



Universidade de Brasília

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



Dissertação de Mestrado

**Comparação de métodos de criopreservação em tecido ovariano de gatas domésticas:
vitrificação versus congelamento lento**

Rayane Brandão Ribeiro

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fernanda Paulini

Brasília-DF 2023

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1	As estratégias para a conservação de germoplasma felino.....	9
2.2	A criopreservação de tecido ovariano para preservação da fertilidade	13
2.3	A técnica de congelamento lento de ovários.....	15
2.4	A vitrificação de tecido ovariano.....	17
2.5	A importância da escolha dos crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano	19
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
5	METODOLOGIA.....	22
6	RESULTADOS.....	28
7	DISCUSSÃO.....	37
8	CONCLUSÃO.....	43
9	REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Desenho esquemático comparando vitrificação e congelamento lento de tecido ovariano 14
- Figura 2** Desenho experimental. Um total de 160 fragmentos de ovários de gatas foram obtidos, sendo que 60 foram criopreservados pelo método de congelamento lento nos grupos CL1, CL2 e CL3, e outros 60 foram vitrificados nos grupos V1, V2 e V3, resultando em uma média de 20 fragmentos por grupo. O restante dos fragmentos foi imediatamente fixado como controle fresco. 24
- Figura 3** Microfotografias de folículos primordiais do tecido ovariano de gatas domésticas fresco e criopreservado corados com Hematoxilina e Eosina. (A) grupo CL1, (B) grupo CL2, (C) grupo CL3, (D) grupo V1, (E) grupo V2, (F) grupo V3, (G) grupo CF, (H) grupo CF. 29
- Figura 4** Representação gráfica da análise estatística a partir do número de folículos primordiais morfológicamente normais e degenerados. 30
- Figura 5** Microfotografias de folículos em crescimento do tecido ovariano de gatas domésticas fresco e criopreservado corados com Hematoxilina e Eosina. (A) grupo CL1, (B) grupo CL2, (C) grupo CL3. (D) F grupo V1, (E) grupo V2, (F) grupo V3, (G) grupo CF, (H) grupo CF. 31
- Figura 6** Representação gráfica da análise estatística a partir do número de folículos em crescimento morfológicamente normais e degenerados dos grupos CF, V1, V2, V3, CL1, CL2 e CL3. 32
- Figura 7** Representação gráfica da análise estatística e microfotografias da imunohistoquímica de proliferação celular do tecido ovariano utilizando o anticorpo Ki-67 nos grupos CF, V1, V2, V3, CL1, CL2 e CL3. (A) Análise estatística a partir do número de folículos em crescimento 34

positivos e negativos para Ki-67, nos grupos controle fresco e nos grupos de criopreservação. Letra B: controle negativo sem anticorpo primário. Letras C-I: Tecido ovariano de gatas marcado com o anticorpo Ki-67 e corado com Hematoxilina. Os folículos considerados positivos foram aqueles que apresentaram ao menos uma célula da granulosa positiva para Ki-67 (células com coloração marrom).

- Figura 8** Micrografia eletrônica de transmissão de transmissão de folículos pré-antrais em tecido ovariano de gata fresco 35
- Figura 9** Micrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais do grupo V2. (A-B) Folículo mostrando o desprendimento do oócito (Ov) das células da granulosa (GC). (C) Forte adesão entre oócito e células da granulosa (GC). (D) Região do estroma. 35
- Figura 10** Micrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais do grupo V1. (A) Célula da granulosa com mitocôndrias. (B) Folículo mostrando o desprendimento do oócito (Ov) das células da granulosa (GC). (C) Forte adesão entre oócito e células da granulosa (GC). (D) Região do estroma 36
- Figura 11** Micrografia eletrônica de transmissão de transmissão da região do estroma e de folículos do grupo CL2. (A) Folículo degenerado. (B) Folículo com numerosas degenerações ultraestruturais. 37

ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACPs - agentes crioprotetores

CTO - Criopreservação de tecido ovariano

DMSO - Dimetilsulfóxido

EG - Etilenoglicol

FIV- fertilização *in vitro*

IA- inseminação artificial

IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza

MEM- Meio essencial mínimo

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

M - Molar

ml- Mililitros

MN - morfológicamente normais

NIV - Needle Immersed

SE - Solução de equilíbrio

SV - Solução de vitrificação

SSV

TRAs - técnicas de reprodução assistida

μl - Microlitros

RESUMO

O presente estudo testou duas técnicas de criopreservação (vitrificação e congelamento lento) com combinações diferentes de crioprotetores. Para realizar o estudo, foram utilizados os ovários de 10 gatas submetidas a ovariectomia eletiva na clínica veterinária Casa do Gato, localizada em Brasília, DF. No total, foram coletados 20 ovários, cada um dos quais foram divididos em oito fragmentos de 3mm³. Dois fragmentos de cada ovário foram imediatamente fixados para o controle fresco, enquanto os demais fragmentos (dois para cada grupo) foram aleatoriamente destinados aos tratamentos de congelamento lento ou vitrificação, em soluções que consistiam em: No grupo V1, a solução de equilíbrio (SE) continha 10% de DMSO, 10% de EG e trealose 0,1M, enquanto a solução de vitrificação (SV) tinha 20% de DMSO, 20% de EG e trealose 0,1M. Já no grupo V2, a solução de equilíbrio era composta por 10% de DMSO, 10% de EG e sacarose 0,1M, e a solução de vitrificação (SV) possuía 20% de DMSO, 20% de EG e sacarose 0,1M. No grupo V3, a solução de equilíbrio apresentava 20% de DMSO e trealose 0,1M, enquanto a solução de vitrificação (SV) continha 40% de DMSO e trealose 0,1M. Em contrapartida, nos grupos de congelamento lento, o CL1 tinha uma solução com 1M de DMSO, 1M de EG, 10% de SFB e 0,4% de trealose. O CL2 utilizou uma solução com 1,5M de DMSO, 10% de SFB e 0,4% de sacarose, enquanto o CL3 adotou uma solução com 1,5M de DMSO, 10% de SFB e 0,4% de trealose. Todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido durante pelo menos sete dias e os fragmentos foram descongelados/desvitrificados e fixados após esse período. A análise histológica foi realizada para quantificar e classificar os folículos, os testes imuno-histoquímicos para avaliar a presença de folículos proliferativos. Além disso, foi realizada uma análise ultra-estrutural por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados indicaram que o grupo V1 apresentou os melhores resultados em relação à preservação da reserva folicular primordial e de folículos em crescimento, destacando-se como o mais eficaz na sobrevivência folicular. A análise de microscopia eletrônica dos folículos do grupo V1 mostrou aspectos positivos, como núcleos celulares normais, nucléolos bem estruturados e mitocôndrias com distribuição homogênea nas células da granulosa. No entanto, um achado indesejável foi observado, representado pelo descolamento do ovócito em relação às células da granulosa. Apesar dos resultados promissores, mas estudos futuros são necessários para maior comprovação da eficácia dos protocolos apresentados.

Palavras-chave: trealose; gatas; crioprotetores; folículos ovarianos.

ABSTRACT

The present study tested two cryopreservation techniques (vitrification and slow freezing) with different combinations of cryoprotectants. To conduct the study, ovaries from 10 female cats that underwent elective ovariohysterectomy at the veterinary clinic "Casa do Gato," located in Brasília, DF, were used. A total of 20 ovaries were collected, each of which was divided into eight 3mm³ fragments. Two fragments from each ovary were immediately fixed for the fresh control, while the remaining fragments (two for each group) were randomly assigned to slow freezing or vitrification treatments using solutions that consisted of the following: In group V1, the equilibrium solution (ES) contained 10% DMSO, 10% EG, and 0.1M trehalose, while the vitrification solution (VS) had 20% DMSO, 20% EG, and 0.1M trehalose. In group V2, the equilibrium solution consisted of 10% DMSO, 10% EG, and 0.1M sucrose, and the vitrification solution (VS) contained 20% DMSO, 20% EG, and 0.1M sucrose. In group V3, the equilibrium solution had 20% DMSO and 0.1M trehalose, while the vitrification solution (VS) contained 40% DMSO and 0.1M trehalose. In contrast, in the slow freezing groups, CL1 had a solution with 1M DMSO, 1M EG, 10% FBS, and 0.4% trehalose. CL2 used a solution with 1.5M DMSO, 10% FBS, and 0.4% sucrose, while CL3 adopted a solution with 1.5M DMSO, 10% FBS, and 0.4% trehalose. All samples were stored in liquid nitrogen for at least seven days, and the fragments were thawed/devitrified and fixed after this period. Histological analysis was performed to quantify and classify the follicles, immunohistochemical tests were used to evaluate the presence of proliferative follicles, and an ultrastructural analysis was carried out using transmission electron microscopy. The results indicated that group V1 showed the best results regarding the preservation of primordial follicle reserve and growing follicles, standing out as the most effective in follicular survival. The electron microscopy analysis of the follicles in this group showed positive aspects, such as normal cell nuclei, well-structured nucleoli, and mitochondria with homogeneous distribution in the granulosa cells. However, an undesirable finding was observed, represented by the detachment of the oocyte from the granulosa cells. Despite the promising results, further studies are needed to provide greater evidence for the effectiveness of the presented protocols.

Keywords: trehalose; queens; cryoprotectants; ovarian follicles.

1. INTRODUÇÃO

A caça e a destruição ou fragmentação de habitats levaram a um aumento no número de espécies ameaçadas na família Felidae na última década. Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), a maioria das espécies de felinos estão classificadas como vulneráveis, em perigo ou ameaçadas de extinção na Lista Vermelha (IUCN, 2022). A Lista Vermelha da IUCN classifica as espécies em diferentes categorias de acordo com o risco de extinção que enfrentam. Diante dessas informações, é necessário a implantação de medidas que possam reverter ou amenizar esse cenário, e estratégias para preservação têm utilizado recursos biológicos para a manutenção da biodiversidade, visto que a perda de uma espécie pode comprometer o ecossistema (PRAXEDES et al., 2018; TANPRADIT et al., 2015). Diante desse contexto, os gatos domésticos representam o modelo de pesquisa ideal para estudos de reprodução felina, devido à proximidade reprodutiva entre as espécies. Tendo em vista que os felinos selvagens são mais difíceis de serem encontrados e obter autorização para sua utilização em pesquisas pode envolver complicações legais e éticas.

Os métodos de conservação *ex situ*, como os programas de reprodução em cativeiro, são alternativas para o restabelecimento de indivíduos de espécies ameaçadas (CONDE et al., 2011; MCGOWAN; TRAYLOR-HOLZER; LEUS, 2017). No entanto, essas estratégias apresentam limitações como o baixo desempenho reprodutivo (BROWN, 2011; MOREIRA et al., 2007) e a baixa variabilidade genética (COMIZZOLI; HOLT, 2014). Portanto, é necessário que se tenha novas formas de preservação da fertilidade que possam incrementá-las.

O maior desafio reprodutivo em animais selvagens é o de manter ovócitos viáveis após a morte do animal (MARTINS et al., 2018). Desenvolvimentos teóricos recentes revelaram que a criopreservação tem grande potencial para ajudar a manter e proteger espécies raras e ameaçadas de extinção, por permitir a criação de bancos de gamoplasma (CAMPOS et al., 2019). Consequentemente, para que isso seja possível, é essencial o uso de protocolos de criopreservação eficientes para preservar gametas, embriões e tecidos gonadais.

Dessa forma, os métodos de criopreservação mais usados na atualidade são o congelamento lento e a vitrificação. Ambas as técnicas são utilizadas com sucesso em humanos, fornecendo bons resultados na preservação de tecido ovariano, na recuperação da função endócrina e da fertilidade após o transplante de tecido ovariano criopreservado, com mais de 200 humanos nascidos vivos. (DOLMANS; DONNEZ, 2021).

Com o objetivo de assegurar a manutenção da viabilidade celular e minimizar os danos celulares que possam ocorrer durante o processo de criopreservação, são utilizados agentes

crioprotetores (ACPs) que formam uma camada protetora contra possíveis danos causados pela formação de cristais de gelo (KASHUBA BENSON; BENSON; CRITSER, 2008). Assim a seleção apropriada dos agentes crioprotetores é fundamental para o sucesso da criopreservação.

Os ACPs agem dentro ou fora das células. Os agentes intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que apresentam capacidade de ultrapassar a membrana celular (PURDY, 2006). Especificamente o etilenoglicol (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO) se destacam pela capacidade de penetração (FICKEL; WAGENER; LUDWIG, 2007). Os agentes extracelulares geralmente são macromoléculas ou sacarídeos que não atravessam facilmente a membrana citoplasmática, mas geram desidratação celular por pressão osmótica que protege as células externamente. Dentre esses agentes, os açúcares, tais como sacarose, glicose, galactose e trealose, atuam como crioprotetores extracelulares, protegendo o tecido através de ligações com os grupos fosfolipídicos das membranas celulares (SANTOS et al., 2008). Eles também exercem sua função ao reduzir choques osmóticos e controlar a entrada de água na célula, levando a uma desidratação celular antes do congelamento (SHAW et al., 2000).

Diferentes concentrações dos crioprotetores DMSO e EG têm sido testadas na criopreservação de tecido ovariano em felinos selvagens (ANDREWS et al., 2019; CRICHTON et al., 2003; JEWGENOW et al., 2011; WIEDEMANN et al., 2012; WIEDEMANN; ZAHMEL; JEWGENOW, 2013). O congelamento lento de córtex ovariano com 1,5 M de EG foi capaz de manter a viabilidade de 51% folículos primordiais e em crescimento em tecido ovariano de felinos selvagens (WIEDEMANN et al., 2012; WIEDEMANN; ZAHMEL; JEWGENOW, 2013). Em gatos domésticos, Lima et al. (2006) usaram EG como agente crioprotetor para o congelamento lento do córtex ovariano e encontraram apenas 56% de folículos morfolologicamente normais (MN). Já Bosch et al. (2004) constataram o desenvolvimento de folículos em estágios iniciais a avançados após o congelamento lento de tecido ovariano de gatas com EG.

Ademais, Brito et al. (2018) testaram dois métodos de vitrificação (sistema aberto de vitrificação de superfície sólida e o sistema fechado) utilizando dois tratamentos compostos de 20 % EG e 10 % EG + 10% DMSO em tecido ovariano de gatas e obtiveram uma redução na porcentagem de folículos primordiais após 7 dias de cultivo in vitro em ambos os métodos e tratamentos em comparação com controle fresco. Apesar desses estudos encontrarem folículos viáveis após criopreservação, os protocolos ainda não foram bem estabelecidos para felino devido à complexidade do tecido, e até o momento há poucos relatos disponíveis de protocolos de criopreservação, tanto utilizando congelamento lento quanto vitrificação. Segundo Tanpradit et al. (2015) a concentração do crioprotetor e o método de criopreservação afetam

diferentes parâmetros na criopreservação de tecido como a viabilidade folicular ovariana, viabilidade folicular isolada, folículos MN, apoptose de folículos primordiais, apoptose de células estromais. Os autores testaram diferentes concentrações de sacarose para a criopreservação de tecido ovariano de gatos domésticos e relataram efeitos benéficos da sacarose 0,1 ou 0,3 M na viabilidade folicular, morfologia histológica e prevenção de apoptose após criopreservação. Posteriormente Brito et al (2018) investigaram a vitrificação do tecido ovariano de felinos utilizando diferentes combinações de substâncias, como etilenoglicol (EG) e trealose, com ou sem a presença de dimetil sulfóxido (DMSO). Os resultados obtidos indicaram que a utilização da combinação de EG + DMSO + trealose foi eficaz na preservação do número de folículos normais durante a aplicação do método de vitrificação de superfície sólida (SSV). Portanto, para o sucesso destas técnicas a escolha de crioprotetores é vital.

