

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CADELA DA CVU/UFNT

CUNHA, Jamily dos Santos¹; LIMA, Ana Kelen Felipe²

RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade em fêmeas de diferentes espécies, incluindo cães domésticos. Este estudo teve como objetivo definir um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de cadelas que mantenha a normalidade dos folículos pré-antrais após o reaquecimento, investigando diferentes combinações de crioprotetores e a presença de sacarose na solução de vitrificação. Foram utilizados ovários obtidos de cadelas submetidas a ovariectomia eletiva, os quais foram submetidos à vitrificação em superfície sólida. Foram avaliadas soluções contendo etilenoglicol (EG), propanodiol (PROH) e dimetilsulfóxido (DMSO), associadas à sacarose. Após o reaquecimento, os fragmentos foram analisados histologicamente quanto à morfologia e viabilidade folicular. Os resultados mostraram uma taxa média de sobrevivência folicular de 43,6%, indicando que o protocolo ainda necessita de otimizações. Dessa forma, este trabalho contribui para o avanço das pesquisas voltadas à conservação do material genético canino e à aplicação da criobiologia na reprodução assistida.

Palavras-chave: Criopreservação. Crioprotetores. Biotecnologia.

I. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

No contexto da medicina veterinária, a técnica de vitrificação de tecido tem aplicação relevante tanto na conservação de espécies ameaçadas quanto na

1 Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC). Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias. jamily.cunha@ufnt.edu.br

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

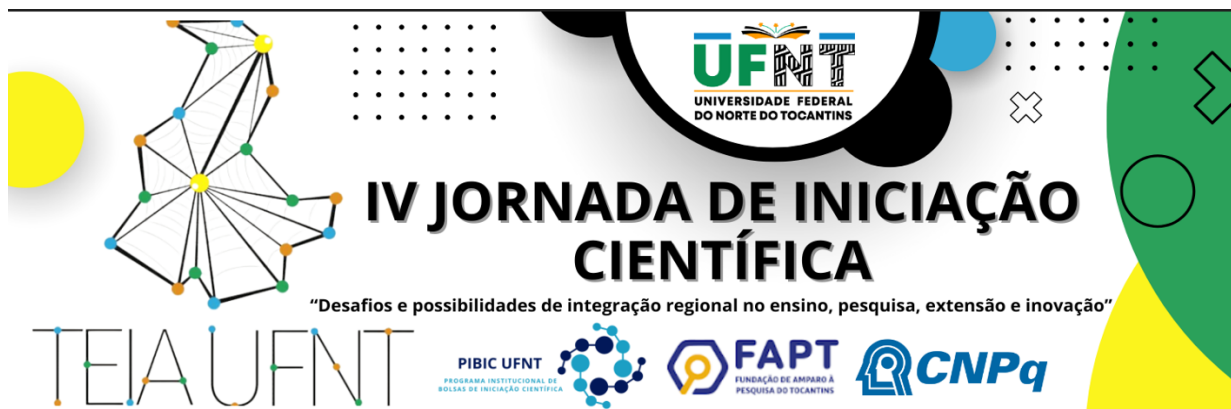


manutenção do potencial genético de animais de valor zootécnico e experimental. Inserido na área de Ciências Veterinárias, o presente estudo se desenvolve dentro das temáticas de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, abordando a vitrificação de tecido ovariano de cadelas atendidas pela Clínica Veterinária Universitária (CVU/UFNT).

A eficiência do processo de congelamento e a viabilidade de tecidos/células descongelados ainda são subótimas, necessitando de avanços nas tecnologias de óvulos e criopreservação de tecido ovariano. Com o aumento do número de espécies ameaçadas de extinção, coletar e conservar amostras vivas é importante para a conservação a longo prazo das populações animais. Globalmente, muitos criobancos foram desenvolvidos para preservar tecidos animais para uso futuro na conservação da vida selvagem (Brereton et al., 2025). Além disso, o cão é um modelo experimental muito importante para os canídeos silvestres ameaçados de extinção, fato esse que pode facilitar as pesquisas para conservação desses animais, uma vez que, a escassez e a dificuldade de manejo de animais silvestres tornam difíceis as pesquisas de base envolvendo os mesmos (Rôlo, 2012).

