



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Náyra Rachel Nascimento Luz

**CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO CANINO POR CURTO PERÍODO
COMO MÉTODO AVALIATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

MOSSORÓ

2024

Náyra Rachel Nascimento Luz

**CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO CANINO POR CURTO PERÍODO
COMO MÉTODO AVALIATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva

Co-orientador: Dra. Andréia Maria da Silva

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

NN333 Nascimento Luz, Náyra Rachel.
cc Cultivo in vitro de tecido ovariano canino por
curto período como método avaliativo de diferentes
técnicas de criopreservação / Náyra Rachel
Nascimento Luz. - 2024.
45 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Coorientadora: Andréia Maria da Silva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Medicina
Veterinária, 2024.

1. Biobanco. 2. Canídeos. 3. Ovário. 4.
Moifopa. I. Silva, Alexandre Rodrigues, orient.
II. da Silva, Andréia Maria, co-orient. III.
Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

Náyra Rachel Nascimento Luz

**CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO CANINO POR CURTO PERÍODO
COMO MÉTODO AVALIATIVO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Defendida em: 08 / 10 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Silva (UFERSA)
Presidente

Dra. Andréia Maria da Silva (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)
Membro Examinador

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Dartângelo Cierclay Silva Luz
e Vera Lúcia do Nascimento Luz. Que sempre
acreditaram e alegraram-se com minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela fé, força, coragem, sabedoria, paciência e oportunidades a mim concedidos durante os anos de graduação.

Aos meus pais, Dartângelo Cierclay Silva Luz e Vera Lúcia do Nascimento Luz, por todo apoio, amor, confiança, esforço, dedicação e exemplo de vida. Amo vocês eternamente!

Aos meus irmãos, Marcos Yuri Nascimento Luz e Enzo Gabriel Nascimento Luz, por serem meu alicerce junto aos meus pais, por todo apoio e carinho com minha jornada. Amo vocês!

Ao meu noivo, Moisés Barbosa da Cruz, por ser enfrentar o dia-a-dia, por toda a confiança, tranquilidade, amor e companheirismo. Obrigada, por ajudar a caminhada ser mais leve. Amo você!

Ao meu orientador Prof^o Dr. Alexandre Rodrigues Silva, por me dar a oportunidade e confiança de fazer parte de sua equipe, por todo o seu exemplo de inteligência, dedicação e comprometimento.

À Dra Andréia Maria da Silva, por sua paciência em ensinar, pelos conhecimentos passados, os puxões de orelha, por toda a sua inteligência e paciência. MUITÍSSIMO obrigada!

Ao Prof^o Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, por ter aceitado o convite de fazer parte da banca avaliadora, contribuindo com sua inteligência, comprometimento e simplicidade.

Aos animais, por me mostrarem que vale a pena lutar por eles todos os dias.

A equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) por todo o aprendizado, confiança, alegrias e risadas.

Aos amigos Pedro Brito e Euziele Oliveira, pela amizade, pelo apoio, ajuda com o experimento e por se fazerem presentes em muitos momentos difíceis, ajudando a tornar esse trabalho mais leve.

Agradeço a minha amiga Kalyne Oliveira, que me deu oportunidade de evoluir profissionalmente, sempre ensinando da melhor maneira possível e se mostrando uma amiga que eu posso contar.

Agradeço a Amara Gyane e Paulo Ricardo, por toda amizade e parceria desenvolvida ao longo desse tempo, servindo sempre como exemplo de casal e de seres humanos, sempre estando à disposição para ajudar no que fosse preciso.

Ao Prof^o. Dr. Moacir Franco de Oliveira, a Prof^a Dra. Nilza Dutra Alves e Prof^a Dra. Alessandra Fernandes Pereira, pela ajuda na execução do experimento e todo o apoio dado às minhas iniciações científicas. Obrigada por toda a ajuda!

A Profª Dra. Liz Carolina da Silva Lagos Cortes Assis e a Profª Dra. Patricia Lima de Oliveira, que serviram de inspiração e força, sempre me incentivando a chegar até aqui.

Aos professores Dr. Alexandro Iris Leite, Dr. Raimundo Alves Barreto Junior, Dr. Eraldo Barbosa Calado e a Profª Dra Talyta Lins Nunes, por todas as oportunidades e contribuições para o meu aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão das bolsas de iniciação científica.

À UFERSA por me dar a oportunidade do ensino de qualidade e aprendizados.