Outra questão desafiadora na criopreservação é o dano tecidual após o congelamento e o descongelamento em diferentes espécies, visto que as células e tecidos precisam ser protegidos de danos durante a criopreservação (VAJTA; NAGY, 2006). É por isso que alguns fatores devem ser considerados como a concentração de agentes crioprotetores, tempo e maneira em que o material biológico será exposto à solução (CAMPOS et al., 2019). A escolha desses agentes é fundamental para o sucesso da técnica, pois protegem as células e os tecidos do estresse químico e físico causados pelo congelamento e descongelamento (PURDY, 2006).

Portanto, são escassos os estudos abrangentes comparando o uso de diferentes crioprotetores com concentrações diferentes na criopreservação de tecido ovariano de gatas. Assim, o presente estudo teve por objetivo testar duas técnicas de criopreservação (vitrificação e congelamento lento) em 3 combinações diferentes de crioprotetores em tecido ovariano de gatas domésticas utilizando DMSO e EG combinados com trealose ou sacarose e somente DMSO combinado com trealose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As estratégias para a conservação de germoplasma felino

Os felídeos apresentam muitas espécies com algum grau de ameaça de extinção. De acordo com a IUCN, a maioria das espécies de felinos selvagens existentes estão listadas como vulneráveis, em perigo ou ameaçados de extinção (IUCN, 2022). Parte desses números tem sido ocasionado pela ação do homem, por meio da caça ilegal ou pela modificação do habitat natural (PRAXEDES et al., 2018). Em decorrência disso, estratégias para preservação de

espécies ameaçadas têm utilizado métodos de conservação como o *in situ*, *ex situ* e técnicas de reprodução assistida.

As técnicas de reprodução assistida e os programas de reprodução *ex situ* são duas ferramentas que têm sido usadas para ajudar a reverter o declínio do número de espécies selvagens. No entanto, o sucesso desses programas depende de muitos fatores diferentes, um deles é a compreensão total da fisiologia reprodutiva dos felinos (ANDREWS et al., 2019). Assim, é necessário o desenvolvimento de mais pesquisas sobre os padrões reprodutivos de gatos machos e fêmeas, devido ao fato de que os humanos têm impactado muito no meio ambiente e na biodiversidade de animais selvagens e muitos deles estão agora com algum tipo de ameaça de extinção (CAMPOS et al., 2019).

Um dos problemas ocasionados pela perda e fragmentação do habitat em decorrência das atividades humanas é a criação de barreiras de fluxo gênico (GERLACH; MUSOLF, 2000), que podem reduzir a diversidade genética e a viabilidade das populações em longo prazo (FRANKHAM, 2010). Segundo Howard e Wildt (2009) a perda da variabilidade genética é um dos grandes desafios enfrentados por muitas espécies selvagens e em cativeiro. Os autores relataram em uma revisão, a presença de espermatozoides polimórficos e problemas de fertilidade em um estudo com indivíduos da espécie *Puma concolor coryi* que habitam a Flórida. Esse problema é observado em populações com baixa variabilidade genética e, portanto, a proteção do habitat não seria suficiente para manter a viabilidade de espécies ameaçadas, devido à atual perda e degradação dos biomas.

Diante do exposto, alguns estudos relataram que dos animais selvagens ameaçados criados em cativeiro, muitos não podem se reproduzir bem devido à agressão masculina, à incompatibilidade comportamental e à infertilidade. Tendo em vista que a reprodução natural nem sempre é bem-sucedida, o uso de técnicas de reprodução assistida (TRAs) como a inseminação artificial (IA), a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a transferência nuclear de células somáticas (SCNT) e de células-tronco de pluripotência induzida (IPSC), a transferência de embriões e a criopreservação, têm sido consideradas estratégias de suporte para incrementar a conservação de espécies criadas em cativeiros (JEWGENOW; ZAHMEL, 2020).

Atualmente existem diversas técnicas de bioengenharia capazes de gerar gametas maduros funcionais que podem auxiliar na preservação da fertilidade (GHORBANI et al., 2022). No caso de TRAs, a criopreservação é realizada principalmente a partir de tecidos gonadais, gametas e embriões. É uma ferramenta importante para preservar o material genético de diferentes gerações, mantendo a diversidade da população (SANTOS et al., 2010).

A criopreservação de tecido ovariano (CTO) tem se tornado extremamente promissora para o resgate de gametas, pois preserva um reservatório de folículos que pode ser usado posteriormente para recuperação de ovócitos, cultura de tecidos ou transplante. Durante o processo de CTO, dentro do tecido ovariano, parte dos folículos permanecem intactos e em contato com as células estromais circundantes, que fornecem as vias de controle bioquímico local que posteriormente podem desencadear o início do crescimento folicular (SILVESTRIS et al., 2020).

Desde 2010, no Brasil, a Fundação Jardim Zoológico de Brasília (FJZB) em conjunto com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), unidade Embrapa Cerrados, mantém um Banco de Germoplasma como parte de um programa de Reprodução para a Conservação. Esse banco é responsável por armazenar diversos tipos celulares, como células somáticas, ovócitos e espermatozoides de animais silvestres. O material biológico foi coletado principalmente a partir de fragmentos da orelha ou tecido adiposo de animais que faleceram naturalmente, bem como de ovários e testículos provenientes de castrações, seguindo protocolos padrões amplamente reconhecidos na literatura científica. Atualmente, o Banco de Germoplasma abriga amostras criopreservadas de 23 espécies, o que representa um significativo avanço na preservação da diversidade genética e na conservação da fauna brasileira (MARTINS et al., 2013; CUNHA et al., 2014; MATTOS, 2016).

Entretanto, a criopreservação de tecido ovariano ainda apresenta limitações. Uma delas está relacionada à complexidade do tecido, que possui diferentes tipos celulares e folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, o que torna esses tecidos mais suscetíveis as criolesões (CAMPOS et al., 2016). Para garantir a viabilidade celular e reduzir os danos celulares que podem ocorrer durante a criopreservação, o tecido ovariano é criopreservado em fragmentos do córtex ovariano, porém ao criopreservar fragmentos, apenas uma fração da reserva ovariana de um indivíduo está sendo considerada, o que pode levar a uma densidade folicular baixa para a restauração da fertilidade (DONFACK et al., 2017). Portanto, o tamanho dos fragmentos de tecido ovariano utilizados é um fator crucial para o sucesso da criopreservação. Em um estudo envolvendo tecido ovariano de gatas domésticas (GORRICO et al., 2018), diferentes tamanhos de fragmentos foram vitrificados e, após análises histológicas e imunohistoquímicas, constatou-se que fragmentos com 27mm³ (3x3x3mm) apresentaram melhor preservação de folículos íntegros. Resultados anteriores em ovários bovinos também indicaram que os fragmentos de 4 mm (10x3x4mm³) apresentaram mais lesões foliculares em comparação com fragmentos de 2 mm (10x3x2mm³) (FERREIRA, et al., 2010).

Diante do exposto, em felinos as técnicas de criopreservação de células reprodutivas de gatos podem incrementar significativamente a biologia reprodutiva relacionada à preservação da biodiversidade. Os gatos domésticos são ótimos modelos experimentais, devido à reprodução ser bastante semelhante entre as espécies felinas, o que permite novos avanços no conhecimento da fisiologia reprodutiva e da criopreservação de gametas (LUVONI et al., 2012).

Em relação à quantidade de córtex ovariano, estudos mostram que os ovários de gatos domésticos têm uma área cortical maior do que os de gatos selvagens, como leopardos e guepardos (PELICAN et al., 2007). Além disso, algumas espécies de felinos selvagens apresentam um número menor de folículos primordiais e em desenvolvimento em comparação com o gato doméstico (COMIZZOLI et al., 2009).

Outras diferenças podem ser observadas em relação à presença de folículos atrésicos (folículos que não se desenvolvem e morrem), que são mais comuns em gatos domésticos do que em felinos selvagens (PELICAN et al., 2007). Além do mais, algumas espécies de felinos selvagens, como tigres e leões, podem apresentar uma maior proporção de folículos em estágios avançados de desenvolvimento em comparação com gatos domésticos (Comizzoli et al., 2009). No entanto, as diferenças podem não influenciar nos resultados obtidos e a aplicabilidade dos achados em diferentes espécies.

Ademais, é importante destacar que a recuperação das funções exócrinas (tecido gonadal) do órgão é essencial após o processo de criopreservação. Nesse sentido, o transplante do tecido criopreservado, seguido ou não de cultivo *in vitro*, é uma das formas de possibilitar a retomada da fertilidade (TAFTI, 2018).

2.2. A criopreservação de tecido ovariano como ferramenta para a preservação da fertilidade

A criopreservação de tecido ovariano, quando comparada à criopreservação de gametas e embriões, tem sido considerada vantajosa em virtude de alguns fatores, como o restabelecimento da fertilidade e da função endócrina em indivíduos recém-nascidos e pré-púberes ou adultos que podem ter morrido inesperadamente (MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020).

A criopreservação do tecido ovariano é uma técnica com grande potencial para a manutenção da função ovariana e para a preservação dos gametas femininos de mulheres jovens diagnosticadas com câncer e de animais ameaçados de extinção, pois permite que seja possível obter viáveis para posterior fertilização (MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011).

Geralmente, o tecido ovariano é criopreservado sob forma de fragmentos finos ou cubos, a fim de permitir uma melhor penetração dos agentes crioprotetores (ACPs) e proporcionar uma proteção mais eficaz em todo o tecido (AMORIM, et al., 2011).

Na espécie felina, é na parte externa do ovário, denominada córtex, onde estão situados os folículos primordiais e em crescimento que constituem a reserva ovariana e os demais folículos que serão criopreservados e armazenados (DONFACK et al., 2017). Os folículos permanecem viáveis até oito horas após a morte do animal (JEWGENOW et al. 1997; SILVA et al., 2000), portanto podem ser recuperados e criopreservados para a formação de bancos de germoplasma de espécies ameaçadas (CAMPOS et al., 2019).

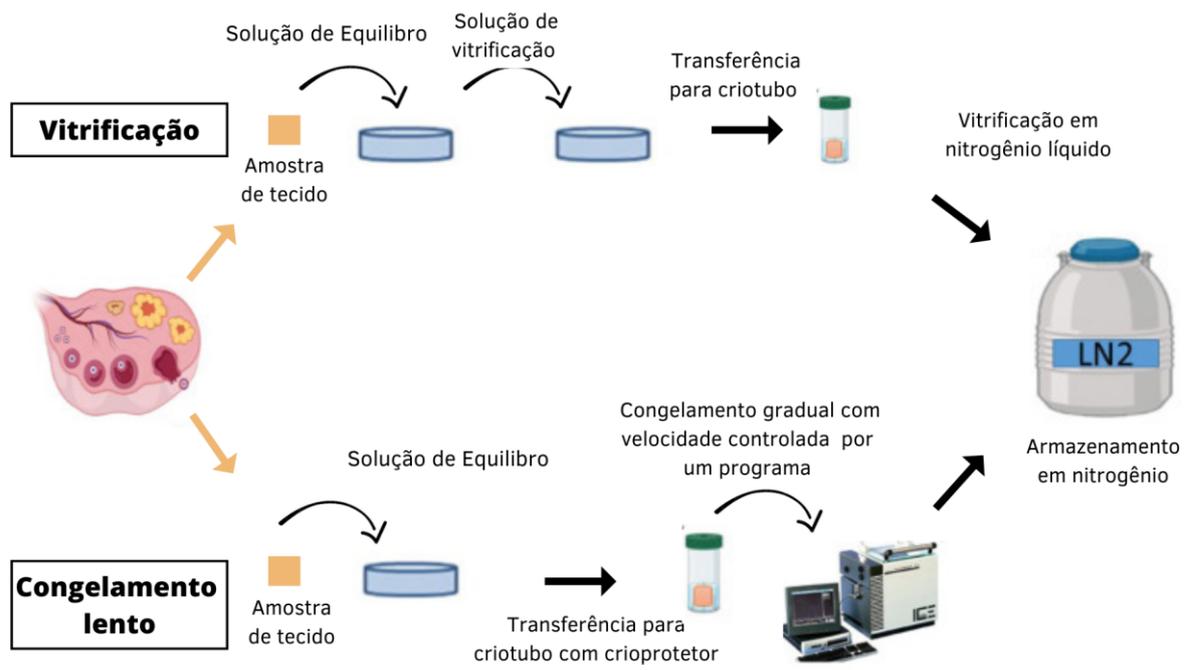
Vários estudos demonstraram que o tecido ovariano pode ser criopreservado e transplantado com sucesso, tornando as técnicas cada vez mais promissoras para a recuperação da fertilidade em diferentes espécies, como em ovelhas (BORDES et al., 2005; COURBIERE et al., 2006, 2009), camundongos (GUNASENA et al., 1997), humanos (CALLEJO et al., 2001; DONNEZ et al., 2006, 2004; KIM, 2003, 2006; LEE et al., 2019; BAHROUDI et al., 2022;), vacas (SEMPLE, 2000; MUELLER et al., 2022), gatos (BRITO et al., 2018; LEONEL et al., 2018a), macacos (CANDY; WOOD; WHITTINGHAM, 1995; DONNEZ; DOLMANS, 2015; AMORIM et al., 2019), elefantes (GUNASENA et al., 1998) e marsupiais (WOLVEKAMP et al., 2001; MATTISKE; SHAW; SHAW, 2002). Até o momento, estudos mostraram que o uso combinado de CPAs e polímeros anticongelantes pode diminuir a toxicidade e manter a qualidade da criopreservação em ovários de animais (HASHIMOTO et al., 2010; TING et al., 2013; MONTANO VIZCARRA et al., 2020). No entanto, ainda não há um consenso sobre o método ideal (congelamento lento ou vitrificação), tamanho do fragmento e os crioprotetores utilizados para incrementar a viabilidade na criopreservação de tecido ovariano de gatas (MATOS; BEZERRA; VICENTE, 2011; LEONEL et al., 2019).

A efetividade dessa técnica foi demonstrada por Bosch et al. (2004) ao observar estágios foliculares antrais após o xenoenxerto em camundongos SCID, dois meses após o enxerto de tecido cortical ovariano criopreservado de gata. Contudo, alguns autores relataram que os folículos presentes no tecido ovariano dos felinos podem apresentar uma maior sensibilidade aos protocolos de criopreservação quando comparados a outros mamíferos devido à alta incidência de atresia folicular (BRITO et al., 2018; WOOD; MONTALI; WILDT, 1997). Além disso, a criopreservação de tecido ovariano exige a preservação de vários tipos celulares que podem variar em volume e permeabilidades de água (GOOK; EDGAR, 2021). Apesar de numerosos estudos terem sido realizados em tecido ovariano criopreservado de diferentes animais silvestres como o elefante africano *Loxodonta africana* (GUNASENA et al., 1998),

pecari de colarinho *Pecari tajacu* (LIMA et al., 2012), cutia de garupa vermelha *Dasyprocta leporina* (WANDERLEY et al., 2012), leão africano *Panthera leo* (WIEDEMANN et al. 2013), primatas não humanos (TING et al., 2013), preá de dentes amarelos de Spix *Galea spixii* (PRAXEDES et al., 2015), cutia de garupa vermelha *Dasyprocta leporina* (PRAXEDES et al., 2018) ainda é necessário estabelecer um protocolo ideal, a fim de diminuir os danos causados pela criopreservação (CAMPOS et al., 2019).

Atualmente a criopreservação é realizada por dois métodos: o congelamento lento e a vitrificação (Figura 1). O congelamento lento ou método convencional, é caracterizado pela exposição de células ou tecidos a baixas concentrações de crioprotetores, com o uso de uma máquina que faz uma curva de temperatura controlada (SANTOS et al., 2010). A vitrificação é uma técnica caracterizada pela utilização de altas concentrações de crioprotetores (ACPs) através do resfriamento rápido em nitrogênio líquido, fazendo com que as células se transformem em vidro ao invés de cristais de gelo, em uso de equipamento (BAHROUDI et al., 2022).

Figura 1: Desenho esquemático comparando a vitrificação e congelamento lento de tecido ovariano.