Este projeto visa compreender os efeitos da associação de diferentes crioprotetores, como o etilenoglicol, propanodiol, DMSO, além da sacarose como agente osmótico, sobre a viabilidade dos folículos ovarianos, pois interferem na proteção celular frente ao estresse térmico e osmótico causado pela vitrificação. A relevância das atividades desenvolvidas está no potencial de aprimorar técnicas de preservação ovariana, fornecendo subsídios para futuras aplicações clínicas e científicas, como transplantes de tecido ovariano e estudos de maturação folicular in vitro.

Assim, o estudo justifica-se pela necessidade de adaptar protocolos de vitrificação à espécie canina e pela importância de compreender os fatores que



influenciam a viabilidade folicular pós-descongelamento, visando otimizar a preservação da fertilidade e a conservação genética.

II. BASE TEÓRICA

A criopreservação é uma biotecnologia aplicada à reprodução animal que tem como objetivo preservar células e tecidos por longos períodos, mantendo suas características morfológicas e funcionais. Dentre os métodos utilizados, a vitrificação se destaca como uma alternativa eficiente ao congelamento lento, por evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, principal causa de danos estruturais às células (VAJTA, 2000; MANDAWALA et al., 2016).

Nas últimas décadas, a vitrificação de tecido ovariano tem sido amplamente estudada em diferentes espécies, como caprinos, bovinos, felinos e caninos, com o intuito de preservar a fertilidade e conservar o patrimônio genético animal (HOSSAY; DONNEZ; DOLMANS, 2020; WANG et al., 2025). Em fêmeas domésticas, essa técnica é especialmente relevante em situações em que há risco de perda da função ovariana, como após doenças reprodutivas ou neoplásicas (BRERETON et al., 2025).

O princípio básico da vitrificação envolve o uso de crioprotetores, substâncias químicas que penetram nas células e reduzem os efeitos letais do congelamento. Esses compostos são classificados em permeáveis, como o dimetilsulfóxido (DMSO), e não permeáveis, como a sacarose. Os crioprotetores permeáveis atravessam a membrana celular e protegem os componentes intracelulares da desidratação e do estresse osmótico, enquanto os não permeáveis promovem a saída de água e equilibram o gradiente osmótico, evitando a formação de cristais de gelo (LOPES, 2019; FUJIHARA et al., 2019).

LOPES (2019) reforçou que a presença de sacarose na solução atua como agente osmótico essencial, aumentando a taxa de sobrevivência de folículos secundários e antrais isolados. Em felinos, ALKALI et al. (2024) compararam



diferentes protocolos de vitrificação e constataram que o tempo e a temperatura de equilíbrio influenciam diretamente na qualidade tecidual, reforçando a importância do controle das etapas de exposição aos crioprotetores.

A relevância científica e aplicada da vitrificação de tecido ovariano é reforçada pelo avanço da criobiologia e pela integração das áreas de fisiologia reprodutiva, histologia e biotecnologia. WANG et al. (2025) destacam que as pesquisas recentes têm buscado desenvolver protocolos mais seguros e eficientes, com menor toxicidade e maior taxa de recuperação celular, aproximando o desempenho dos tecidos vitrificados ao dos tecidos frescos.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Definir um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de cadelas que mantenha a normalidade de folículos pré-antrais após o reaquecimento do tecido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Investigar o efeito da presença de ACP extracelular, sacarose (SAC) na composição da solução de vitrificação; Investigar diferentes combinações de crioprotetores intracelulares (ETILENOGLICOL, PROPANODIOL, DMSO); Analisar a morfologia e a viabilidade dos folículos pré-antrais após vitrificação do tecido ovariano de cadela.

