o estresse oxidativo e melhorar a viabilidade folicular.

## VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa permitiu avaliar o efeito de diferentes combinações de concentrações de crioprotetores na vitrificação de tecido ovariano de gatas domésticas. Conclui-se que as soluções extracelulares associadas à sacarose apresentaram efeito protetor, enquanto a catalase não promoveu benefícios significativos. Por conseguinte, os crioprotetores intracelulares preservaram parcialmente os folículos em estágios mais avançados, mas, em concentrações

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (PIVIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



elevadas, provocaram alterações morfológicas nos folículos primordiais. Logo, são necessárias mais pesquisas e correções nas concentrações dos crioprotetores, bem como na suplementação antioxidante, buscando otimizar a viabilidade folicular após o reaquecimento.

O desenvolvimento desse projeto colaborou para o aprimoramento do conhecimento em criopreservação ovariana em felinos, oferecendo informações importantes sobre a escolha e combinação de crioprotetores. Além disso, proporciona um alicerce para futuros estudos voltados à conservação da fertilidade em animais domésticos e em espécies no mapa de extinção, ampliando a pesquisa científica aplicada no campo da reprodução assistida.

## VII. REFERÊNCIAS

### PERIÓDICO

AMORIM, C. A.; DONNEZ, J. Fertility preservation in mammals: Advances and prospects in ovarian tissue cryopreservation. *Reproductive Biology*, v. 20, n. 3, p. 187-199, 2020.

ARAT, S. et al. Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 8, p. 1012-1023, 2011.

BANDEIRA, F. et al. Two Methods of Vitrification Followed by In Vitro Culture of the Ovine Ovary: Evaluation of the Follicular Development and Ovarian Extracellular Matrix. *Reprod Domest Anim*, v. 26, 2014.

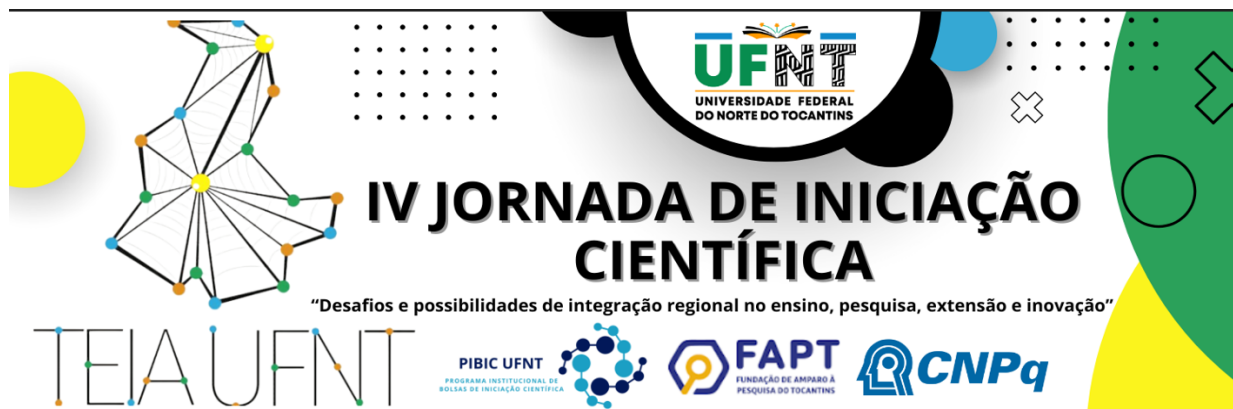
CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 110, p. 11-19, 1997.

CARVALHO, A. A. et al. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science*, v. 138, p. 220-227, 2013.

COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat Res*, v. 156, p. 87-100, 2010.