Fonte: Adaptado de BAHROUDI et al. (2022)

2.3. A técnica de congelamento lento de ovários

O congelamento lento é uma técnica que gradualmente resfria amostras biológicas por meio de um dispositivo a fim de preservá-las (BEHRMAN; SAWADA, 1966; BAHROUDI et al., 2022). É uma forma eficaz e simples de criopreservação de tecido ovariano (OTC) (BAHROUDI et al., 2022). Para controlar a taxa de resfriamento, é necessário utilizar um congelamento programável, em que a temperatura é regulada automaticamente e a taxa de resfriamento é de cerca de 1,5°C por minuto (VITOLLO, 2020). Essa técnica é comumente empregada em estudos científicos e em procedimentos de armazenamento de materiais biológicos.

Em felino a curva de congelamento utilizada para a criopreservação de tecido ovariano é bem estabelecida (Lima et al., 2006). O processo de resfriamento é realizado de forma gradual, a uma taxa de 2°C por minuto, partindo de 13°C até chegar a -7°C. Nessa temperatura, a amostra é mantida por um período de 10 a 15 minutos, quando então ocorre o seeding (LIMA et al., 2006). O seeding tem como objetivo evitar a formação de gelo dentro das células, favorecendo a sua formação apenas fora das células (SHAW et al., 2000). Em seguida, o resfriamento continua, porém mais lentamente, a uma taxa de 0,3°C por minuto, até atingir -35°C. Quando a temperatura atinge entre -30°C e -80°C, alcançando a fase de desidratação celular, o material é transferido para armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C. Esse procedimento de congelamento lento tem se mostrado eficaz na preservação de folículos presentes no tecido ovariano de felinos (TANPRADIT; CHATDARONG, 2011; LEONEL et al., 2018).

Diversos estudo com técnica de congelamento lento (CL) de tecido ovariano tem se mostrado eficaz na preservação da fertilidade em humanos (ANDERSEN et al., 2012; BAHROUDI et al., 2022) e em animais, como os felinos (ALI HASSAN et al., 2023; LEONEL et al., 2018a), cervos (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011), cangurus (YEOMAN; WOLF; LEE, 2005), macacos (RICHINGS et al., 2006) e ratos (SHIROMA et al., 2021). O processo envolve a queda lenta da temperatura do tecido para que a desidratação da amostra e o congelamento aconteçam lentamente (ARAV; PATRIZIO, 2019).

Em humanos, o CL de tecido ovariano é utilizado para preservar o potencial reprodutivo de pacientes com câncer que precisam passar por tratamentos como radioterapia e quimioterapia de outros órgãos, os quais podem afetar o processo normal da foliculogênese e causar infertilidade (BAHROUDI et al., 2022). A técnica permite que essas pacientes possam ter filhos no futuro, mesmo depois de terem passado por tais tratamentos. Além disso, o congelamento lento também pode ser utilizado para preservar a fertilidade de mulheres que desejam adiar a gravidez por razões pessoais ou profissionais.

Já em felinos, o CL de tecido ovariano tem se mostrado uma excelente opção para programas de conservação de espécies (MASTROMONACO; SONGSASEN, 2020). Bosch et al (2004) realizou a primeira criopreservação bem-sucedida de fragmentos de córtex congelados e descongelados de gato doméstico. Em 2013, estudo testou o CL de tecido ovariano com EG seguido de cultura *in vitro*, e relatou a presença de folículos viáveis em leopardos Amur (*Panthera pardus orientalis*), gato de pés pretos (*Felis nigripes*), onçilla (*Leopardus tigrinus*), Gato-do-mato (*Leopardus geoffroyi*), leopardo do norte da China (*Panthera pardus japonensis*), gato com manchas de ferrugem (*Prionailurus rubiginosus*), serval (*Leptailurus serval*), e Sumatran tigre (*P. tigris sumatrae*) (WIEDEMANN; ZAHMEL; JEWGENOW, 2013). Apesar disso, em felinos ainda há poucos relatos de estudos disponíveis sobre os protocolos de criopreservação. Dentre os resultados observados, Leonel et al. (2018b) testaram três soluções de crioprotetores diferentes no CL de tecido ovariano de gatas domésticas, incluindo 1,5M de DMSO + 0,4% de sacarose, 1,5M de EG + 0,4% de sacarose e 0,75M de DMSO + 0,75M de EG + 0,4% de sacarose. Após o descongelamento, a microscopia de luz não mostrou alterações na porcentagem de folículos MN (75-80%) entre as três soluções crioprotetoras, porém a microscopia eletrônica de transmissão revelou menos danos no grupo DMSO. Em outro estudo, Tanpradit et al. (2015) mostraram que a adição de sacarose na solução de congelamento lento teve efeitos positivos na viabilidade e morfologia dos folículos em gatas domésticas. Portanto, o DMSO, especialmente com sacarose, parece ser uma opção melhor que o EG para criopreservar o tecido ovariano.

Uma das vantagens do CL é a utilização de um congelador programável, no qual a temperatura é controlada automaticamente, além de possibilitar a criopreservação de várias amostras ao mesmo tempo (SANTOS et al., 2010). No entanto, apesar do CL ser uma técnica extensamente utilizada em estudos clínicos (DONNEZ et al., 2013; BAHROUDI et al., 2022), as células quando submetidas a esse método correm o risco de enfrentar estresse físico e a formação de cristais de gelo (MASUR, 1963).

Portanto, para evitar a formação de cristais de gelo intracelular, danos mecânicos celulares e o estresse osmótico, crioprotetores intracelulares, como DMSO, EG e propilenoglicol são usados durante o congelamento (MAZUR; SCHNEIDER, 1986). Além disso, geralmente são combinados diferentes crioprotetores para reduzir a toxicidade e melhorar a qualidade do tecido ovariano após a criopreservação (HERRAIZ; DIAZ-GARCIA; PELLICER, 2016). Estudos também têm sugerido a adição de antioxidantes, como a catalase (CARVALHO et al., 2013), o α -tocoferol (SILVA et al., 2011), a trealose (LUZ et al., 2011) e o resveratrol (TAKEO et al., 2014), nas soluções de vitrificação/aquecimento (GIARETTA et

al., 2013), na tentativa de minimizar danos morfológicos e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio provenientes do processo de criopreservação. Apesar do uso de baixas concentrações de crioprotetores para minimizar a toxicidade no congelamento lento, os parâmetros precisam ser ajustados devido à diversidade celular do tecido ovariano para evitar danos causados por cristais de gelo e preservar o crescimento dos folículos ovarianos (BAHROUDI et al., 2022). Dentre estes parâmetros pode-se citar a concentração de agentes crioprotetores, tempo e maneira em que o material biológico será exposto à solução crioprotetora (CAMPOS, 2019).

2.4. A vitrificação de tecido ovariano

Ao contrário do CL, que apresenta uma redução de temperatura de maneira controlada em um freezer programável, a vitrificação é caracterizada pelo resfriamento rápido em nitrogênio líquido sem a necessidade de um maquinário específico. A vitrificação apresenta vantagens em relação ao congelamento lento, como economia de tempo, dispensa de equipamentos específicos, custo reduzido e menor exigência de conhecimento técnico. Assim, essa técnica é viável para conservar recursos em condições de campo onde o equipamento não está disponível, como em parques e zoológicos, após a morte súbita ou castração de animais valiosos. Além disso, a vitrificação evita a formação de cristais de gelo prejudiciais, resultando em melhor preservação das células estromais e menor quebra da cadeia de DNA dos folículos primordiais. Isso pode levar a uma melhor função do tecido após o transplante.

Diante disso, várias pesquisas com o método de vitrificação em tecido ovariano de felinos têm sido realizadas. Brito et al. (2016) realizaram a vitrificação em córtex de ovário de gatas utilizando uma solução com meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) - com sacarose a 1M com ou sem EG em diferentes concentrações (10%, 20% ou 40%) e obtiveram resultados similares ao controle fresco de folículos MN com ou sem EG. Brito et al. (2018) não viram diferença significativa quando testaram duas soluções de crioprotetores (EG + trealose e EG + trealose + DMSO) em dois diferentes sistemas de vitrificação (fechado e aberto) com fragmentos de córtex do ovário de gata. Porém, no cultivo *in vitro* dos fragmentos, os autores relataram um maior desenvolvimento de folículos em crescimento MN quando utilizaram o sistema aberto de vitrificação com EG + trealose + DMSO.

Além disso, atualmente os procedimentos de vitrificação são realizados por meio de sistemas "abertos" e "fechados", que se diferenciam pelo contato direto ou não com nitrogênio líquido (TERREN et al., 2019). O sistema aberto é conhecido por envolver o contato direto com o nitrogênio, o que permite taxas de resfriamento extremamente rápidas. Entretanto, essa abordagem também apresenta o risco potencial de contaminação cruzada devido ao contato

direto com o nitrogênio líquido (BIELANSKI, 2012). O sistema fechado utiliza um cilindro de aço inoxidável, composto por três partes: base, filtro e tampa, com o objetivo de prevenir o contato direto das amostras com o nitrogênio líquido durante a vitrificação (CARVALHO et al., 2013). Esses dispositivos isolam termicamente as amostras, o que resulta em uma taxa de resfriamento mais lenta em comparação com os sistemas abertos (TERREN et al., 2019). De acordo com Terren et al. (2019) essa redução pode levar à formação de cristais de gelo, que podem causar morte celular ou redução na capacidade de desenvolvimento das amostras.

Diversos estudos com a técnica de vitrificação têm sido desenvolvidos com a finalidade de preservar a fertilidade e restaurar a função endócrina após o transplante (DONFACK et al., 2018; KONG et al., 2021) e humanos (LEE et al., 2019; ZHAO et al., 2022). Na prática clínica, a vitrificação de tecido ovariano tem sido utilizada com sucesso, com vários nascimentos relatados usando vitrificação de tecido ovariano em ovinos (BORDES et al., 2005) e humanos (DOLMANS; DONNEZ, 2021; KAWAMURA et al., 2013; SUZUKI, 2015). Amorim et al. (2019) relataram sobrevivência e os crescimento de folículos pré-antrais e antrais após vitrificação seguida de transplante de tecido ovariano de babuíno. Estudos têm demonstrado que a vitrificação do córtex ovariano é eficaz na preservação da morfologia dos folículos primordiais e em crescimento em gatas (MOUTTHAM, COMIZZOLI., 2017; BRITO et al., 2018; HASSAN et al., 2023). No entanto, a vitrificação pode causar estresse químico e físico devido ao resfriamento rápido e a altas concentrações de crioprotetores (FUJIHARA; KANEKO; INOUE-MURAYAMA, 2019), levando a alterações morfológicas e danos mitocondriais nos folículos (BAHROUDI et al., 2022). Esta técnica tem apresentado resultados interessantes, alcançando mais de 80,0% de folículos viáveis, através de um protocolo de vitrificação por imersão em agulha otimizado para tecido ovariano felino (HASSAN et al., 2023).

2.5. A importância da escolha dos crioprotetores na criopreservação de tecido ovariano

A criopreservação tem sido uma técnica bastante utilizada para a preservação de gametas, embriões, células somáticas, tecidos ou até mesmo órgãos inteiros. Essa técnica é caracterizada pela interrupção do metabolismo biológico do material pela exposição a baixas temperaturas, podendo ser armazenados por longos períodos em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196° C (MCGEE; MARTIN, 1962). Além disso, a viabilidade do material biológico também depende de outros fatores, como a concentração e a forma de adição dos agentes crioprotetores utilizados, o método de criopreservação escolhido e a forma de

congelamento/vitrificação e descongelamento/reaquecimento (ELMOAZZEN; ELLIOTT; MCGANN, 2005; SANTOS et al., 2009; CAMPOS et al., 2019).

Os crioprotetores são substâncias orgânicas que previnem a formação de cristais de gelo no processo de criopreservação, classificados como intracelulares ou extracelulares (MAZUR, 1984). Os intracelulares são substâncias de baixo peso molecular que penetram o interior das células prevenindo a formação de cristais de gelo no citoplasma celular. Atualmente os crioprotetores mais utilizados são o DMSO, o Propanodiol, EG e o Glicerol (AMORIM et al., 2011; BRITO et al., 2018; LEONEL et al., 2018a; HAYASHI et al., 2021).

Já os crioprotetores extracelulares são substâncias de alto peso molecular e que, portanto, não possuem a capacidade de atravessar membranas celulares, mas exercem efeitos protetores formando uma barreira menos permeável ao se fixar na membrana celular. Além disso, eles também têm a função de reduzir o choque osmótico e controlar a entrada de água nas células (SHAW; ORANRATNACHAI; TROUNSON, 2000).

Nesse sentido, a utilização dos crioprotetores é fundamental para o sucesso da criopreservação. Porém, eles podem exercer efeito tóxico quando usados em concentrações altas, por isso é necessário considerar a toxicidade de cada crioprotetor. Assim, a associação entre dois tipos de agentes crioprotetores visa viabilizar o uso dos crioprotetores em menor concentração, diminuindo o efeito tóxico na criopreservação de tecido ovariano animal (SHAHSAVARI et al., 2020).

Os crioprotetores mais frequentemente utilizados para a vitrificação e congelamento lento do tecido ovariano de macacos, humanos e felinos são EG, glicerol, 1-2-propanodiol (PrOH), sacarose e DMSO (TING et al., 2013; BRITO et al., 2018; LEONEL et al., 2018; LEONEL et al., 2019; TERRACIANO et al., 2020). De acordo com Gupta et al. (2022), foi observado que um maior percentual de folículos viáveis ao utilizar uma combinação de um crioprotetor não permeável (sacarose 0,3M) com dois crioprotetores permeáveis (DMSO EG) na vitrificação de folículos isolados de ovinos, em comparação ao uso de DMSO e EG individualmente. Resultados semelhantes foram relatados por Ghavami et al. (2014) na vitrificação de tecido ovariano de camundongos com DMSO e EG. Em felídeos, o uso de 1,5M de EG durante o congelamento lento de tecido ovariano resultou em uma menor porcentagem de folículos primordiais MN (31-51%), em comparação com os resultados de um estudo posterior de Leonel et al. (2018b). Nesse estudo, o uso de 1,5M de EG + 0,4% de sacarose durante o congelamento lento de tecido ovariano resultou em uma proporção mais elevada de folículos MN 75-80% (WIEDEMANN; ZAHMEL; JEWGENOW, 2013). Outro estudo, demonstrou que solução de vitrificação com sacarose 0,5 M melhorou a morfologia folicular

em tecido ovariano de gatas (HASSAN et al., 2023). Assim, a escolha do uso da melhor combinação de ACPs é fundamental para reduzir a toxicidade desses agentes e manter uma solução altamente viscosa para proteger as células durante o processo de congelamento e descongelamento (revisado por SHI et al., 2017).

3. JUSTIFICATIVA

Os bancos de germoplasma têm sido considerados importantes alternativas para a conservação do material genético de espécies ameaçadas de extinção, como os felinos selvagens. Nesse sentido, as tecnologias de reprodução assistida, principalmente a criopreservação de tecidos gonadais e gametas, têm se mostrado uma técnica eficaz de preservação de material genético permitindo a criação desses bancos (FAUSTINO et al., 2011, HASSAN et al., 2023).

Assim, a criopreservação de tecido ovariano é uma parte fundamental da preservação de gametas, pois permite a manutenção de um conjunto de folículos que podem ser utilizados posteriormente para recuperação de ovócitos, cultura de tecido ou transplante.

Como a fisiologia reprodutiva e a filogenética são bastante semelhantes entre as espécies de felinos, o gato doméstico (*Felis catus*) tem sido utilizado como modelo para desenvolvimento e aprimoramento de protocolos de criopreservação de tecido ovariano (HASSAN et al., 2023). Apesar dos resultados positivos apresentados na literatura, a criopreservação de gametas da espécie felina ainda apresenta um alto índice de dano folicular ao tecido ovariano após o descongelamento ou desvitrificação e há necessidade de aprimoramento das técnicas e protocolos utilizados para essa prática.