IV. METODOLOGIA

Os ovários (n = 6) de cadelas foram coletados a partir de cirurgias eletivas, e transportados em tubos contendo 20 mL de solução fisiológica a 0,9% em recipiente de isopor com gelo a 4°C. No laboratório, os pares de ovário foram retirados o tecido aderente, e cortados com um bisturi em fragmentos de 3 x 3 x 1 mm (9 mm³), e distribuídos aleatoriamente, de acordo com a técnica de vitrificação utilizada (VSS – Vitrificação em Superfície Sólida). Um fragmento de cada par de ovários foi imediatamente fixado em solução de Formol tamponado a 10% por 12 h para análise histológica (controle fresco). 4 fragmentos foram expostos a solução teste de vitrificação (SV) durante 5 min a 20 ° C. Após este período, dois fragmentos foram



submetidos a VSS e os outros 2 fragmentos após a exposição a SV serão fixados em formol tamponado 10%. Um total de dois fragmentos foram expostos a 1,8 mL VS durante 5 min. Estas amostras foram então colocadas individualmente sobre a superfície de um cubo de metal flutuando em LN₂. Depois, os fragmentos vitrificados foram armazenados em LN₂.

Após uma semana de estocagem, todos os fragmentos de tratamento foram retirados do LN₂, mantidos à temperatura ambiente (~ 25 ° C) durante 1 min, e depois foram imersos em banho-maria a 37 ° C até que a VS estivesse completamente descongelada (~ 1 -2 min). O crioprotetor foi removido dos fragmentos de córtex utilizando SV com concentrações decrescentes de SV (100%, 50%, 0%). A eficiência da preservação de folículos pré antrais foi avaliada utilizando histologia clássica. Cortes seriados 5 micrometros de espessura foram corados com ácido periódico Schiff (PAS) -hematoxylin, e avaliadas através de um microscópio de luz (Nikon, Tokyo, Japão) a 400 x de ampliação.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 2.430 folículos ovarianos, nos diversos tratamentos, com uma taxa de sobrevivência após a exposição aos crioprotetores de 43,6%. Neste trabalho, os resultados foram similares aos encontrados em cadelas, por Brandão (2021), que observou uma queda significativa na porcentagem de folículos normais após vitrificação, quando comparados ao controle fresco (74,5% ± 1,6% para o grupo fresco vs. 52,0% ± 1,5% para o grupo vitrificado).

Por outro lado, Somoskoi et al. (2023), que utilizaram a técnica de OPS (Open Pulled Straw) em cadelas e obtiveram taxas de sobrevivência folicular semelhantes ao tecido fresco 6 (80,3% ± 23,5 vs. 83,6% ± 17,6), sugerindo que a escolha da técnica tem impacto direto sobre a eficiência da vitrificação ovariana em cães. Neste estudo, optou-se por combinações de EG, DMSO e PROH, suplementadas com sacarose. A literatura mostra que a associação de crioprotetores permeáveis (EG e DMSO) com



polímeros sintéticos ou macromoléculas extracelulares, como o PVP, pode melhorar a viabilidade celular. Em caprinos, Lopes (2019) relataram que soluções contendo EG e DMSO associadas à sacarose resultaram em elevadas taxas de folículos normais após vitrificação. Estudos em bovinos (Rocha, 2017) e caprinos (Lopes, 2019) também relataram reduções significativas na proporção de folículos normais após vitrificação, apesar de metodologias semelhantes às aplicadas em cães. Já em felinos, os achados de Ribeiro (2023) mostraram que a associação de DMSO e EG com sacarose (grupo V2) resultou em melhor preservação da morfologia folicular, enquanto soluções mais concentradas (40% DMSO) apresentaram maiores perdas. Esses dados confirmam que tanto a espécie quanto o balanço entre crioprotetores permeáveis e não permeáveis desempenham papel determinante na eficiência da vitrificação.

VI. CONCLUSÃO/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo reforçam que a vitrificação de tecido ovariano em cadelas está em processo de aprimoramento e requer otimizações na escolha da técnica e dos crioprotetores utilizados.