RESUMO

A vitrificação é uma biotécnica reprodutiva em crescimento, sendo considerada um dos métodos de criopreservação para conservação de tecido ovariano. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da vitrificação utilizando o *ovarian tissue cryosystem* (OTC) e a vitrificação em agulha adaptada (VIA) sobre a viabilidade e morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais (FOPAS) incluídos no tecido ovariano de cadelas após o cultivo *in vitro*. Para tanto, cinco pares de ovários de fêmeas adultas foram coletados, fragmentados, destinados aos diferentes protocolos de vitrificação mencionados. Tanto os fragmentos a fresco (controle) quanto aqueles vitrificados em VIA ou OTC, e posteriormente aquecidos foram submetidos ao cultivo *in vitro* por 3 e 9 dias. Assim, os fragmentos do grupo controle fresco, controle fresco cultivado por 3 e 9 dias, bem como os grupos criopreservados: OTC aquecido, OTC cultivado 3 e 9 dias, VIA aquecida, VIA cultivada 3 e 9 dias, foram avaliados quanto à viabilidade folicular utilizando azul de tripan 0,4%, classificados como viáveis e inviáveis. Para análise da morfologia folicular, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4%, destinados a histologia clássica e classificados como primordial, primário ou secundário, bem como em viáveis ou degenerados. Para avaliação tridimensional do tecido, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5%, imersos em tetróxido de ósmio a 1% e desidratados em série crescente de álcoois. Os resultados foram expressos como média e erro padrão. Os resultados foram expressos como média e erro padrão com $P < 0,05$. Desse modo, obteve-se que o tratamento controle fresco apresentou $77,2 \pm 2,81$ % ($P < 0,05$) de viabilidade e não diferiu dos demais, sendo eles controle fresco cultivado por 3 ($67,3 \pm 6,49$ %) e 9 ($72,6 \pm 1,79$ %) dias, além do OTC e VIA aquecidos ($85,7 \pm 3,58$ % e $75,7 \pm 2,78$ %, respectivamente) e OTC cultivado por 3 ($81,3 \pm 5,51$ %) e 9 ($64,6 \pm 16,2$ %) dias e VIA cultivado por 3 ($70,6 \pm 4,23$ %) e 9 ($72,8 \pm 7,24$ %) dias. Na morfologia, os folículos primordiais não diferiram entre os grupos controle fresco ($85,5 \pm 7,3$ %), controle fresco cultivado por 3 dias ($81,1 \pm 7,0$ %), e dos grupos criopreservados aquecidos: OTC aquecido ($91,7,0 \pm 5,4$ %), OTC cultivado 3 dias ($52,6 \pm 15,4$ %), VIA adaptada aquecido ($82,1 \pm 7,1$ %), VIA adaptada cultivado 3 dias ($62,7 \pm 20,4$ %) e 9 dias ($63,6 \pm 6,7$ %) ($P < 0,05$). O controle fresco cultivado por 9 dias ($70,1 \pm 11,0$ %) não diferiu destes nem do grupo OTC cultivado 9 dias ($34,1 \pm 9,0$ %), mas este diferiu dos demais tratamentos ($P < 0,05$). O mesmo foi observado quanto aos folículos primários, ou seja não diferiu entre os grupos controle fresco ($60,1 \pm 11,5$ %), controle fresco cultivado por 3 ($63,6 \pm 21,7$ %) e 9 ($60,7 \pm 16,7$ %) dias, e dos grupos criopreservados aquecidos: OTC aquecido ($73,3 \pm 19,4$ %), OTC cultivado 3 dias ($39,6 \pm 15,7$ %), VIA adaptada aquecido ($86,8 \pm 6,0$ %), VIA adaptada cultivado 3 dias ($58,3 \pm 30,0$ %) e 9 dias ($25,0 \pm 25,0$ %) ($P < 0,05$). O grupo OTC cultivado sofreu uma queda significativa ($P < 0,05$) na integridade morfológica, assemelhando-se apenas ao OTC cultivado 3 dias. Não foi observada diferença quanto aos folículos secundários entre os grupos controle fresco ($22,9 \pm 19,5$ %), controle fresco cultivado por 3 ($15,0 \pm 15,0$ %) e 9 ($20,0 \pm 20,0$ %) dias, e dos grupos criopreservados aquecidos: OTC aquecido ($30,0 \pm 20,0$ %), OTC cultivado 3 dias ($0,0 \pm 0,0$ %), VIA adaptada aquecido ($0,0 \pm 0,0$ %), VIA adaptada cultivado 3 dias ($0,0 \pm 0,0$ %) e 9 dias ($25,0 \pm 25,0$ %) ($P < 0,05$). Na ultraestrutura, observou-se desorganização das células estromais nos tratamentos OTC cultivado por 3 e 9 dias comparado ao grupo controle fresco e fresco cultivado por 3 e 9 dias. Em conclusão, esse trabalho inova ao mostrar a aplicação do cultivo *in vitro* para o tecido ovariano de cadelas, sendo sugestivo que a VIA apresenta-se como a técnica mais adequada para vitrificação do tecido ovariano de cadelas em comparação ao OTC, por manter a viabilidade e morfologia folicular.

Palavras-chave: Biobanco; Canídeos; Ovário; Moifopa.