Deste modo, a utilização da combinação de agentes crioprotetores tem sido de grande utilidade para prevenir danos no tecido durante a criopreservação. Diferentes substâncias, como DMSO, EG, sacarose, rafinose, glicerol e trealose, são frequentemente utilizadas no CL e vitrificação de tecidos de mamíferos. Estudos têm investigado essas substâncias para promover a preservação dos folículos, graças às suas propriedades de aumentar a viscosidade da solução e evitar a formação de gelo intracelular e extracelular, que pode causar danos físicos às células, além de proteger tecidos e células contra o estresse osmótico (YONG et al., 2020). A combinação de sacarose e agentes crioprotetores permeáveis tem mostrado sucesso em aumentar a viabilidade folicular após a vitrificação de tecidos em várias espécies, como humanos, ratos, camundongos, cabras e gatas (YONG et al., 2020). De acordo com a pesquisa conduzida por Brito et al. (2018), foi observado que a trealose foi mais eficaz do que a sacarose na prevenção do estresse osmótico. Estudos anteriores também demonstraram que uma

concentração de 0,5 M de sacarose não traz benefícios significativos na vitrificação do tecido ovariano em felinos (MOUTTHAM; COMIZZOLI, 2016). Portanto, é crucial encontrar uma combinação ideal de agentes crioprotetores que preservem adequadamente os folículos presentes no tecido ovariano de felinos após a criopreservação, considerando a variabilidade nas respostas específicas desses agentes entre as espécies.

Portanto, devido à falta de resultados que indiquem um protocolo que causam menores danos na criopreservação de tecido ovariano em gatas, torna-se essencial conduzir um estudo comparativo, para analisar os efeitos de diferentes concentrações e combinações de crioprotetores em relação à viabilidade dos folículos após a criopreservação pelas duas técnicas, vitrificação e CL. Até o momento, a produção de embriões *in vitro* em gatos domésticos tem sido eficaz na obtenção de descendentes vivos através da transferência de embriões e até mesmo por meio da clonagem (JEWGENOW; ZAHMEL, 2020). No entanto, a criopreservação das células germinativas femininas em gatas domésticas e outros felídeos ainda requer a otimização de protocolos específicos para essas espécies, a fim de mitigar possíveis impactos e consequências que a técnica de criopreservação possa causar. Segundo Leonel et al (2019) embora o tecido criopreservado apresentasse uma alta proporção de MNFs (folículos pré-antrais primordiais) no dia 0 (crio D0), as taxas de sobrevivência dos folículos após 28 dias de transplante foram mais baixas. Diante disso, apesar dos avanços na criopreservação e posterior xenotransplante do córtex ovariano em camundongos imunossuprimidos ainda há desafios a serem superados (JEWGENOW; ZAHMEL, 2020).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAL

Testar diferentes crioprotetores e métodos de criopreservação, para estabelecer um método eficaz de criopreservação de tecido ovariano de gatas

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar a taxa de recuperação folicular do tecido ovariano descongelado/desvitrificados por meio da histologia clássica;
- Analisar a viabilidade do tecido descongelado/ desvitrificados com teste imunohistoquímico;
- Avaliar a integridade de organelas foliculares por análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

5. METODOLOGIA

5.1. Animais e coleta de ovários

Foram coletados ovários de 10 gatas híginas com até 1 ano de idade em um total de 5 réplicas, oriundos de ovariohisterectomia (OSH) eletiva (Castração de rotina), na clínica Veterinária Casa do gato (Brasília, DF). Os ovários foram transportados ao laboratório de Endocrinofisiologia, Reprodução Animal e Humana (LEFRAH/CFS/IB) em solução salina 0,9% aquecida à 37°C para os procedimentos de criopreservação e análises adicionais. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em dezembro de 2019 e janeiro de 2020.

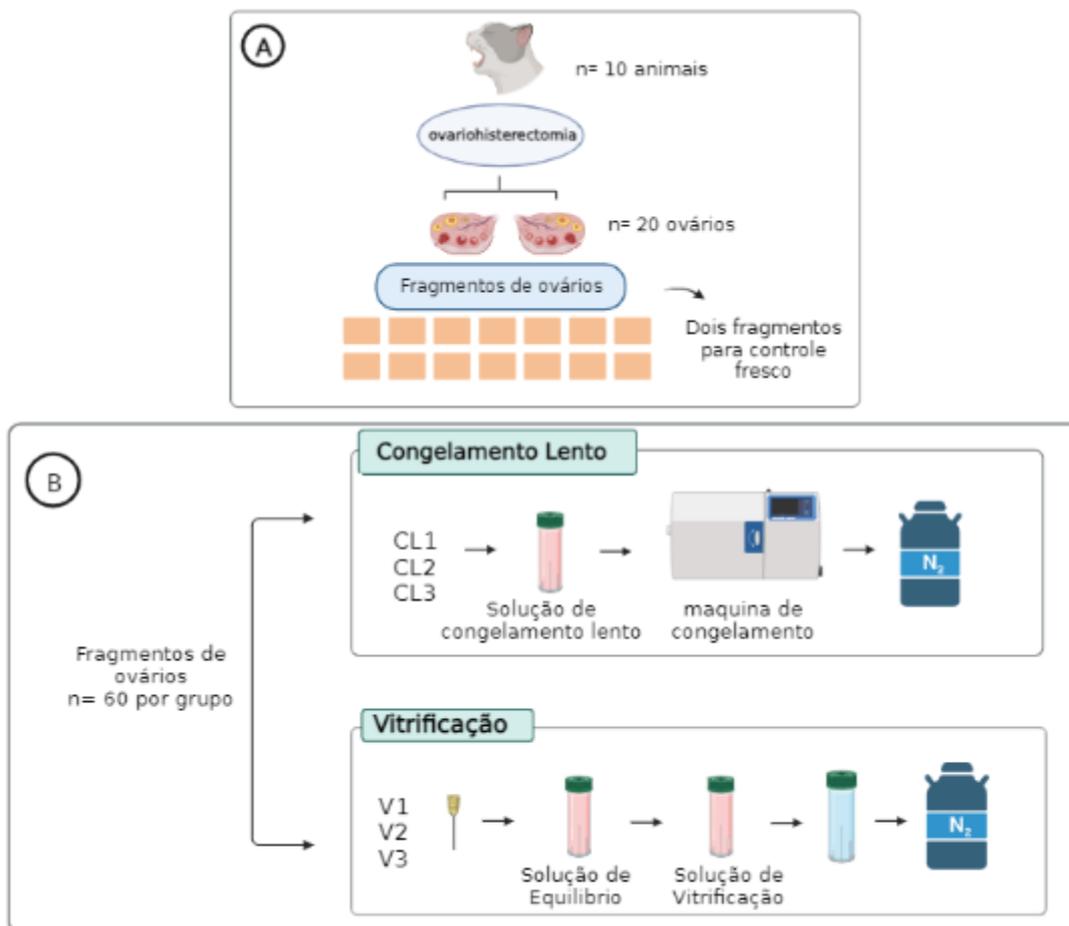
5.2. Delineamento Experimental

Cada ovário foi dividido em 8 fragmentos (3mm³) de acordo com Gorricho et al. (2018), totalizando 16 fragmentos de tecido ovariano por gata. Dois fragmentos obtidos de cada par de ovários foram fixados imediatamente como controles frescos, para análise histológica (figura 2). Os demais (dois para cada grupo) foram aleatoriamente destinados aos tratamentos de congelamento lento ou vitrificação, em soluções que consistiam em:

- Grupo vitrificação 1 (V1): solução de equilíbrio (SE): 10% DMSO +10% EG + trealose 0,1M; e a solução de vitrificação (SV): 20% DMSO + 20% EG +trealose 0,1M em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes);
- Grupo vitrificação 2 (V2): solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0,1M; e solução de vitrificação (SV), com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0,1M em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes);
- Grupo vitrificação 3 (V3): solução de equilíbrio: 20% DMSO + trealose 0,1M; e a solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M. em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes);
- Grupo congelamento lento 1 (CL1): 1M DMSO +1M EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes);
- Grupo congelamento lento 2 (CL2): 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes);

- Grupo congelamento lento 3 (CL3): 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial (MEM+ Hepes).

Figura 2. Desenho experimental. Um total de 160 fragmentos de ovários de gatas foram obtidos, sendo que 60 foram criopreservados pelo método de congelamento lento nos grupos CL1, CL2 e CL3, e outros 60 foram vitrificados nos grupos V1, V2 e V3, resultando em uma média de 20 fragmentos por grupo. O restante dos fragmentos foi imediatamente fixado como controle fresco.



Fonte: elaborado pelo autor (2023)

5.3. Criopreservação e descongelamento/reaquecimento dos fragmentos de tecido ovariano

Para a técnica de vitrificação, os fragmentos foram criopreservados de acordo com o protocolo descrito por Brito et al. (2018) modificado. Resumidamente, os fragmentos foram mantidos na solução de equilíbrio por 4 minutos e então transferidos para a solução de

vitrificação, por 1 minuto, sempre a 0°C. O processo de vitrificação foi realizado manualmente com agulha 30G x 1/2 (com a técnica NIV, do inglês *Needle Immersed*), no qual o tecido ovariano foi congelado pelo contato direto com nitrogênio líquido e imediatamente transferido para criotubos resfriados em uma temperatura de aproximadamente -196°e mantidas armazenadas por pelo menos uma semana. Para o processo de desvitrificação, os fragmentos ovarianos foram expostos à temperatura ambiente por 10 segundos e, em seguida, foram imersos em um banho-maria a 37 °C. Ao mesmo tempo, 1,5 ml de uma solução aquecida (37 °C) contendo trealose ou sacarose (dependendo do tratamento) a 0,4% em meio mínimo essencial (MEM) acrescido de 20% de soro fetal bovino foi adicionada ao criotubo, onde os fragmentos foram mantidos por um período de 5 minutos. Para a remoção da solução crioprotetora, os fragmentos foram transferidos para outra solução idêntica, mas com 0,2% de trealose ou sacarose (dependendo do tratamento), e após 5 minutos, para MEM, sem trealose ou sacarose, onde permaneceram por mais 5 minutos.

Para os grupos em que foi utilizado o método de CL, os fragmentos foram criopreservados de acordo com as alterações feitas no protocolo descrito por Lima et al. (2006). Resumidamente, os fragmentos foram colocados em criotubos contendo 1 ml da solução de congelamento, mantidos à 10 °C por 10 minutos e então transferidos para um freezer programável (Cryogen-Neovet, Uberaba-Brasil), onde foram refrigerados a uma taxa de -2°C/min até -7°C. Quando a temperatura atingiu -7 °C, a cristalização foi induzida manualmente (*seeding*), o que consistiu em tocar o tubo com uma pinça com uma ponta de algodão mergulhada em nitrogênio líquido. Em seguida os tubos criogênicos foram refrigerados no equipamento à -0,3 °C/min até atingir -35 °C. Finalmente, foram mergulhados e armazenados em um tanque de nitrogênio líquido (-196 °C) por pelo menos 7 dias.

No descongelamento, os fragmentos de tecido ovariano foram expostos à temperatura ambiente por 1 minuto e então imersos em banho-maria à 37°C por 5 min, até o descongelamento total das amostras. Assim, foram procedidos três banhos, de cinco minutos cada, em meio MEM acrescido de: 10% SFB e 0,4% sacarose ou trealose (dependendo do grupo), com concentrações decrescentes de crioprotetor (o primeiro composto por 1mL com 50% da solução de congelamento inicial e 10% SFB, o segundo 25% da solução de congelamento inicial e o último banho composto apenas por MEM) para a remoção total da solução de congelamento, a fim de diminuir o estresse osmótico causado na célula.

5.4. Incubação após descongelamento

Para recuperar a atividade folicular, após o descongelamento ou reaquecimento, os fragmentos foram incubados (em MEM + 20% SFB) em estufa à 37°C com alta umidade relativa e 5% de CO₂ por 2 horas, de acordo com LUNARDI et al., (2013). Em seguida, foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e transferidos para o álcool 70% para proceder a histologia clássica.

5.5. Análise histológica

Para a análise histológica, os fragmentos fixados em paraformaldeído 4% por 24h e mantidos em etanol 70% foram desidratados em etanol, clarificados em xileno e incluídos em Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O tecido foi seccionado em série (5µm de espessura), e um a cada cinco cortes foi utilizado para a montagem de lâminas, que foram coradas com hematoxilina/eosina (HE). Os cortes de tecido foram analisados em microscópio de luz (Leica DM500, Wetzlar, Alemanha). Os folículos foram contados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordiais e em crescimento, e em morfológicamente normais (MN) ou degenerados. Os folículos com células da granulosa uniformes, ovócitos redondos e núcleos evidentes foram considerados MN. Os folículos classificados como degenerados foram aqueles em que as células da granulosa estavam desorganizadas, os ovócitos total ou parcialmente descolados das células da granulosa, com vacúolos no citoplasma, os ovócitos com núcleos picnóticos e folículos desprendidos do tecido estromal.

5.6. Imunohistoquímica

Os cortes restantes que continham folículos observados na análise histológica foram direcionados à análise imunohistoquímica, em que foi utilizado o anticorpo primário Ki-67 para a observação de células proliferativas. O anticorpo Ki-67 é responsável por marcar células proliferativas, pois a proteína Ki-67 é expressa durante a divisão celular (SUN; KAUFMAN, 2019).

Para a imunomarcção, foram empregados 5 cortes por lâmina (6 repetições, totalizando 30 lâminas), sendo cada uma representativa de um grupo e contendo folículos ovarianos na análise histológica, de acordo com as modificações feitas no protocolo descrito por Lima et al., (2015). Inicialmente as lâminas foram desparafinizadas com 3 banhos em xilol (2 minutos cada) e banhos de um minuto em soluções decrescentes de álcool (3 vezes 100%, 95%, 80%, 70%). Logo após, foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato aquecido por uma hora. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena,

seguido do bloqueio das ligações inespecíficas, ambos com a utilização de soluções do kit. O anticorpo primário (Ki-67 anticorpo monoclonal recombinante de coelho (SP6), MA5-14520, Invitrogen) foi utilizado na diluição de 1:25 (4µl de anticorpo em 100µl de BSA), e a incubação ocorreu por dois dias.

No segundo dia, os cortes foram lavados em PBS, e em seguida, ficaram sob a ação do anticorpo secundário (Polyclonal rabbit anti-human, A0082, Dako Denmark A/S). Para a revelação, foi utilizada a solução DAB do mesmo kit que foi preparada com a luz apagada, devido à sua fotossensibilidade. Ao pipetar a solução sobre cada corte, era observada, no microscópio, a sua ação sobre o tecido. No momento em que foi percebida a marcação das células da granulosa para Ki-67, o DAB foi lavado com PBS, e a lâmina imediatamente inserida em hematoxilina por 1 segundo. É importante ressaltar que entre cada etapa da imunohistoquímica, o material foi lavado em PBS.

Por fim, ocorreu a montagem das lâminas com as lamínulas sobre os cortes com Entellan™ (*Novo rapid mounting medium for microscopy*, Darmstadt, Germany). As soluções de bloqueio, o anticorpo secundário e o DAB utilizados nas etapas descritas acima fazem parte do Kit Leica Novolink Polymer Detection System (Newcastle upon Tyne NE 12 8EW, Reino Unido).

Para as análises das amostras tratadas com Ki-67, utilizou-se o microscópio de luz para realizar a contagem dos folículos. Foram considerados positivos os folículos que apresentavam pelo menos uma das células da granulosa marcada com o anticorpo, de acordo com estudo anterior (Paulini et al., 2016).