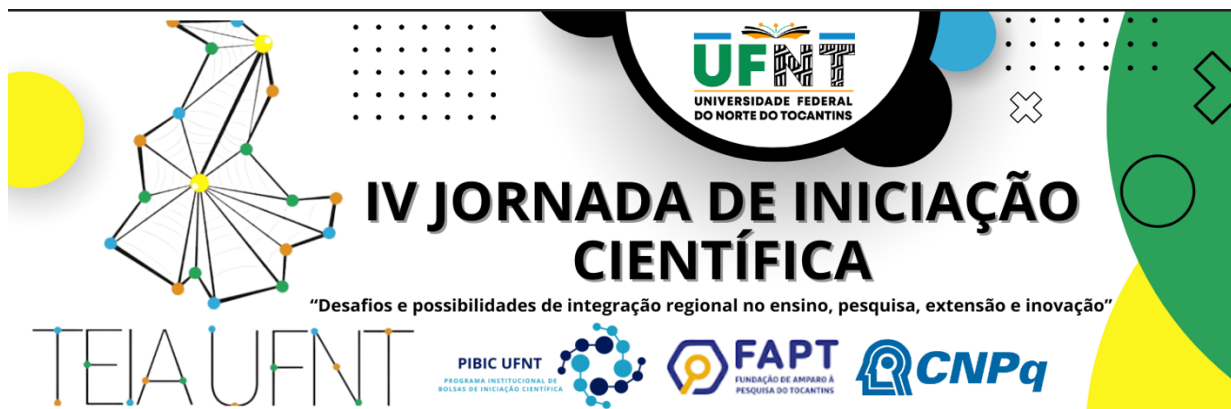
VII. REFERÊNCIAS

ALKALI, I. M. et al. Vitrification of feline ovarian tissue: comparison of protocols based on equilibration time and temperature. **Theriogenology**, v. 224, p. 163–173, 2024. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2024.05.023](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.05.023).

BRANDÃO, F. A. S. **Vitrificação e autotransplante de tecido ovariano como ferramentas visando a preservação e restauração da função ovariana na espécie canina**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2021.

BRERETON, J. et al. When to cryopreserve and when to let it go? A systematic review of priorities in wild animal cryobanking. **Theriogenology Wild**, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.therwi.2025.100119>. Acesso em: 6 out. 2025.

FUJIHARA, M.; KANEKO, T.; INOUE-MURAYAMA, M.. Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. **Scientific Reports**, v. 9, p. 3970, 2019.



HOSSAY, C.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.. Whole ovary cryopreservation and transplantation: a systematic review of challenges and research developments in animal experiments and humans. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 3196, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm9103196>. Acesso em: 6 out. 2025.

LOPES, É. P. F. **Vitrificação de folículos secundários e antrais iniciais isolados do tecido ovariano caprino**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

RIBEIRO, R. B. **Comparação de métodos de criopreservação em tecido ovariano de gatas domésticas: vitrificação versus congelamento lento**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2023.

ROCHA, C. D. **Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2017.

RÔLO, J. **Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SOMOSKOI, B. et al. Effects of different cryopreservation methods on canine isolated preantral follicles. **Department of Obstetrics and Food Animal Clinic, University of Veterinary Medicine**, Budapest, Hungary, 2023.

WANG, Y. et al. Advances in mammalian ovarian tissue cryopreservation. **Animals and Zoonoses**, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.azn.2025.02.004>. Acesso em: 6 out. 2025.

VIII. AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) pelo apoio institucional ao desenvolvimento deste projeto de iniciação científica. Expresso minha profunda gratidão à professora Ana Kelen Felipe Lima, cuja orientação inspiradora e dedicação despertaram meu interesse e paixão pela pesquisa. Sua supervisão constante, apoio metodológico, incentivo e disponibilidade em todas as etapas do trabalho foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e científico. Agradeço de forma especial à técnica de laboratório Gilzelle Maria da Luz Silva, cujo empenho e competência foram essenciais para a finalização deste projeto. Agradeço também à mestranda Acsa Cristina Carvalho Santos, pelo suporte e colaboração durante o desenvolvimento da pesquisa, e ao discente William Gabriel F. S. Lima, pela assistência nas etapas experimentais e procedimentos de vitrificação.