ABSTRACT

Vitrification is a growing reproductive biotechnique and is considered one of the cryopreservation methods for conserving ovarian tissue. The present study aimed to evaluate the effects of vitrification using the ovarian tissue cryosystem (OTC) and adapted needle vitrification (VIA) on the viability and morphology of pre-antral ovarian follicles (FOPAS) included in the ovarian tissue of bitches after in vitro culture. To this end, five pairs of ovaries from adult females were collected, fragmented, and used for the different vitrification protocols mentioned. Both the fresh fragments (control) and those vitrified in VIA or OTC, and subsequently heated, were subjected to in vitro cultivation for 3 and 9 days. Thus, fragments from the fresh control group, fresh control group cultured for 3 and 9 days, as well as the cryopreserved groups: heated OTC, OTC cultured 3 and 9 days, heated VIA, VIA cultured 3 and 9 days, were evaluated for follicular viability. using 0.4% trypan blue, classified as viable and non-viable. To analyze follicular morphology, the fragments were fixed in 4% paraformaldehyde, intended for classical histology and classified as primordial, primary or secondary, as well as viable or degenerated. For three-dimensional tissue evaluation, the fragments were fixed in 2.5% glutaraldehyde, immersed in 1% osmium tetroxide and dehydrated in an increasing series of alcohols. The results were expressed as mean and standard error. The results were expressed as mean and standard error with $P < 0.05$. Thus, it was obtained that the fresh control treatment presented $77.2 \pm 2.81\%$ ($P < 0.05$) of compliance and did not differ from the others, with fresh controls being cultivated for 3 ($67.3 \pm 6.49\%$) and 9 ($72.6 \pm 1.79\%$) days, in addition to the heated OTC and VIA ($85.7 \pm 3.58\%$ and $75.7 \pm 2.78\%$, respectively) and OTC cultivated for 3 ($81.3 \pm 5.51\%$) and 9 ($64.6 \pm 16.2\%$) days and VIA cultured for 3 ($70.6 \pm 4.23\%$) and 9 ($72.8 \pm 7.24\%$) days. In terms of morphology, primordial follicles did not differ between the fresh control groups ($85.5 \pm 7.3\%$), the fresh control group cultured for 3 days ($81.1 \pm 7.0\%$), and the heated cryopreserved groups: heated OTC ($91.7 \pm 5.4\%$), OTC cultured for 3 days ($52.6 \pm 15.4\%$), VIA adapted heated ($82.1 \pm 7.1\%$), VIA adapted adapted for 3 days ($62.7 \pm 20.4\%$) and 9 days ($63.6 \pm 6.7\%$) ($P < 0.05$). The fresh control cultured for 9 days ($70.1 \pm 11.0\%$) does not differ from these nor from the OTC group cultured for 9 days ($34.1 \pm 9.0\%$), but it differs from the other treatments ($P < 0.05$). The same was observed regarding the primary follicles, that is, it did not differ between the groups fresh control ($60.1 \pm 11.5\%$), fresh control cultured by 3 ($63.6 \pm 21.7\%$) and 9 ($60.7 \pm 16.7\%$) days, and of the heated cryopreserved groups: heated OTC ($73.3 \pm 19.4\%$), OTC cultured for 3 days ($39.6 \pm 15.7\%$), heated adapted VIA ($86.8 \pm 6.0\%$), adapted VIA cultivated 3 days ($58.3 \pm 30.0\%$) and 9 days ($25.0 \pm 25.0\%$) ($P < 0.05$). The cultured OTC group suffered a significant drop ($P < 0.05$) in morphological integrity, resembling only the 3-day cultured OTC. No difference was observed in terms of secondary follicles between the fresh control ($22.9 \pm 19.5\%$), fresh control cultured by 3 ($15.0 \pm 15.0\%$) and 9 ($20.0 \pm 20.0\%$) groups.) days, and of the heated cryopreserved groups: heated OTC ($30.0 \pm 20.0\%$), OTC cultured for 3 days ($0.0 \pm 0.0\%$), heated adapted VIA ($0.0 \pm 0.0\%$), adapted VIA cultivated 3 days ($0.0 \pm 0.0\%$) and 9 days ($25.0 \pm 0.0\%$) ($P < 0.05$).). In ultrastructure, disorganization of stromal cells was observed in the OTC treatments cultured for 3 and 9 days compared to the fresh and fresh control group cultured for 3 and 9 days. In conclusion, this work innovates by showing the application of in vitro culture to the ovarian tissue of bitches, suggesting that VIA is the most appropriate technique for vitrification of the ovarian tissue of bitches compared to OTC, as it maintains viability and follicular morphology.

Keywords: Biobank; Canids; Ovary; Moifopa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Desenho experimental.....	25
Figura 2	–	Protocolo de vitrificação sendo aplicado nas técnicas <i>ovarian tissue cryosystem</i> (OTC) e a vitrificação em agulha adaptada (VIA)	26
Figura 3	–	Características histológicas do tecido ovariano de cadela. (A) tecido de controle fresco, (B) controle fresco cultivado por 3 dias, (C) controle fresco cultivado por 9 dias, (D) OTC aquecido, (E) OTC cultivado 3 dias, (F) OTC cultivado 9 dias, (G) VIA aquecido, (H) VIA cultivado 3 dias, (I) VIA cultivado 9 dias. As setas verdes indicam folículos primordiais normais, as setas vermelhas indicam folículos primários normais e as setas brancas indicam folículos degenerados.....	31
Figura 4	–	Avaliação da ultraestrutura. (A) tecido de controle fresco, (B) controle fresco cultivado por 3 dias, (C) controle fresco cultivado por 9 dias, (D) OTC aquecido, (E) OTC cultivado 3 dias, (F) OTC cultivado 9 dias, (G) VIA aquecido, (H) VIA cultivado 3 dias, (I) VIA cultivado 9 dias. Seta verde indicando tecido com organização estromal ovariana, seta vermelha indica desorganização do estroma ovariano e seta branco indicada redução do tamanho das células estromais ovarianas.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Valores (médias $\pm$ EP) para a viabilidade folicular dos folículos pré-antrais de cadela no grupo controle fresco e vitrificados por diferentes técnicas (OTC e VIA adaptada) após o aquecimento e cultivo <i>in vitro</i> de 3 e 9 dias.	29
Tabela 2	–	Valores (médias $\pm$ EP) para morfologia dos folículos pré-antrais de cadela no grupo controle fresco e vitrificados por diferentes técnicas (OTC e VIA adaptada) após o aquecimento e cultivo <i>in vitro</i> de 3 e 9 dias.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
EGF	Fator de crescimento epidermal
SFB	Soro Fetal Bovino
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9
HE	Hematoxilina-eosina
IGFs	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
KL	Kit ligand
MEM	Meio Essencial Mínimo
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
OTC	Ovarian tissue cryopreservation
PVA	Álcool Polivinílico
SE	Solução de equilíbrio
SV	Solução de vitrificação
VEGF	Fator de crescimento endotélio vascular
VIA	Vitrificação por imersão em agulha
VIP	Ativina e peptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	IMPORTÂNCIA DOS CÃES	16
2.1.1	Oôgenese e foliculogênese	16
2.1.2	FOPAs	17
2.2	MANIPULAÇÃO DE OÓCITO INCLUSOS EM FOLÍCULO OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS.....	18
2.3	CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO	19
2.4	Vitrificação	20
2.4.1	<i>Ovarian tissue cryosystem</i>	20
2.4.2	Vitrificação por imersão em agulha	21
3	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TECIDO OVARIANO	21
4	OBJETIVO	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
6	RESULTADOS	30
7	DISCUSSÃO	35
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