5.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para análise ultraestrutural no intuito de verificar a integridade de organelas e outras possíveis alterações nos folículos a nível citoplasmático. Resumidamente, uma pequena amostra de cada fragmento de controle fresco, congelado/descongelado e vitrificado/reaquecido foi fixada em Karnovsky modificado (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2) por 4h e transferida para o tampão cacodilato de sódio (0,2M). As amostras foram posteriormente lavadas novamente em tampão cacodilato de sódio (0,2M), pós-fixadas com ferricianeto de potássio (1,6%) em tampão cacodilato de sódio (0,2M, pH 7.2) e tetróxido de ósmio (2%) e contrastadas *em bloco* com acetato de uranila em H₂O (0,5%) durante a noite. Os fragmentos foram então enxaguados e desidratados em concentrações crescentes de acetona e incluídos em

resina *Epon*. Após a inclusão, os cortes semi-finos (1 μm) foram cortados para localização dos folículos. Foram analisados pelo menos um folículo por grupo. Cada folículo foi submetido ao corte de seções ultrafinas de 70 nm, utilizando uma faca de diamante. Essas seções foram posteriormente montadas em grades de cobre e examinadas e fotografadas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL, JEM 1011, Japão), a fim de avaliar a ultraestrutura dos folículos ovarianos. A análise se baseou em estudos anteriores realizados em folículos de mamíferos, nos quais as organelas, membranas basais e plasmáticas, assim como o envelope nuclear de ovócitos e células da granulosa, foram minuciosamente examinados (PAULINI et al., 2014). Para identificar sinais precoces de degeneração que não puderam ser observados em menores aumentos, como na microscopia de luz, somente os folículos que apresentaram uma morfologia normal em cortes semifinos foram avaliados por TEM.

5.8. Análise estatística

Para os resultados da contagem e classificação folicular, foi avaliada a proporção entre o número bruto de folículos MN juntamente com o número de folículos degenerados. Para este e para a marcação imunohistoquímica com o anticorpo Ki-67, foram realizados testes qui-quadrado por meio do software Prism (versão 9), comparando os grupos tratados (V1, V2, V3, CL1, CL2 e CL3) entre si e com o controle fresco. Para as outras análises, foi realizada uma ANOVA de duas vias com grupos CF, CL1, CL2, CL3, V1, V2, V3. O programa Prism 9.0 (GraphPad, San Diego, Estados Unidos) foi utilizado para todos os testes ANOVA e de normalidade. Considerou-se significância para valores de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Análise histológica

No grupo controle fresco (CF) foram contados 5.348 folículos no total, sendo 4.859 classificados como primordiais, dos quais 4419 (90%) foram considerados MN e 489 folículos foram classificados como em crescimento, dos quais 442 (90%) foram considerados MN.

Nos grupos de congelamento lento (CL1, CL2 e CL3), foram identificados um total de 8.166 folículos. Dentre esses, 5.608 foram classificados como folículos primordiais, dos quais 4.937 (88%) foram considerados morfologicamente normais (MN), e 2.558 foram identificados como folículos em crescimento, sendo 1.171 (46%) deles MN. No grupo CL1, foram encontrados 1623 folículos, dos quais 1249 (77%) eram primordiais MN e 128 foram

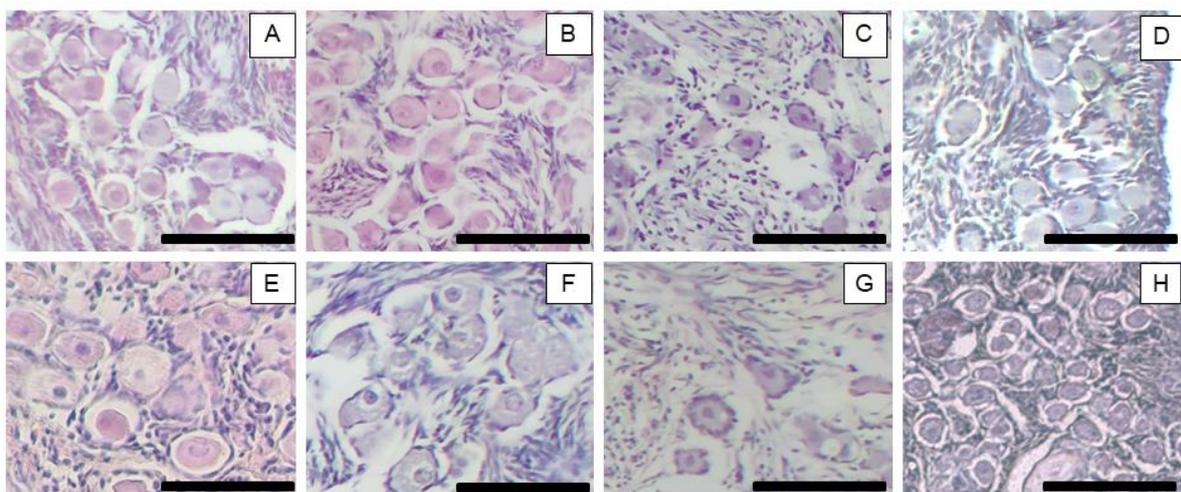
identificados como folículos em crescimento MN. Já no grupo CL2, foram encontrados 2273 folículos, sendo que 1910 (84%) eram primordiais MN e 331 foram identificados como folículos em crescimento MN. Por fim, no grupo CL3 foram encontrados 4035 folículos, dos quais 1778 (44%) foram considerados primordiais MN e 712 foram identificados como folículos em crescimento MN.

Já nos grupos de vitrificação (V1, V2 e V3), foram contados 19.008 folículos no total, sendo 14.188 classificados como primordiais (Figura 3), dos quais 13.563 (95,6%) considerados MN e 4.820 folículos em crescimento, dos quais 4.249 (88,2%) foram considerados MN.

Em relação aos folículos primordiais MN, o grupo V2 mostrou um número maior de folículos MN quando comparado com o controle fresco. Embora o grupo de vitrificação V1 (que utilizou a combinação dos crioprotetores DMSO, EG e trealose) não tenha tido a maior porcentagem de folículos MN, não foram observadas diferenças em relação ao CF. No entanto, foram observadas diminuições significativas ($p < 0,003571$) para os números de folículos MN nos grupos V3, CL1, CL2, CL3 em comparação com o CF. Já na comparação entre os grupos, em geral, o número total de folículos primordiais MN foi menor nos grupos de congelamento lento em comparação à vitrificação (Figura 4).

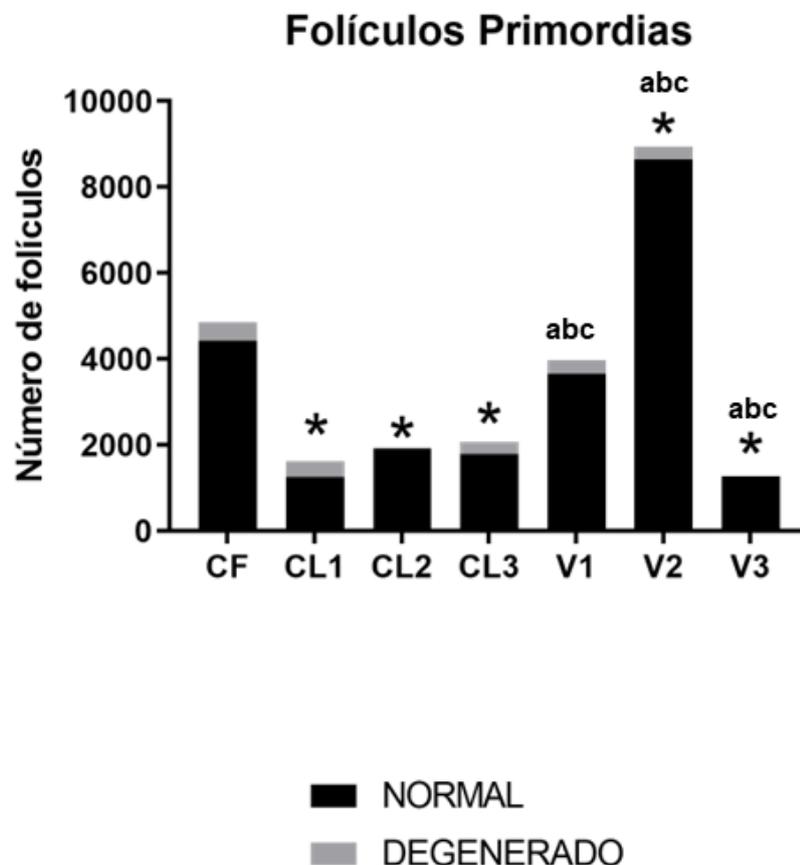
Assim, os resultados mostraram uma redução significativa na população de folículos primordiais em todos os grupos de CL e no grupo V3 em comparação ao grupo controle fresco após a criopreservação e descongelamento/reaquecimento dos fragmentos de tecido ovariano.

Figura 3. Microfotografias de folículos primordiais do tecido ovariano de gatas domésticas fresco e criopreservado corados com Hematoxilina e Eosina. (A) grupo CL1, (B) grupo CL2, (C) grupo CL3, (D) grupo V1, (E) grupo V2, (F) grupo V3, (G) grupo CF, (H) grupo CF.



CF: Controle fresco. CL1 fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1M de DMSO +1M de EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. CL2: fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose. CL3: fragmentos submetidos ao congelamento lento 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. V1: fragmentos submetidos à vitrificação com solução de equilíbrio (10% DMSO +10% EG + trealose 0,1M) e solução de vitrificação (20% DMSO + 20% EG +trealose 0,1M). V2: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0. 1M e solução de vitrificação:, com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0. 1M. V3 fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 20% DMSO + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M. Barra: 50 µm. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Figura 4. Representação gráfica da análise estatística a partir do número de folículos primordiais morfologicamente normais e degenerados. Todas as comparações entre grupos foram realizadas, no entanto, apenas as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,003571$) foram apresentadas no gráfico.

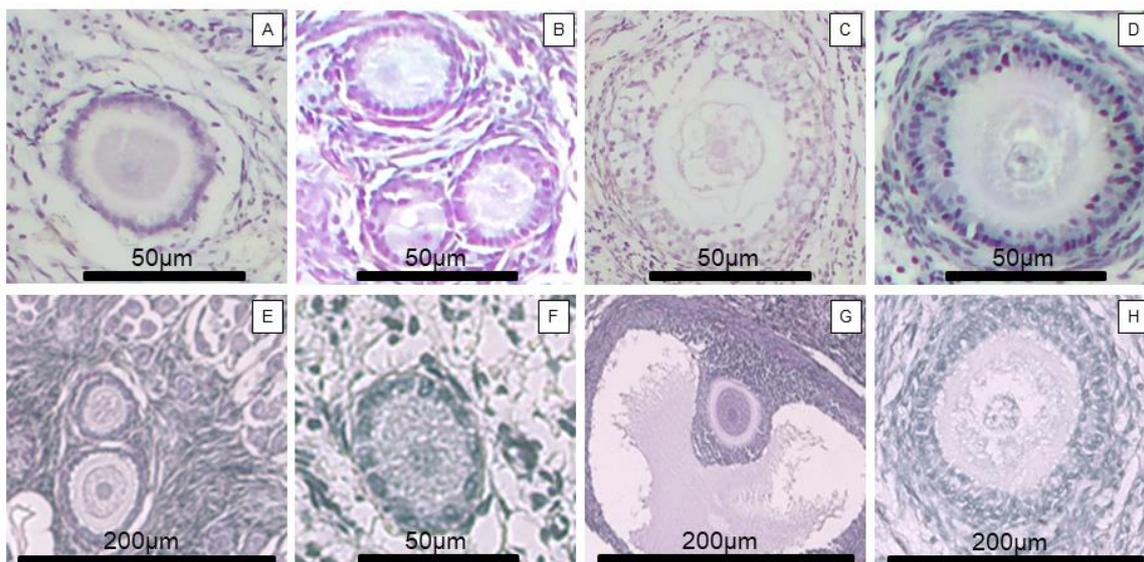


CF: Controle fresco. CL1 fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1M de DMSO +1M de EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. CL2: fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose. CL3: fragmentos submetidos ao congelamento lento 1,5M DMSO + 10%

SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. V1: fragmentos submetidos à vitrificação com solução de equilíbrio (10% DMSO +10% EG + trealose 0,1M) e solução de vitrificação (20% DMSO + 20% EG +trealose 0,1M). V2: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0. 1M e solução de vitrificação:, com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0. 1M. V3 fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 20% DMSO + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M. * = diferença significativa em relação ao controle fresco. a, b, c - Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,003571$) entre os grupos. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Com relação aos folículos em crescimento, os grupos de vitrificação (V1, V2 e V3) não tiveram uma diminuição significativa no número de folículos MN quando comparados ao controle fresco. Apesar de não serem observadas diferenças significativas entre os grupos de vitrificação, na contagem de número de folículos, o grupo V1 teve um maior número de folículos MN. Já nos grupos de congelamento lento, o CL1 e o CL3 apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,003571$) no número de folículos MN em comparação ao controle fresco (Figura 5). Ao se comparar os dois tratamentos de criopreservação, os grupos CL1 e CL3 tiveram uma diminuição significativa de folículos em crescimento em relação aos grupos de vitrificação V1, V2 e V3 ($p < 0,003571$), enquanto o grupo CL2 não mostrou essa diminuição significativa na porcentagem de folículos MN em comparação aos grupos de vitrificação (V1, V2 e V3) ($p < 0,003571$).

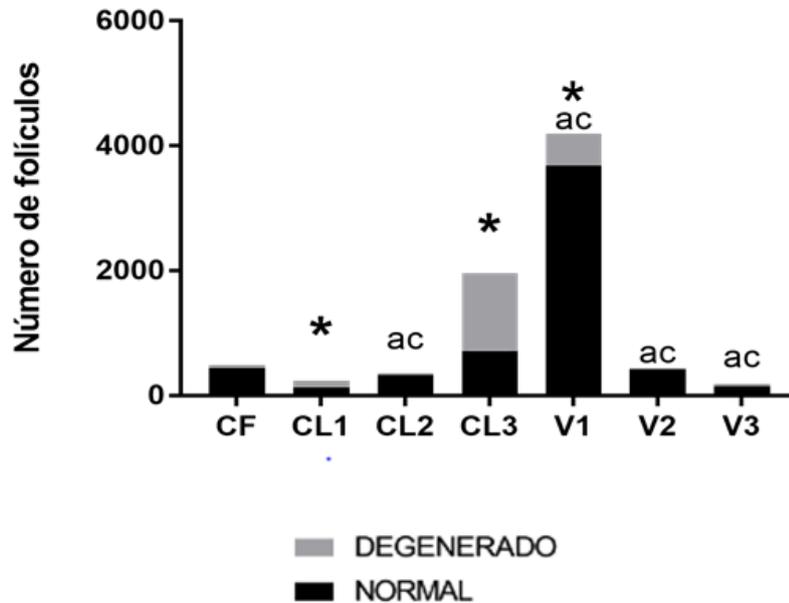
Figura 5. Microfotografias de folículos em crescimento do tecido ovariano de gatas domésticas fresco e criopreservado corados com Hematoxilina e Eosina. (A) grupo CL1, (B) grupo CL2, (C) grupo CL3. (D) F grupo V1, (E) grupo V2, (F) grupo V3, (G) grupo CF, (H) grupo CF.



CF: Controle fresco. CL1 fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1M de DMSO + 1M de EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. CL2: fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose. CL3: fragmentos submetidos ao congelamento lento 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. V1: fragmentos submetidos à vitrificação com solução de equilíbrio (10% DMSO + 10% EG + trealose 0,1M) e solução de vitrificação (20% DMSO + 20% EG + trealose 0,1M). V2: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0,1M e solução de vitrificação:, com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0,1M. V3 fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 20% DMSO + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M.

Figura 6. Representação gráfica da análise estatística a partir do número de folículos em crescimento morfológicamente normais e degenerados dos grupos CF, V1, V2, V3, CL1, CL2 e CL3. Todas as comparações entre grupos foram realizadas, no entanto, apenas as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,003571$) foram apresentadas no gráfico.