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



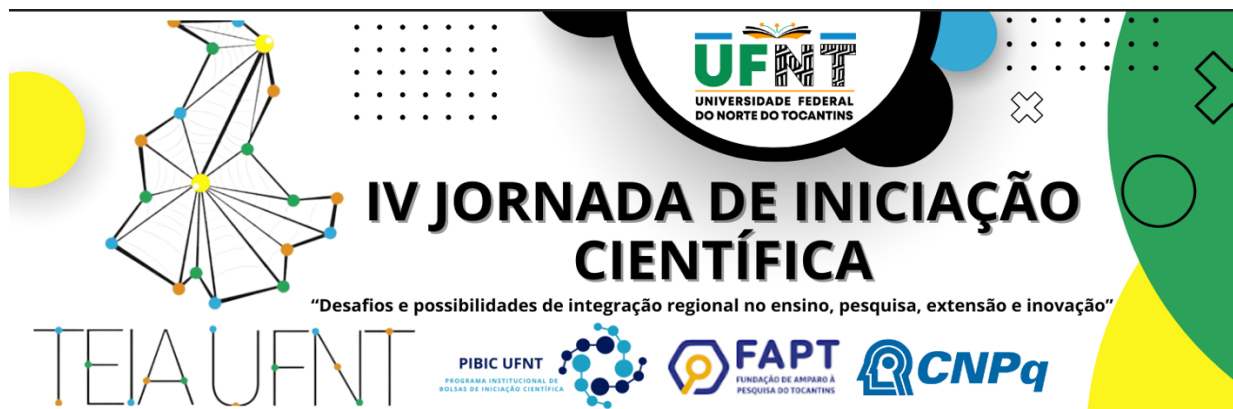
- DEMIRCI, B. et al. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology*, v. 60, p. 999-1010, 2003.
- DONNEZ, J. et al. Restoration of ovarian function after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Human Reproduction*, v. 21, p. 183-188, 2006.
- JIN, S. et al. Markers of growth and development in primate primordial follicles are preserved after slow cryopreservation. *Fertility and Sterility*, 2010.
- LIMA, A. K. F. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats. *Theriogenology*, v. 66, p. 1664-1666, 2006.
- LUVONI, G. C. Effect of vitrification of feline ovarian cortex on follicular and oocyte quality and competence. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 385-391, 2012.
- MAZUR, P. Limits to life at low temperatures and at reduced water contents and water activities. *Origin Life*, v. 10, p. 137-159, 1980.
- NETO, V. et al. New Approaches of Ovarian Tissue Cryopreservation from Domestic Animal Species. IntechOpen, 2012.
- OLIVEIRA, K. G. et al. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Animal Reproduction Science*, v. 123, p. 75-80, 2011.
- SAMPAIO, A. M. et al. Protective role of antioxidants in oocyte and ovarian tissue cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v. 195, p. 158-166, 2018.
- SANTOS, R. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2008.
- SILVA, C. M. et al. Role of extracellular cryoprotectants in ovarian tissue vitrification. *Cryobiology*, v. 90, p. 50-57, 2019.
- VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 1, p. 72-95, 2009.
- WIEDEMANN, C.; ZAHMEL, J.; JEWGENOW, K. Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 37, 2013.
- WILDT, D. E. et al. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Cancer Treat Res*, v. 156, p. 87-100, 2010.
- ZHOU, H. et al. Antioxidant strategies in ovarian cryopreservation: A review. *CryoLetters*, v. 41, n. 2, p. 87-95, 2020.

#### **LIVRO**

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

#### **TRABALHO ACADÊMICO**

- 1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias
- 2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)



CARRIJO JR, O. A. Estimativa, características morfológicas e estruturais e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. 2009. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

#### **PERIÓDICO ONLINE**

IUCN. Red List of Threatened Species. 2014/2015. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Acesso em: 10 abr. 2015.

#### **VIII. AGRADECIMENTOS**

Agradeço à professora Ana Kelen Felipe Lima, pela orientação, e dedicação durante todo o desenvolvimento da pesquisa. Sua orientação foi primordial para o aprendizado ao longo deste projeto.

Obrigada, Acsia, Jamily e Ranyelle, pela parceria e colaboração nas atividades realizadas no laboratório, sempre compartilhando experiências e conhecimentos que contribuíram para a execução deste trabalho. Um agradecimento especial à Raryanne, que esteve ao meu lado durante todo o processo, auxiliando na escrita e no desenvolvimento do relatório. Expresso minha gratidão ainda à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) e à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) pelo apoio institucional, bem como ao Programa Institucional de Iniciação Científica (PIVIC/UFNT) pelo incentivo à formação científica e pelo apoio à realização desta pesquisa.

Por fim, registro meus agradecimentos à agência de fomento CNPq, pelo incentivo à pesquisa e pela contribuição fundamental ao desenvolvimento científico, que torna possível o fortalecimento da ciência e o avanço do conhecimento nas universidades públicas brasileiras.

1 Voluntário. Programa de Voluntários em Iniciação Científica (**PIVIC**). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias

2 Orientadora, Professora Doutora da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. [ana.lima@ufnt.edu.br](mailto:ana.lima@ufnt.edu.br)