No que tange ao avanço de estudos científicos voltados à conservação, criopreservação e à formação de bancos de germoplasmas da espécie canina, tem-se que poucos estudos são voltados para a criopreservação de material genético feminino de cadelas, assim há uma real necessidade de estudos para desenvolver e aprimorar novas técnicas. Ainda, o estabelecimento de tais biotécnicas poderia ser usado como base para espécies silvestres filogeneticamente próximas, como lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*), a Raposa-do-campo (*Lycalopex sp.*), o Cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e o Cachorro-do-mato-de-orelhas-curtas (*Atelocynus microtis*) que estão quase ameaçadas de extinção (IUCN, 2024).

Nesse contexto, a criopreservação de tecido ovariano de cadelas é uma biotécnica reprodutiva de grande valia, a qual poderia ser aplicada na conservação de material genético de diferentes raças, inclusive naquelas ameaçadas de extinção, bem como para animais de alto valor zootécnico submetidos a procedimentos quimioterápicos e a radioterapia. Nesse âmbito a vitrificação, uma das técnicas de criopreservação, destaca-se por ser um procedimento simples, rápido e de baixo custo e por promover a passagem do meio líquido para um estado amorfo, evitando assim a formação de cristais de gelo e por conseguinte as crioinjúrias das células (Lunardi, 2012). Dentre as técnicas de vitrificação, destacam-se as técnicas utilizando o *ovarian tissue cryosystem* (Carvalho et al., 2013) e a vitrificação por imersão em agulha (Fujihara et al., 2019).

Em adição, o cultivo *in vitro* (CIV) de folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs) inclusos em tecido ovariano é outra biotécnica reprodutiva que tem objetivo de aumentar a eficiência e a reprodutibilidade da produção de oócitos por FOPAs (Campo et al., 2019) e também vem sendo usada segundo Faustino et al. (2011) para avaliar a eficiência da criopreservação, tendo em vista que lesões foliculares que podem não ser perceptíveis após a descongelação podem evoluir e serem manifestadas durante o CIV, sendo assim uma possibilidade para avaliar os FOPAs íntegros.

Dado o exposto, a vitrificação do tecido gonadal feminino se apresenta como uma boa alternativa para o estabelecimento de protocolos de conservação do germoplasma de canídeos ameaçados. Assim, no intuito de se aprimorar os protocolos para a conservação do tecido ovariano de cadelas, justifica-se a tentativa de comparar diferentes métodos de vitrificação, a fim de se determinar a metodologia mais eficiente para esta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DOS CÃES

Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*, Canidea) apresentam interações significativas para com o homem da sociedade moderna, destacando-se os benefícios à saúde física e mental do ser humano (Kitagawa & Coutinho, 2004). Além disso, há relatos da evolução cultural e social da humanidade ligados intimamente à presença destes (Lopes e Silva, 2012). Dentre esses benefícios, destaca-se o animal de estimação, o qual proporciona relaxamento e fornece carinho à pessoa, além da zooterapia e os serviços prestados pelos cães aos deficientes físicos (Kitagawa e Coutinho, 2004).

Nesse sentido, destaca-se também a criação de cães, a qual apresenta-se importante no segmento econômico, social e cultural (Luz e Silva, 2019). A cinofilia consiste no estudo, bem como na criação de cães, por hobby ou profissão, com objetivo do aperfeiçoamento de raças puras ou estirpes caninas (Silva e Luz, 2021).

Deste modo, a cinofilia tem sido marcada pelo constante aperfeiçoamento e otimização de técnicas reprodutivas devido à pressão do mercado por parte dos criadores comerciais de cães e pelos entusiastas da espécie. No entanto, há poucos estudos voltados à criopreservação do tecido ovariano de cadelas, sendo necessários estudos que visem obter melhores taxas de desenvolvimento folicular para aplicações futuras.

2.1.1 OÓGENESE E FOLICULOGÊNESE

A oógenese em cadelas é o período que compreende a produção oocitária pelas oôgonias ou células germinativas primordiais, a qual ocorre até dois meses após o nascimento, tendo em vista que há células em proliferação em região cortical do ovário (Fayer Hosken et al., 2000). Durante esse processo, ocorre aumento dos grânulos lipídicos, resultando em uma aparência escura ao oócito canino, que não ocorre em outros mamíferos (Derussi; Lopes, 2009).

Já a foliculogênese inicia-se durante a vida fetal ou logo após o nascimento, com a formação da reserva de folículos primordiais, os quais são ciclicamente estimulados a passarem por um programa sequencial de crescimento, cujo processo é regulado por hormônios esteroides produzidos no ovário, por meio da modulação da atividade das gonadotrofinas e de fatores de crescimento (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Assim, o propósito desta é nutrir, bem como assegurar a liberação de um oócito maduro e incluso em células do cumulus, que seja apto à fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (Hickey et al., 2005).