Folículos em crescimento



Grupos: V1 = fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio composta por 10% DMSO + 10% EG + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 20% DMSO + 20% EG + trealose 0,1M. V2: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0,1M e solução de vitrificação: com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0,1M. V3 fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 20% DMSO + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M. CL1 submetidos ao congelamento lento com 1M DMSO + 1M EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. CL2: fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose. CL3: fragmentos submetidos ao congelamento lento 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. * = diferença significativa em relação ao controle fresco. a, b, c - Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,003571$) entre os grupos. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

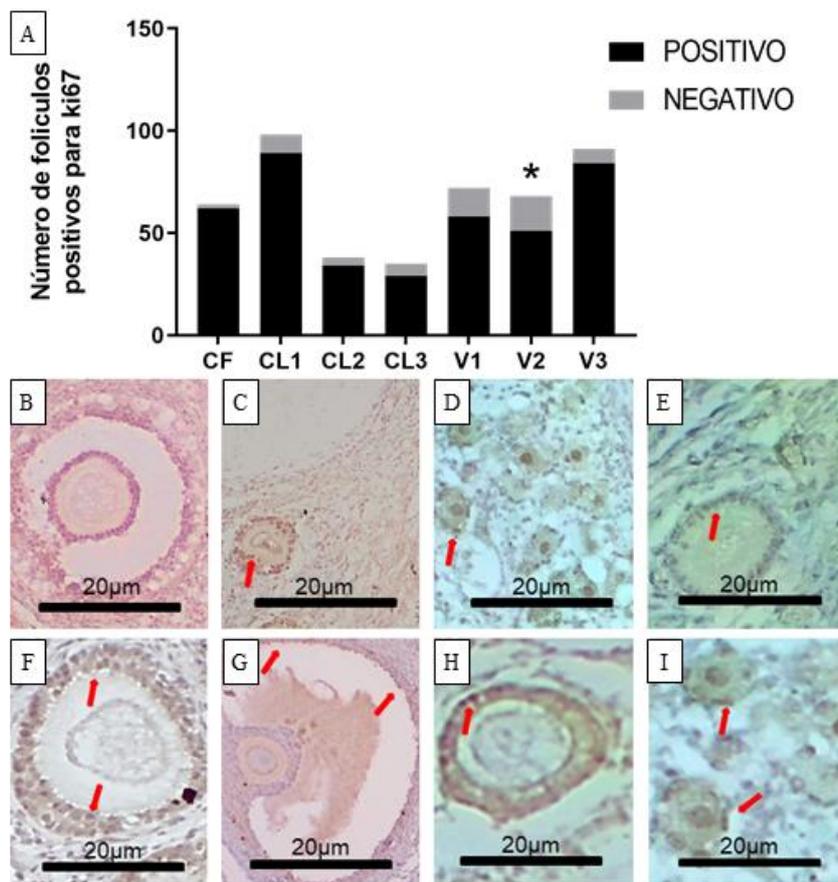
Além disso, as principais degenerações encontradas nos grupos criopreservados e no controle fresco foram ovócitos totalmente descolados do folículo e folículos descolados do estroma. Neste estudo, o CL3 foi o grupo que mais apresentou degeneração citoplasmática e nuclear nos folículos analisados.

6.2. Análise da proliferação celular

O estado proliferativo da população de células ovarianas foi avaliado por imunomarcagem com o anticorpo monoclonal (Ki-67 anticorpo monoclonal recombinante de coelho (SP6), MA5-14520, Invitrogen). Ao todo, foram analisados 402 folículos nos grupos de

criopreservação, dos quais 345 (85,82%) apresentaram a coloração nuclear positiva das células da granulosa. No controle fresco, foram analisados 64 folículos, sendo que 62 (96,87%) apresentaram a coloração nuclear positiva das células da granulosa. O número de folículos em crescimento positivo para Ki-67 é apresentado na Figura 6. Os folículos considerados positivos foram aqueles que apresentaram ao menos uma célula da granulosa positiva para Ki-67 (células com coloração marrom), conforme a Figura 5.

Figura 7. Representação gráfica da análise estatística e microfotografias da imunohistoquímica de proliferação celular do tecido ovariano utilizando o anticorpo Ki-67 nos grupos CF, V1, V2, V3, CL1, CL2 e CL3. (A) Análise estatística a partir do número de folículos em crescimento positivos e negativos para Ki-67, nos grupos controle fresco e nos grupos de criopreservação. Letra B: controle negativo sem anticorpo primário. Letras C-I: Tecido ovariano de gatas marcado com o anticorpo Ki-67 e corado com Hematoxilina. Os folículos considerados positivos foram aqueles que apresentaram ao menos uma célula da granulosa positiva para Ki-67 (células com coloração marrom). Todas as comparações entre grupos foram realizadas, no entanto, apenas as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram apresentadas no gráfico.



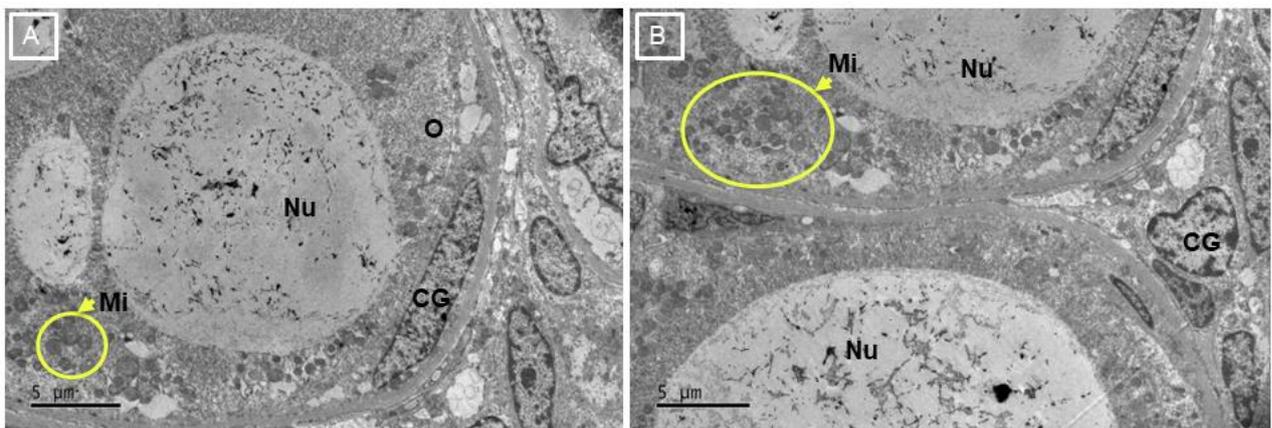
V1: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio composta por 10% DMSO +10% EG + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 20% DMSO + 20% EG +trealose 0,1M. V2: fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 10% DMSO + 10% EG + sacarose 0,1M e solução de vitrificação: com 20% DMSO + 20% EG + sacarose 0,1M. V3 fragmentos submetidos à vitrificação com a solução de equilíbrio com 20% DMSO + trealose 0,1M; e solução de vitrificação: 40% DMSO + trealose 0,1M. CL1 fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1M DMSO +1M EG + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. CL2: fragmentos submetidos ao congelamento lento com 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% sacarose. CL3: fragmentos submetidos ao congelamento lento 1,5M DMSO + 10% SFB + 0,4% trealose em meio mínimo essencial. * = indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento em relação ao controle. Barras = 20 μm . Fonte: elaborado pelo autor (2023)

O número médio de folículos negativos para Ki-67 foi significativamente mais elevado ($p < 0,05$) no grupo V2 em comparação com o controle fresco. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o V2 em comparação com os outros grupos.

6.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na microscopia eletrônica de transmissão do controle fresco, foi possível observar boa adesão entre os ovócitos e a zona pelúcida, bem como núcleos celulares e mitocôndrias morfológicamente normais, relativamente próximos ao núcleo nas células da granulosa. Em geral, os ovócitos apresentaram citoplasma homogêneo e pouco eletrodense, com forte adesão das células da granulosa (Figura 7).

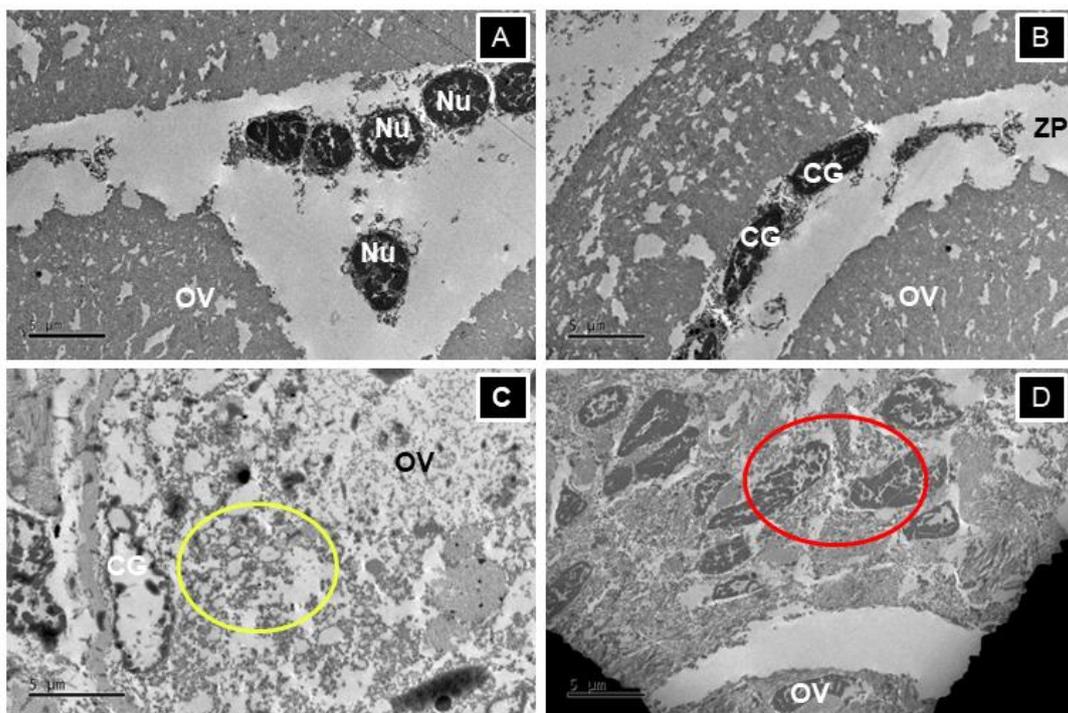
Figura 8. Micrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais em tecido ovariano de gata fresco. (A) Ovócito (O) com citoplasma bem estrutura e mitocôndrias distribuídas em grupos. (B) Forte adesão entre ovócito e células da granulosa (GC), mitocôndrias.



CG: camada de células da granulosa, Mi: mitocôndrias com morfologia normal. Nu: Núcleos do ovócito, O: ovócito. Barra: 5 um.

Nas análises realizadas nos folículos antrais do grupo V2, foram observadas alterações ultraestruturais, incluindo descolamento entre o ovócito e a zona pelúcida. Apesar disso, foi possível identificar núcleos contendo nucléolos e heterocromatina. Na figura 8A, devido à forma arredondada do núcleo das células foliculares, é provável que os folículos observados já tenham deixado o estágio primordial. Já o ovócito apresentou um citoplasma homogêneo e pouco eletrondenso, com pouca aderência das células da granulosa. Na figura 8D, uma região mais extensa do estroma é destacada. O núcleo alongado na parte inferior da imagem é uma célula da granulosa. Na figura 8C o citoplasma das amostras não era homogêneo, porém foi possível observar núcleos do ovócito e boa aderência a células da granulosa.

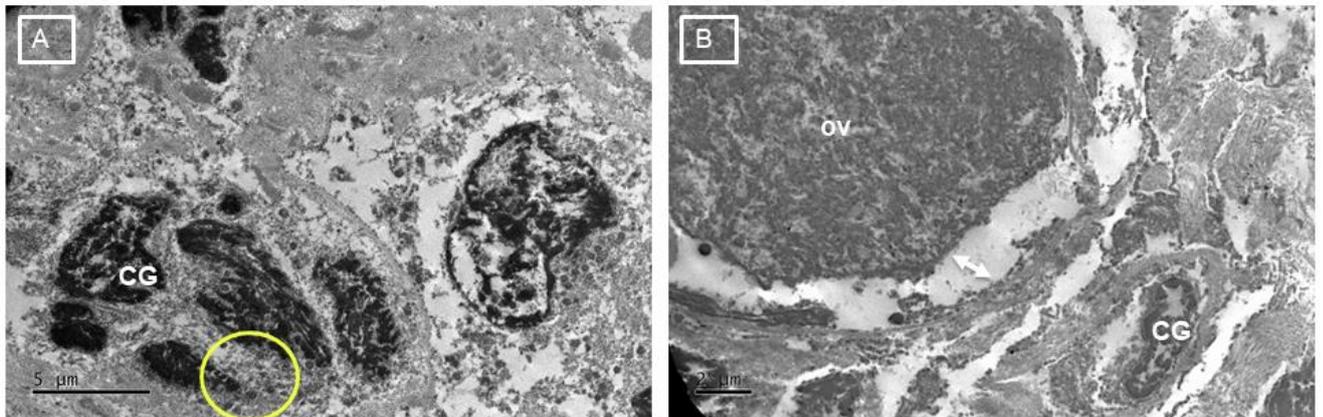
Figura 9. Micrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais do grupo V2. (A-B) Folículo mostrando o desprendimento do ovócito (Ov) das células da granulosa (GC). (C) Forte adesão entre ovócito e células da granulosa (GC). (D) Região do estroma, com células da granulosa.



CG: células da granulosa. Nu: Núcleos da célula da granulosa, ZP: zona pelúcida, OV: ovócito, círculo amarelo: degenerações no citoplasma, círculo vermelho: região do estroma. OV: ovócito. Barra: 5 um.

A análise dos folículos do grupo V1 tratados com DMSO+EG+trealose (Figura 9) revelou algumas características indesejáveis. Foi observado o descolamento do ovócito em relação às células da granulosa, sendo essa a principal alteração identificada (Figura 9A). Apesar disso, foi possível encontrar núcleos celulares morfologicamente normais, contendo nucléolo arredondado e alongado e mitocôndrias com distribuição homogênea na célula da granulosa.

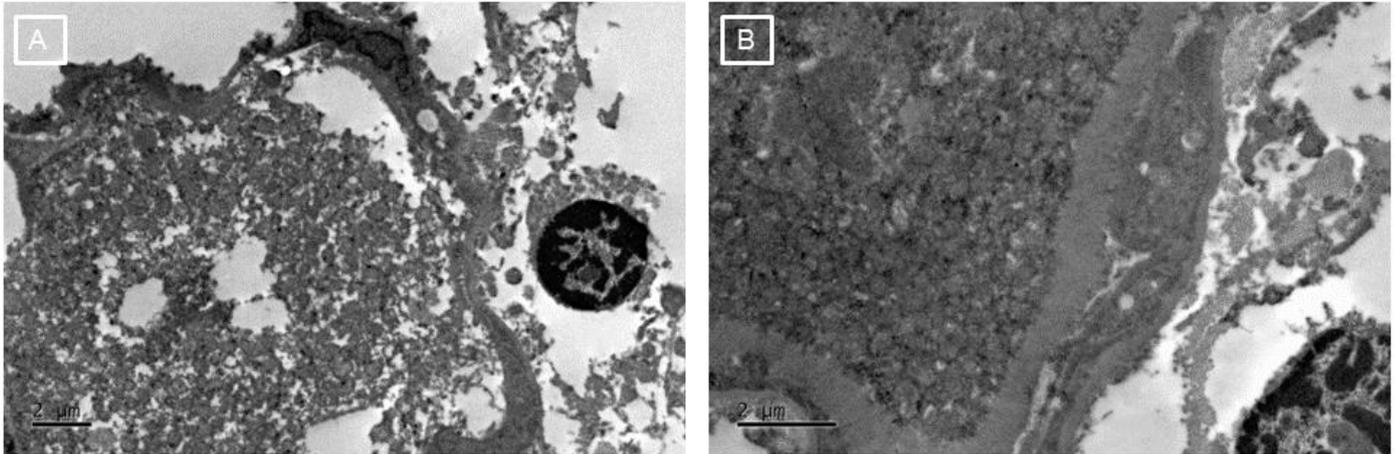
Figura 10. Micrografia eletrônica de transmissão de folículos pré-antrais do grupo V1. (A) Célula da granulosa com mitocôndrias. (B) Folículo mostrando o desprendimento do ovócito (Ov) das células da granulosa (GC).