Nesse sentido, o folículo é a unidade morfológica e funcional do ovário dos mamíferos, a qual mantém o crescimento e a maturação do oócito (Durrant et al., 1998), sendo constituído por um oócito circundado por células da granulosa e teca. Ademais, desempenha duas funções interdependentes: uma endócrina, a qual consiste na produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos e a outra exócrina ou gametogênica, sendo o folículo um elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, assegurando o crescimento e a maturação de oócitos (Figueiredo et al., 2002).

Durante a foliculogênese, ocorre o crescimento do folículo, alterando assim sua morfologia, já que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e se diferenciam. Ademais, destaca-se que o crescimento destes folículos ocorre continuamente durante a vida do animal ou, pelo menos, até a reserva se exaurir (Bristol-Gould e Woodruff, 2006).

2.1.2 FOPAs

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs) são aqueles não cavitários, os quais podem ser classificados como primordiais, primários, secundários (Hulshof et al., 1994). Existem ainda os folículos antrais ou cavitários, sendo estes os terciários e maduros (Figueiredo et al., 2008). Assim, de acordo com o grau de evolução, os folículos pré-antrais e antrais formam a população folicular ovariana, localizando-se no córtex ovariano.

Nesse sentido, os folículos ovarianos primordiais são aqueles no estágio inicial do desenvolvimento folicular, os quais são ativados e iniciarão o processo de crescimento e diferenciação (Telfer et al., 2008). Estes folículos são compostos por um oócito rodeado por uma camada de quatro a oito células da granulosa achatada (Hulshof et al., 1994; Fair et al., 1997a).

Nesses folículos, o núcleo do oócito permanece numa posição central evidenciando o nucléolo. Já as organelas estão distribuídas uniformemente pelo citoplasma ou aproximadas ao núcleo. A organela mais evidente e predominantemente redonda é a mitocôndria, enquanto, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso são estruturas pouco desenvolvidas e distribuídas desuniformemente pelo citoplasma (Lucci et al., 2001).

Já os folículos primários, apresentam as células da granulosa em formato cuboides (11 a 12 células) ao redor do oócito, isso ocorre devido a atividade proliferativa presente (Hulshof et al., 1994). Apresenta o oócito esférico, mitocôndrias por todo o ooplasma com prevalência do formato arredondado, entretanto, algumas já se mostravam alongadas com cristas

transversais. Já as gotas de lipídeos, complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos são mais frequentes e se localizam mais próximos à membrana nuclear (Basso; Esper, 2002).

Os folículos secundários, por sua vez, possuem duas ou mais camadas das células da granulosa cuboidais. O núcleo do oócito está disposto em uma posição excêntrica, diferente dos folículos primordiais posicionados na região central. Assim, o núcleo do oócito estará situado entre a zona pelúcida e o centro do oócito; as organelas também se deslocam para a periferia do folículo (Hyttel et al., 1997). Com o desenvolvimento folicular o espessamento da zona pelúcida torna-se visível (Lucci et al., 2001; Rossetto et al., 2011).

Nesse contexto, salienta-se ainda que ao nascimento o ovário dos mamíferos é constituído por milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o pool de reserva dos folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação (Mayer et al., 2004), visto que a maioria morre por um processo fisiológico designado atresia folicular (Markström et al., 2002). Evidências morfológicas indicam que existem dois tipos de atresia: A, a qual ocorrem primariamente no oócito, sendo predominante em folículos pré-antrais (Saumande et al., 1981) e B, típica de folículos antrais, sendo as primeiras alterações nas células da granulosa (Figueiredo et al., 1995; Spanel-Borowski, 1981).

2.2 MANIPULAÇÃO DE OÓCITO INCLUSOS EM FOLÍCULO OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS- MOIFOPA

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma tecnologia reprodutiva que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, além da conservação visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período e no cultivo folicular que tem como finalidade promover o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPAs (Figueiredo et al, 2002; Figueiredo et al, 2007).

A MOIFOPA possibilita ainda o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou perigo de extinção, bem como a redução do intervalo entre gerações, recuperação de animais eliminados por problemas sanitários, uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte, otimização e padronização de outras biotécnicas como a fertilização *in vitro*, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia (Figueiredo et al., 2008). Tal ferramenta possibilita também o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em FOPAs em diversos estádios de desenvolvimento, para serem aplicadas em biotécnicas futuras, como a fecundação *in vitro* e clonagem (Telfer, 1996).

Ademais, pode ser utilizada para o estudo e compreensão da foliculogênese, sendo possível testar e avaliar o efeito de diferentes substâncias no cultivo *in vitro* como hormônios, fatores de crescimento e peptídeos que estão envolvidos no controle do desenvolvimento. Assim, destacam-se o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2), kit ligand (KL), fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), ativina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Martins et al., 2008).

Desse modo, a MOIFOPA abrange a criopreservação de tecido ovariano (Santos et al., 2008), sendo esta uma etapa importante, tendo em vista que poderá manter a viabilidade folicular até que seja realizado o CIV (Faustino et al., 2011). Desse modo, esta biotécnica permite o aumento do potencial reprodutivo, mas também a preservação de espécies filogeneticamente próximas.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO

A criopreservação de germoplasma consiste no armazenamento de material genético a baixas temperaturas por tempo indeterminado, na qual esta estrutura permanece viável após o aquecimento (Faustino et al., 2011). Esta técnica é uma alternativa para diminuir as limitações impostas pelo tempo e pela distância para a conservação de diversas espécies (Costa; Martins 2008). A criopreservação apresenta como etapas a exposição ao agente crioprotetor ou período de equilíbrio; resfriamento; armazenamento; descongelação ou aquecimento e remoção de agente crioprotetor (Santos et al., 2008).

A criopreservação é uma biotécnica que tem ganhado destaque por apresentar-se como uma estratégia promissora para programas conservacionistas e de melhoramento genético, preservando gametas de espécies ou raças de animais em vias de extinção (Rocha et al., 2018). Nesse sentido, estudos voltados para a preservação de tecido ovariano encontram-se em ascensão (Jewgenow et al., 2011), no intuito de resgatar folículos ovarianos imaturos.

Nesse contexto, os crioprotetores são substâncias que protegem as células tanto contra a desidratação, resfriamento e quanto aos danos causados pela redução extrema de temperatura (HAN, 2009), além disso, podem ser classificados como penetrantes, quando exercem ação intracelular, ou não penetrantes, cuja atividade de crioproteção ocorre fora da célula ou na sua superfície (Bittencourt, 2013).

Dessa maneira, os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular e que acabam por reduzir as lesões celulares, visto que possuem alta solubilidade, rápida penetrabilidade e levam a célula a ter menores danos osmóticos (Oktay et al., 1998), dentre os mais utilizados, destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO), o propanodiol e o etilenoglicol (EG). Já os extracelulares como, as proteínas, os açúcares e a polivinilpirrolidona (PVP), são moléculas que apresentam grandes dimensões, que se ligam aos fosfolipídeos da membrana plasmática através de ligações de hidrogênio, mantendo assim a integridade celular, desse modo, não penetram na membrana celular (Hovatta, 2005), e agem reduzindo o choque osmótico e controlando a entrada de água na célula (Shaw et al., 2000).

Desse modo, esta técnica já foi aplicada obtendo resultados satisfatórios na conservação de FOPAS caninos (Brandão et al 2021). Fujihara et al (2019), obteve $56,1 \pm 7,7$ % de folículos primordiais viáveis no tecido fresco, assemelhando-se aos $70,6 \pm 6,2$ % ao utilizar a técnica de vitrificação com a associação dos crioprotetores DMSO e PVP, os quais melhoraram significativamente a manutenção da morfologia folicular em comparação ao grupo controle, e $56,1 \pm 9,9$ % no congelamento lento, sendo este inferior a vitrificação.

2.4 Vitrificação

A vitrificação consiste na solidificação de uma solução utilizando baixas temperaturas e sem a formação de cristais de gelo (Liebermann et al., 2002), os quais são responsáveis por danos irreversíveis durante a criopreservação (Morató et al., 2008). Esta técnica apresenta altas concentrações de agentes crioprotetores, proporcionando viscosidade à solução de vitrificação a um valor suficientemente alto para ocorrer a solidificação sem haver cristalização (Mukaida; Oka 2012).

Essa biotécnica é uma alternativa a congelação lenta, sendo prática, além de envolver menor custo na execução e maior rentabilidade econômica (Vajta et al., 1998). Em geral, a vitrificação pode ser realizada em qualquer laboratório ou até mesmo em sala de cirurgia, e ainda em campo nos casos de ser realizada imediatamente após a morte do animal. A vitrificação apresenta-se como o desenvolvimento mais significativo da criobiologia até hoje (Amorim et al., 2011). Nesse sentido, a vitrificação surge como uma biotécnica de criopreservação extremamente valiosa na conservação de gameta, podendo ser usado em ovários de cadelas segundo Brandão et al (2021).

Desse modo, Luz et al (2024) avaliaram os efeitos de diferentes vitrificação ao analisar métodos de vitrificação fechados: ovarian tissue cryosystem e vitrificação em criotubos; e

métodos abertos: vitrificação por imersão em agulha e vitrificação em superfície sólida. Obteve-se que apenas a vitrificação por imersão em agulha (VIA) conseguiu manter a viabilidade folicular ($80,55 \pm 4,58$) assemelhando-se ao grupo controle fresco ($88,88 \pm 3,06$) ($P < 0,05$), os demais tratamentos variaram de 70 % a 74

%. Além disso, o VIA destacou-se como o método de vitrificação em sistema aberto mais promissor para a criopreservação de FOPAs caninos, preservando características morfológicas, integridade folicular e proliferação celular após vitrificação. Já o OTC apresentou resultados semelhantes a VIA, podendo ser justificado pelo fato de ambos os métodos possuírem partes metálicas que permitem rápida condução de calor e condensação da amostra. Portanto, VIA e OTC foram as técnicas de vitrificação mais recomendadas para preservar a sobrevivência dos FOPAs incluídos no tecido ovariano de cadelas.

2.4.1 Ovarian tissue cryosystem

O *ovarian tissue cryosystem* (OTC) é um dispositivo metálico utilizado para vitrificação em todas as fases (equilíbrio crioprotetor, troca de calor, armazenamento de tecido e remoção crioprotetora), facilitando principalmente o processo de aplicação e remoção de soluções de vitrificação e é considerado de fácil armazenamento do material biológico. O OTC tem por finalidade a troca de calor sem expor o tecido ovariano a contaminantes (Carvalho et al., 2013).

O OTC ainda possibilita a aplicação simultânea da solução de vitrificação em vários fragmentos de tecido ovariano, sejam estes grandes pedaços de tecidos ou mesmo o ovário inteiro (Carvalho et al., 2013). Testado com resultados promissores na criopreservação de tecido ovariano caprinos (Carvalho et al., 2013), canino (Brandão et al., 2021) e felino (Brito et al., 2018).

Nesse sentido, Brandão et al. (2021), obtiveram considerável preservação dos folículos caninos nas diferentes categorias foliculares: primordial, transição e secundário ao utilizar o OTC como técnica de vitrificação ($71,1\% \pm 1,8\%$, $26,4\% \pm 1,7\%$ e $0,7\% \pm 0,4\%$, respectivamente) quando comparada ao controle fresco ($81,1\% \pm 1,5\%$, $2,3\% \pm 0,6\%$ e $13,4\% \pm 1,3\%$, respectivamente). Além disso, evidenciou-se o aumento ($p < 0,05$) de folículos transicionais normais após a vitrificação.