CG: camada de células da granulosa. OV: ovócito, círculo amarelo: mitocôndrias. Barra: 5 µm.

No grupo CL2, o citoplasma apresentava sinais de degeneração e estava com aspecto "lavado". A figura 11A mostra o rompimento da membrana plasmática em vários pontos. Na figura 11B o citoplasma do ovócito era homogêneo e não foi possível observar núcleos com nucléolos e heterocromatina.

Figura 11. Micrografia eletrônica de transmissão de transmissão da região do estroma do grupo CL2. (A) Folículo degenerado. (B) Folículo com numerosas degenerações ultraestruturais



7. DISCUSSÃO

O presente estudo testou diferentes protocolos e métodos de criopreservação de tecido ovariano felino, a fim de comparar o efeito do congelamento lento e da vitrificação na criopreservação de tecido ovariano de gatas domésticas.

A análise inicial da histologia evidenciou que a vitrificação é mais adequada do que o método de congelamento lento para a criopreservação de tecido ovariano de gatas, e que o EG + DMSO + trealose (Grupo V1) foram os agentes crioprotetores mais adequados para a vitrificação com base na avaliação da morfologia dos folículos sob microscopia de luz.

Na literatura, a contagem de folículos primordiais e em crescimento MN é amplamente utilizada como o índice principal para avaliar a eficiência da criopreservação do tecido ovariano. Neste estudo, observou-se que a vitrificação resultou em uma contagem maior de folículos primordiais e em crescimento MN em comparação ao congelamento lento. No entanto, em um estudo anterior conduzido por Tanpradit et al. (2015), verificou-se que o congelamento lento com 1,5M de DMSO e sacarose (0, 1 ou 0,3 M) foi mais eficiente do que a vitrificação (solução de equilíbrio - SE: 0,96M de DMSO e 1,25M de EG; solução de vitrificação - SV: 1,92M de DMSO e 2,42M de EG) na avaliação da viabilidade folicular, histologia e apoptose em tecido ovariano de gatas. Outro estudo, usou 0,75 M de DMSO + 0,75 M de EG e 0,4% sacarose durante congelamento lento de tecido ovariano de gatas e observaram 75% de folículos MN após descongelamento (LEONEL et al.,2018). Essas discrepâncias de resultados podem estar relacionadas à variação na quantidade e distribuição dos folículos, tamanho do tecido e ao uso de diferentes tipos e concentrações de crioprotetores.

A comparação entre as taxas de sobrevivência da vitrificação e do congelamento lento também foi realizada em outras espécies. Lee et al. (2019) relataram que o congelamento lento

(7,5%, 10% e 12,5% de DMSO) foi mais eficiente do que a vitrificação (SE: 7,5% de DMSO + 7,5% de EG; SV: 20% de EG + 20% de DMSO) na preservação de folículos primordiais, neovascularização, proliferação de células foliculares, dano ao DNA e expressão de AMH em tecido ovariano humano. No entanto, Gastal et al. (2019) relataram que a criopreservação de tecido ovariano de equinos por vitrificação ou congelamento lento resultou em efeitos semelhantes na preservação de folículos em crescimento. Além disso, um estudo prévio realizado em tecido ovariano de ovelhas comparando a vitrificação e o congelamento lento obteve resultados semelhantes em relação à porcentagem de folículos viáveis, embora a vitrificação tenha preservado melhor a morfologia folicular em comparação ao congelamento lento (LABRUNE et al., 2020).

Além disso, o tipo e a concentração dos crioprotetores são fatores cruciais para o sucesso da vitrificação do tecido ovariano. Neste estudo, utilizamos a combinação de EG + DMSO + trealose (V1) e observamos resultados promissores tanto na preservação da população de folículos primordiais quanto na população de folículos em crescimento. Em um estudo conduzido por Brito et al. (2018), empregando a mesma concentração de DMSO e EG (SE: 10% DMSO + 10% EG + 0,1M de trealose; SV: 20% EG + 20% DMSO + 0,1M de trealose), obteve uma taxa de sobrevivência de 38-45% em folículos primordiais e em desenvolvimento imediatamente após a vitrificação. Esses resultados são consistentes com um estudo anterior em bovinos, no qual foi alcançada uma taxa de mais de 80% de preservação de folículos em crescimento ao utilizar DMSO e EG associados à sacarose (SE: 10% DMSO + 10% EG + 0,25M de sacarose; SV: 20% EG + 20% DMSO + 0,25M de sacarose) para a vitrificação de tecido ovariano (SHAHSVARI et al., 2020).

A associação de DMSO e EG (SE: 7,5% DMSO + 7,5% EG e SV: 15% EG + 15% DMSO) em conjunto com sacarose 0,5 M também foi utilizada por Mouttham e Comizzoli (2016) para a vitrificação de tecido ovariano de gatas e demonstrou 67,5% de folículos MN. Em relação aos agentes crioprotetores, um estudo anterior indicou que a solução crioprotetora composta por dois crioprotetores intracelulares como o DMSO e EG em conjunto com ACPs não permeáveis é menos tóxica que a solução que utiliza apenas um crioprotetor intracelulares (YOUM et al., 2014). Isso ocorre porque a associação de diferentes ACPs resulta em baixas concentrações individuais para atingir suas propriedades específicas, consequentemente diminuindo a toxicidade específica de cada ACPs (WUSTEMAN; ROBINSON; PEGG, 2004). Da mesma forma, isso sugere que, para a criopreservação de tecido ovariano de gatas, a associação de dois ou mais crioprotetores pode minimizar os efeitos deletérios, pois reduz a concentração de um deles, mantendo a viscosidade necessária para vitrificar a amostra

(revisado por SHI et al., 2017). Em contrapartida, a utilização de diferentes agentes crioprotetores pode afetar o pH e a osmolalidade do tecido ovariano, o que pode afetar a viabilidade celular durante o processo de criopreservação e descongelamento. Por isso que é importante manter hiperosmolaridade durante a processo de criopreservação para que interajam e estabilizam as membranas celulares, atuando como tampão salino no combate aos efeitos deletérios das altas concentrações de eletrólitos nas células desidratadas (KIM et al., 2018).

A trealose é um crioprotetor não permeável que tem apresentado resultados positivos na vitrificação de tecido ovariano de gatas (BRITO et al., 2018). Nosso estudo demonstrou que o uso da trealose resultou em um aumento na preservação de folículos em crescimento MN, em comparação com a sacarose. Uma possível explicação para isso reside nas propriedades físico-químicas da trealose, que reduzem a formação de cristais de gelo prejudiciais devido à sua temperatura vítrea elevada. Essa temperatura vítrea atua como uma defesa, protegendo as células contra os danos causados pelo congelamento (OLGENBLUM; SAPIR; HARRIES, 2020). Esse achado é consistente com outros estudos de Brito et al (2018) em que tecido ovariano felino vitrificado com trealose mostrou a presença de folículos primordiais e secundários com morfologia bem preservada.

A duração do tempo de exposição ao meio de equilíbrio durante a vitrificação também é um fator importante a ser considerado. Um estudo anterior testou diferentes tempos de exposição (1, 3 e 15 minutos no meio de equilíbrio e 45 segundos, 1 e 5 minutos na solução de vitrificação) para a vitrificação de folículos isolados de tecido ovariano de ovelhas. Neste estudo, foi relatado que um tempo de exposição de 4 minutos no meio de equilíbrio e 45 segundos na solução de vitrificação, combinado com o uso de crioprotetores não permeáveis (0,3 M de sacarose) e crioprotetores permeáveis (1,4 M de DMSO e 1,8 M de EG no meio de equilíbrio, e 3,5 M de DMSO e 4,5 M de EG na solução de vitrificação), resultou no maior percentual de folículos viáveis (GUPTA et al., 2022). No presente estudo, utilizamos um protocolo semelhante, com 4 minutos de exposição ao meio de equilíbrio e 1 minuto na solução de vitrificação, em combinação com crioprotetores não permeáveis (0,1 M de sacarose e 0,1 M de trealose) e crioprotetores permeáveis (DMSO e EG). Os resultados foram promissores na preservação dos folículos primordiais e em crescimento. Brito et al. (2018) também utilizaram o mesmo tempo de exposição de 4 minutos na vitrificação de tecido ovariano de gatas, usando uma combinação de EG, DMSO e trealose (0,1 M), resultando em 45% de folículos primordiais viáveis e 38% de folículos em crescimento viáveis após a criopreservação.

No congelamento lento, observamos 91% de folículos em crescimento MN ao usar uma associação de DMSO e sacarose (CL2) com base na avaliação da morfologia dos folículos.

Nossos resultados corroboram com Leonel et al. (2018), que obtiveram 76% de folículos em crescimento MN utilizando o mesmo protocolo (1,5M DMSO e sacarose 0,4%). Os autores relataram que o DMSO manteve a integridade morfológica do folículo no congelamento lento de tecido ovariano de gatas. Em contrapartida, Mouttham e Comizzoli (2016) relataram que o protocolo sem sacarose apresentou número maior de folículos viáveis, apesar do protocolo com sacarose ter o maior número de folículos MN.

No presente estudo, a associação de 1M de EG e 1M de DMSO (CL1) no congelamento lento acarretou declínio no número de folículos MN em crescimento quando comparado aos demais grupos. Estes resultados são consistentes com os do estudo anterior de Leonel et al. (2018), que usou a mesma associação no congelamento lento e obteve 70% de folículos MN em crescimento. Porém, na avaliação da ultraestrutura folicular, a associação entre DMSO e EG teve um efeito deletério com alterações ultraestruturais nos folículos analisados sob microscopia eletrônica de transmissão após criopreservação de tecido ovariano de gatas domésticas (LEONEL et al., 2018b). Segundo os autores, a associação entre dois agentes crioprotetores resultou em concentrações mais baixas para induzir um efeito protetor. Porém, ainda segundo eles, a diminuição da concentração aumenta a chance de formação de cristais de gelo, portanto a criopreservação de tecido ovariano de gatas exige uma concentração mínima de cada crioprotetor para ser eficaz.

A diminuição da população folicular MN observada após a criopreservação, de modo geral, pode estar relacionada aos danos causados pela própria técnica. Segundo Mullen e Crister (2007), a formação de cristais de gelo intra e extracelulares podem causar lesões nos tecidos.

Diante disso, as degenerações podem ser indicativas de perda folicular, causadas pela criopreservação (DOLMANS; DONNEZ, 2021). No presente estudo, foram identificadas degenerações, como ovócitos totalmente descolados do folículo e folículos descolados do estroma, em todos os grupos criopreservados, indicando que a criopreservação por si só não foi capaz de gerar alterações morfológicas. Contudo, atualmente, esses folículos podem ser isolados do tecido estromal cortical e aproveitados em diversas aplicações, como no processo de tecido descelularizado, no encapsulamento em alginato e no cultivo tridimensional na área da bioengenharia tecidual. Essas técnicas proporcionam uma estrutura tridimensional que oferece um ambiente adequado para adesão, migração, diferenciação e proliferação celular. Isso é fundamental para o sucesso da regeneração de tecidos. Segundo Xiao et al (2015) folículos secundários encapsulados em alginato foram capazes de maturar até o estágio de ovócito metáfase II.

Em relação aos resultados imunohistoquímicos do Ki-67, o maior número de folículos negativos para Ki-67 foi encontrado no Grupo V2 em relação ao controle. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas no número de folículos proliferativos entre os demais grupos após criopreservação. Isso mostrou que, independentemente do tratamento, há evidência de proliferação celular nos folículos em crescimento de todos os grupos.

De acordo com Montano Vizcarra et al. (2020) o Ki-67 é um indicador de viabilidade usado para avaliar a atividade proliferativa após o descongelamento, pois marca apenas quando o ácido desoxirribonucleico nuclear (DNA) está proliferativo. A manutenção da proliferação celular em tecido ovariano de gatas já foi previamente observada em outros estudos com criopreservação por vitrificação e cultivo *in vitro* (BRITO et al., 2018) por congelamento lento e xenotransplante (BOSCH et al., 2004) demonstrando que a continuidade da proliferação celular pode ser mantida após ambos os procedimentos. Em humanos, caprinos e macacos também foram observadas evidências de proliferação celular por meio da marcação positiva de Ki-67 após a vitrificação de tecido ovariano (DOLMANS et al., 2015; LEE et al., 2019; MONTANO VIZCARRA et al., 2020). Outros estudos relataram que a vitrificação é melhor do que o congelamento lento na criopreservação de tecidos ovarianos de gatos, cães e humanos no que diz respeito à viabilidade folicular após o descongelamento (XIAO et al., 2010; FUJIHARA et al., 2012; BORRÁS et al., 2022).

Em relação a análise ultraestrutural, o congelamento lento apresentou alterações na região do estroma e nos fibroblastos, principalmente nas áreas centrais do citoplasma. Estudos anteriores relataram o impacto negativo da técnica nas células do estroma ovariano em humanos (KEROS et al., 2009; DATH et al., 2010) e em gatos (BOSCH et al., 2004). Segundo a literatura, o congelamento lento é mais suscetível aos danos causados pela formação de cristais de gelo (BEHL et al., 2023), enquanto a vitrificação evita formação de cristais de gelo devido à alta taxa de crioprotetores. Em relação à vitrificação, a análise dos folículos tratados com DMSO+EG+trealose revelou resultados positivos, com núcleos celulares normais, nucléolos bem estruturados e mitocôndrias distribuídas de forma homogênea nas células da granulosa. Entretanto, uma característica indesejável foi observada, que é o descolamento do ovócito em relação às células da granulosa.

No presente estudo, foi observado que, após o descongelamento/reaquecimento, não houve diferença significativa na morfologia ultraestrutural dos folículos vitrificados com DMSO, EG e trealose em comparação com os folículos vitrificados com DMSO, EG e sacarose. No entanto, a presença de trealose na solução de criopreservação parece ter tido um efeito protetor sobre a morfologia ultraestrutural do tecido vitrificado em comparação com o

congelamento lento. Da mesma forma, em um estudo anterior, Xiao et al. (2013) constataram que a vitrificação resultou em uma maior preservação da integridade folicular e uma morfologia estromal superior em comparação com o congelamento lento. Brito et al (2018) demonstraram que associação DMSO, EG e trealose na solução de vitrificação preservou morfologia de folículos em desenvolvimento e proliferação de células da granulosa após o cultivo *in vitro*. Esses resultados indicam que a combinação de DMSO, EG e trealose como crioprotetores pode representar uma abordagem promissora para mitigar os efeitos negativos da criopreservação na ultraestrutura dos folículos ovarianos. Acredita-se que a trealose exerça seus efeitos benéficos ao atuar como um agente osmoprotetor, reduzindo o estresse osmótico nas células durante os processos de congelamento e descongelamento. Portanto, essa estratégia se mostra viável para preservar a integridade estrutural dos folículos ovarianos de gatas.