2.4.2 Vitrificação por imersão em agulha

No tocante a vitrificação por imersão em agulha (VIA), este é um método que utiliza um transportador (agulha) para os tecidos ovarianos e são colocados em contato direto com o nitrogênio líquido. A VIA tem o intuito de maximizar o resfriamento para facilitar a vitrificação

e evitar danos aos cristais de gelo, além da facilidade em manusear os fragmentos (Amorim et al., 2013).

Este método tem o objetivo também de reduzir a toxicidade da solução de vitrificação com o uso de um volume mínimo de crioprotetores menos concentrado. Dessa maneira, resultados importantes foram obtidos em humanos (Wang et al., 2008), camundongo (Xiao et al., 2010) e ovino (Fathi et al., 2011).

Nesse contexto, Fujihara et al. (2019) destaca-se por ser pioneiro na utilização da vitrificação por imersão em agulha em tecido ovariano de cadela, obtendo-se a porcentagem de folículos morfolologicamente normais aumentou ($P = 0,007$) após a vitrificação com DMSO + PVP ($60,2 \pm 8,6\%$) em comparação com o tecido fresco ($63,7 \pm 10,2\%$).

3 CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO

O desenvolvimento de um sistema que permita o crescimento *in vitro* de FOPAs, resultando em óocitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro* seria de grande importância, tendo em vista o estudo dos fatores que controlam a foliculogênese. Além disso, o referido sistema promoveria o crescimento e maturação oocitária associada com a multiplicação e diferenciação das células da granulosa (Hartshorne, 1997).

Diante disso, diferentes sistemas de cultivo têm sido desenvolvidos visando estudar a composição do meio de cultivo (Smitz; Cortvrindt, 2002), uma vez que estudos realizados *in vitro* têm demonstrado que o crescimento folicular é afetado por muitos fatores, os quais raramente atuam independentemente (Williams, 1990). Assim, sabe-se que várias substâncias podem influenciar a sobrevivência e o crescimento folicular, como antibióticos, tampões, substratos nutricionais, diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento (Figueiredo et al., 2008; Chaves et al., 2010).

No tocante aos métodos de cultivo *in vitro*, destacam-se o cultivo do ovário inteiro e de fragmentos do córtex ovariano. O cultivo do ovário inteiro possibilita o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (Jin et al., 2010), entretanto, em animais de médio e grande porte é preferível o cultivo de fragmentos. Nesse sentido, os fragmentos do córtex ovariano têm a vantagem de manter o contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano (Lima, 2014). No entanto, neste tipo de modelo, observa-se que a maioria dos folículos progride apenas para o estágio de folículo primário sendo que poucos progridem para o estágio de folículo secundário (Figueiredo et al., 2007).

O CIV ainda pode ser utilizado como uma ferramenta para avaliar a eficiência da criopreservação, uma vez que algumas lesões não detectadas pós-descongelamento podem evoluir e serem manifestadas após cultivo (Faustino et al., 2011). Assim, estudos relacionados a criopreservação e CIV são de grande importância já que permite a compreensão de mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, gerando conhecimentos fundamentais para outras aplicações de biotécnicas, objetivando a conservação de espécies (Lima, 2014).

Nesse sentido, o meio de cultura é de suma importância, tendo em vista que os meios de base são extremamente ricos em nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, tampões, hormônios e/ou fatores de crescimento (Picton, Harris, Muruvi, e Chambers, 2008; Figueiredo, Rodrigues, Amorim, e Silva, 2008). Além disso, os meios de base comerciais como o Meio Essencial Mínimo-alfa modificado (α -MEM), Meio de Cultivo de Tecido 199 (TCM 199) e McCoy's têm sido utilizados no CIV em diferentes espécies (Arunakumari, Shanmugasundaram, & Rao, 2010; McLaughlin & Telfer, 2010; Leitão et al., 2014).

Assim, para o CIV de tecido ovariano de cadela, o meio α -MEM apresentou-se superior conservação dos FOPAs comparado ao Meio Essencial Mínimo (MEM) (Fujihara et al., 2012). Tal fato pode ter ocorrido devido o α -MEM ser um meio rico, apresentando aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, compostos energéticos, ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos. Além disso, outras substâncias podem ser adicionadas a ele, tais como o selênio (Abdelahi, Salehnia, & Allameh, 2010), o ácido ascórbico (Andrade et al., 2012) e a transferrina (Durlej, Duda, Knapcyk, & Słomeczyńska, 2008), compostos energéticos como a glutamina, o piruvato e a hipoxantina, porque esses compostos auxiliam na manutenção da sobrevivência e ultraestrutura dos folículos (Figueiredo et al., 1994).

Diante do exposto, dada a importância da cadela como animal de estimação, bem como seu uso como modelo experimental para desenvolvimento de biotecnologias para a conservação de gamoplasma de canídeos selvagens, justifica-se o presente estudo. Ademais, ressalta-se a necessidade de se estabelecer técnicas efetivas de criopreservação do gamoplasma feminino, as quais possibilitem o desenvolvimento folicular mesmo após seu armazenamento e reaquecimento. Para tal, é efetiva a aplicação de sistemas de cultivo *in vitro* como ferramentas de avaliação.