8. CONCLUSÃO

A vitrificação com DMSO, EG e trealose (grupo V1) foi identificada como a combinação mais eficiente para a criopreservação do tecido ovariano de gatas. Essa técnica mostrou-se capaz de preservar a morfologia dos folículos primordiais e em crescimento, além de manter a proliferação das células foliculares, resultando em uma menor taxa de degeneração dos folículos. Embora o congelamento tenha apresentado resultados promissores em outros estudos, a vitrificação (grupo V1) foi superior na preservação da morfologia dos folículos neste trabalho. A análise de microscopia eletrônica dos folículos vitrificados também revelou aspectos positivos quando comparada ao congelamento lento, como núcleos celulares normais, nucléolos bem estruturados e mitocôndrias com distribuição homogênea nas células da granulosa. Com base nos resultados positivos do nosso estudo, conclui-se que o uso combinado desses três crioprotetores pode ser mais eficaz do que quando utilizados isoladamente na vitrificação de tecido ovariano de gatas. Entretanto, é imprescindível que mais estudos sejam conduzidos para avaliar a capacidade de desenvolvimento dos folículos após o processo de criopreservação, incluindo uma análise mais detalhada sobre a ocorrência de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose e o desenvolvimento folicular por cultivo *in vitro* ou transplante. Essa avaliação seria crucial para confirmar a eficácia do método de criopreservação utilizado e garantir a viabilidade e funcionalidade dos folículos após o descongelamento.

9. REFERÊNCIAS

ALI HASSAN, H. et al. Feline ovarian tissue vitrification: The effect of fragment size and base medium on follicular viability and morphology. **Theriogenology**, v. 198, p. 12–18, mar. 2023.

AMORIM, C. A. et al. **Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. Reproductive BioMedicine Online**, ago. 2011.

AMORIM, C. A. et al. Long-term follow-up of vitrified and autografted baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, v. 34, n. 2, p. 323–334, 1 fev. 2019.

ANDERSEN, C. Y. et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in young female oncological patients. **Future Oncology**, v. 8, n. 5, p. 595–608, maio 2012.

ANDREWS, C. J. et al. **Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review. Mammal Review** Blackwell Publishing Ltd., 1 jan. 2019.

ARAV, A.; PATRIZIO, P. Techniques of Cryopreservation for Ovarian Tissue and Whole Ovary. **Clinical Medicine Insights: Reproductive Health**, v. 13, p. 117955811988494, jan. 2019.

BAHROUDI, Z. et al. **Review of ovarian tissue cryopreservation techniques for fertility preservation. Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction** Elsevier Masson s.r.l., 1 fev. 2022.

BEHRMAN, S. J.; SAWADA, Yoshiaki. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. **Fertility and Sterility**, v. 17, n. 4, p. 457-466, 1966.

BEHL, Supriya et al. Vitriificação versus congelamento lento de tecido ovariano humano: uma revisão sistemática e meta-análise dos resultados histológicos. **Jornal de Reprodução Assistida e Genética**, v. 40, n. 3, pág. 455-464, 2023.

BIELANSKI, A. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. **Theriogenology**, v. 77, n. 3, p. 467-482, 2012.

BORDES, A. et al. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified–warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 20, n. 10, p. 2745–2748, 1 out. 2005.

BORRÁS, A. et al. Comparação entre o congelamento lento e a vitrificação da criopreservação de tecido ovariano em mulheres transgênero designadas ao nascer recebendo terapia com testosterona: dados sobre parâmetros histológicos e de viabilidade. **Jornal de Reprodução Assistida e Genética**, v. 39, n. 2, pág. 527-541, 2022. See More

BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2–3, p. 581–594, 15 jan. 2004.

BRITO, D. C. C. et al. Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. **Theriogenology**, v. 111, p. 69–77, 15 abr. 2018.

BROWN, J. L. Female reproductive cycles of wild female felids. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 155–162, abr. 2011.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C M.; CASTRO, S V.; LOPES, C. A.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**. v.138, n. (3-4), p. 220-7, 2013.

CALLEJO, J. et al. Long-Term Ovarian Function Evaluation after Autografting by Implantation with Fresh and Frozen-Thawed Human Ovarian Tissue. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4489–4494, set. 2001.

CAMPOS, L. B. et al. Advances and challenges of using ovarian preantral follicles to develop biobanks of wild mammals. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 4, p. 334–341, 1 ago. 2019.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 10, n. 9, p. 2334–2338, 1 set. 1995.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent Advances and Prospects in Germplasm Preservation of Rare and Endangered Species. Em: [s.l: s.n.]. p. 331–356.

CONDE, D. A. et al. Species (ranked by number of individuals). **Science**, v. 331, n. 6023, p. 1390–1391, 18 mar. 2011.

COURBIERE, B. et al. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, p. 1243–1251, out. 2006.

COURBIERE, B. et al. Difficulties improving ovarian functional recovery by microvascular transplantation and whole ovary vitrification. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 6, p. 2697–2706, jun. 2009.

CRICHTON, E. G. et al. Efficacy of Porcine Gonadotropins for Repeated Stimulation of Ovarian Activity for Oocyte Retrieval and In Vitro Embryo Production and Cryopreservation in Siberian Tigers (*Panthera tigris altaica*)¹. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 105–113, 1 jan. 2003.

CUNHA, E. R. et al. Effects of prolonged in vitro culture and cryopreservation on viability, DNA fragmentation, chromosome stability and ultrastructure of bovine cells from amniotic fluid and umbilical cord. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 5, p. 806-812, 2014.

DATH, Catherine e cols. As células endoteliais são essenciais para a reestruturação do tecido estromal ovariano após o xenotransplante de células isoladas do estroma ovariano.

Reprodução Humana, v. 26, n. 6, pág. 1431-1439, 2011.

DOLMANS, M. M. et al. Impact of the cryopreservation technique and vascular bed on ovarian tissue transplantation in cynomolgus monkeys. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 8, p. 1251–1262, 4 ago. 2015.

DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. **Fertility preservation in women for medical and social reasons: Oocytes vs ovarian tissue. Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology** Bailliere Tindall Ltd., 1 jan. 2021.

DONFACK, N. J. et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 391–403, 1 ago. 2017.

DONNEZ, J. et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 519–535, 1 set. 2006.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 8, p. 1167–1170, 4 ago. 2015.

DONNEZ, P. J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **Lancet**, v. 364, n. 9443, p. 1405–1410, 16 out. 2004.

ELMOAZZEN, H. Y.; ELLIOTT, J. A. W.; MCGANN, L. E. Cryoprotectant equilibration in tissues. **Cryobiology**, v. 51, n. 1, p. 85–91, ago. 2005.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, n. 2, p. 81–89, 5 abr. 2007.

FUJIHARA, M. et al. Cat and Dog Primordial Follicles Enclosed in Ovarian Cortex Sustain Viability after in vitro Culture on Agarose Gel in a Protein-Free Medium. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 102–108, dez. 2012.

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, n. 1, p. 3970, 8 mar. 2019.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O. et al. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 65–72, jan. 2011.

GASTAL, G. D. A. et al. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 126, p. 88–94, 1 mar. 2019.

GERLACH, G.; MUSOLF, K. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. **Conservation biology**, v. 14, n. 4, p. 1066-1074, 2000.

GHAVAMI, S. et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 112, p. 24–49, jan. 2014.

GHORBANI, S. et al. Advanced bioengineering of female germ cells to preserve fertility. **Biology of Reproduction**, 10 ago. 2022.

GIARETTA, E.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p. 1-7,2013.

GOOK, D. A.; EDGAR, D. H. Ovarian Tissue Cryopreservation. Em: **Fertility Preservation**. [s.l.] Cambridge University Press, 2021. p. 281–301.

GUNASENA, K. T. et al. Allogeneic and Xenogeneic Transplantation of Cryopreserved Ovarian Tissue to Athymic Mice1. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 2, p. 226–231, 1 ago. 1997.

GUNASENA, K. T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 53, n. 1–4, p. 265–275, out. 1998.

GUPTA, P. S. P. et al. Effect of different vitrification protocols on post thaw viability and gene expression of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 178, p. 1–7, 15 jan. 2022.

HASHIMOTO, S. et al. Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 4, p. 501–509, out. 2010.

HAYASHI, Y. et al. Model-based assessment of temperature profiles in slow freezing for human induced pluripotent stem cells. **Computers & Chemical Engineering**, v. 144, p. 107150, jan. 2021.

HOWARD, J. G.; WILDT, D. E. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 130–148, jan. 2009.

IUCN. 2022. Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN. Versão 2022-2. <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em 10 fevereiro 2023.

JEWGENOW, K. et al. Cryopreservation of mammalian ovaries and oocytes. **International Zoo Yearbook**, v. 45, n. 1, p. 124–132, jan. 2011.

JEWGENOW, K.; ZAHMEL, J. **Preservation of female genetic resources in feline species**. **Theriogenology** Elsevier Inc., 15 out. 2020.

KASHUBA BENSON, C. M.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K. An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line. **Cryobiology**, v. 56, n. 2, p. 120–130, abr. 2008.

KAWAMURA, K. et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17474–17479, 22 out. 2013.

KEROS, Victoria e cols. Vitriificação versus congelamento controlado na criopreservação de tecido ovariano humano. **Reprodução humana**, v. 24, n. 7, pág. 1670-1683, 2009.

KIM, J. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 124, n. 2, p. 494–503, fev. 2003.

KIM, S. S. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 1–11, jan. 2006.

LABRUNE, E. et al. Cellular and Molecular Impact of Vitrification Versus Slow Freezing on Ovarian Tissue. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 26, n. 5, p. 276–285, 1 maio 2020.

LEE, S. et al. Comparison between slow freezing and vitrification for human ovarian tissue cryopreservation and xenotransplantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, 1 jul. 2019.

LEONEL, E. C. R. et al. Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 83, p. 9–14, ago. 2018a.

LEONEL, E. C. R. et al. Cat ovarian follicle ultrastructure after cryopreservation with ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, v. 83, p. 9–14, 1 ago. 2018b.

LEONEL, E. C. R. et al. Stepped vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LIMA, A. K. F. et al. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1664–1666, out. 2006.

LUVONI, G. et al. Effect of Vitrification of Feline Ovarian Cortex on Follicular and Oocyte Quality and Competence. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 3, p. 385–391, jun. 2012.

LUZ, H. K. M.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.R.; Rodrigues, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões, **Acta Scientiae Veterinariae** v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011

MARTINS, Carlos Frederico. ISOLAMENTO, CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES PARA FORMAÇÃO DE UM BANCO DE GERMOPLASMA. **Comunicado Técnico**, 2013.

MARTINS, J. L. A. et al. Cat preantral follicle survival after prolonged cooled storage followed by vitrification. **Cryobiology**, v. 81, p. 94–100, 1 abr. 2018.

MASTROMONACO, G. F.; SONGSASEN, N. Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species. Em: **Reproductive Technologies in Animals**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 99–117.

MATOS, M. C.; BEZERRA, M. B.; VICENTE, W. R. R. Cryopreservation and xenotransplantation of ovarian tissue. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 467–471, 2011.

MATTOS, Luciana Miranda. Recuperação e criopreservação de germoplasma de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado do Distrito Federal: uma estratégia para conservação animal ex situ. 2016.

MATTISKE, D.; SHAW, G.; SHAW, J. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. **Reproduction**, p. 143–153, 1 jan. 2002.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 247, n. 3, p. C125–C142, 1 set. 1984.

MCGEE, H. A.; MARTIN, W. J. Cryochemistry. **Cryogenics**, v. 2, n. 5, p. 257–267, set. 1962.

MCGOWAN, P. J. K.; TRAYLOR-HOLZER, K.; LEUS, K. IUCN Guidelines for Determining When and How Ex Situ Management Should Be Used in Species Conservation. **Conservation Letters**, v. 10, n. 3, p. 361–366, maio 2017.

MONTANO VIZCARRA, D. A. et al. Use of synthetic polymers improves the quality of vitrified caprine preantral follicles in the ovarian tissue. **Acta Histochemica**, v. 122, n. 2, 1 fev. 2020.

MOREIRA, N. et al. Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). **Zoo Biology**, v. 26, n. 6, p. 441–460, 6 set. 2007.

MOUTTHAM, L.; COMIZZOLI, P. The preservation of vital functions in cat ovarian tissues during vitrification depends more on the temperature of the cryoprotectant exposure than on the sucrose supplementation. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 187–195, 1 out. 2016.

MUELLER, A. et al. Fertility preservation: improved neovascularization and follicle viability in cryopreserved bovine ovarian cortex transplants by remaining medulla tissue. **F&S Science**, v. 3, n. 4, p. 340–348, nov. 2022.

PRAXEDES, É. A. et al. Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 1181, 2018.

OLGENBLUM, Gil I.; SAPIR, Liel; HARRY, Daniel. Propriedades de misturas aquosas de trealose: transição vítrea e pontes de hidrogênio. **Jornal de teoria química e computação**, v. 16, n. 2, pág. 1249-1262, 2020.

PAULINI, Fernanda et al. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. **Journal of ovarian research**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2014.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225, jun. 2006.

RICHINGS, N. M. et al. Growth and histology of ovarian follicles after cold storage in the tamar wallaby. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 6, p. 677, 2006.

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15. 2008.

SANTOS, R. R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 4, p. 1455–1458, abr. 2009.

SANTOS, R. R. et al. **Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. Animal Reproduction Science**, dez. 2010.

SEMPLE, E. ET AL. Cryobiology-TRANSPLANTATION OF FRESH OR CRYOPRESERVED BOVINE OVARIAN CORTEX TO NOD-SCID MICE. **Theriogenology**, v. 53, p. 264–264, 2000.

SHAHSAVARI, M. H. et al. Impacts of different synthetic polymers on vitrification of ovarian tissue. **Cryobiology**, v. 94, p. 66–72, jun. 2020.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 59–72, jan. 2000.

SHI, Q. et al. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports** Nature Publishing Group,, 1 dez. 2017.

SHIROMA, M. E. et al. Pretreatment with melatonin improves ovarian tissue cryopreservation for transplantation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 17, 3 dez. 2021.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, 76, p. 1051- 1057, 2011.

SILVESTRIS, E. et al. Human Ovarian Cortex biobanking: A Fascinating Resource for Fertility Preservation in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3245, 4 maio de 2020.

SUZUKI, N. Ovarian tissue cryopreservation using vitrification and/or in vitro activated technology. **Human Reproduction** Oxford University Press, 26 maio 2015.

TAFTI, D. E. Vitriied Xenograft Survived Human Ovarian Follicles Using Erythropoietin OPEN ACCESS Rapid Communication. **Journal of Gynecology and Obstetrics Forecast**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://scienceforecastoa.com/>>.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIK, R.; IWATA, H. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.60, n.2, 2014

TANPRADIT, N. et al. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1553–1561, 1 jun. 2015.

TERREN, Carmen et al. Congelamento lento versus vitrificação de ovários de camundongos: de análises ex vivo a gestações bem-sucedidas após autotransplante. **Relatórios Científicos**, v. 9, n. 1, pág. 19668, 2019.

TING, A. Y. et al. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 1 maio 2013.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 6, p. 779–796, jan. 2006.

VITOLO, Michele. Effect of freezing on invertase activity of *Saccharomyces cerevisiae* cell. **people**, v. 1, p. 2, 2020.

WANDERLEY, L. S. et al. Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 260–267, jan. 2012.

WIEDEMANN, C. et al. Preservation of Primordial Follicles from Lions by Slow Freezing and Xenotransplantation of Ovarian Cortex into an Immunodeficient Mouse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 300–304, dez. 2012.

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, 22 fev. 2013.

- WOLVEKAMP, M. C. J. et al. Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1–2, p. 135–147, jan. 2001.
- WOOD, T. C.; MONTALI, R. J.; WILDT, D. E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 2, p. 190–200, fev. 1997.
- WUSTEMAN, M.; ROBINSON, M.; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: Biological problems and some approaches to their solution. **Cryobiology. Anais...abr.** 2004.
- XIAO, Z. et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2323–2328, nov. 2010.
- XIAO, Shuo et al. O crescimento folicular in vitro suporta a maturação meiótica do oócito humano. **Relatórios científicos**, v. 5, n. 1, pág. 17323, 2015.
- YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 1248–1254, abr. 2005.
- YOUM, H. W. et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: Effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. **Human Reproduction**, v. 29, n. 4, p. 720–730, 1 abr. 2014.