4 OBJETIVO

Objetivo geral:

- Avaliar a eficiência das diferentes técnicas de vitrificação por meio do cultivo *in vitro* de tecido ovariano de cadelas durante 3 e 9 dias.

Objetivos específicos:

- Analisar a morfologia dos FOPAs inclusos no ovário canino submetido a CIV após vitrificação;
- Estimar a viabilidade dos FOPAs inclusos no ovário canino submetido a CIV após vitrificação;
- Descrever ultraestrutura do ovário canino submetido a CIV após vitrificação;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Bioética e animais experimentais

O projeto foi conduzido conforme as normas de bem-estar animal vigentes internacionalmente.

Coleta dos ovários e processamento do tecido ovariano

Para a experimentação foram utilizados cinco cães, fêmeas, de diferentes raças, com idade $2,20 \pm 1,30$ (média $\pm$ desvio padrão), submetidas a ovário-histerectomia eletiva em clínicas veterinárias locais, em Mossoró-RN. Após a obtenção dos ovários, os órgãos foram imersos em Meio Essencial Mínimo de Hank's 10 mM, 1 % de penicilina G de sódio, sulfato de estreptomicina e anfotericina B. Em seguida, os ovários foram transportados (4°C) ao Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal- UFERSA, em caixas isotérmicas no intervalo de no máximo 30 min.

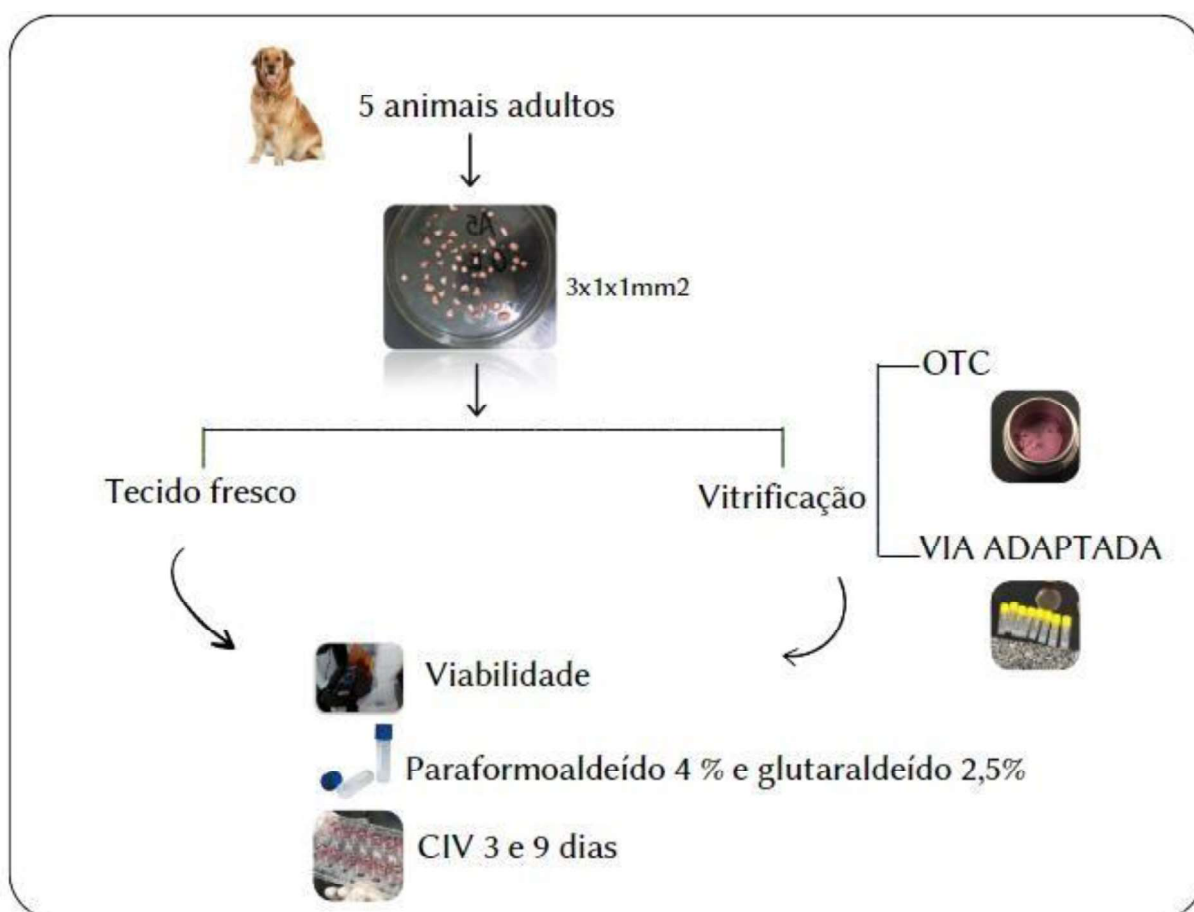


Figura 1. Desenho experimental

No laboratório, os ovários foram fragmentados (3x1x1mm), sendo quatro fragmentos fixados em paraformaldeído 4% e um fixado em glutaraldeído 2,5 % para as análises relativas ao grupo controle. Os demais fragmentos foram destinados à criopreservação e cultivo *in vitro* (tratamento controle fresco), de acordo com o delineamento experimental exposto na Figura 1.

Criopreservação do tecido ovariano

Para a criopreservação dos fragmentos de tecido ovariano canino, foram empregados os métodos de sistema ovarian tissue cryosystem (CARVALHO et al., 2013) e vitrificação por imersão em agulha adaptada (Fujihara et al, 2019). A solução de equilíbrio (SE) e de vitrificação (SV) serão constituída por MEM de Hank, sendo a SE acrescida de 20% de soro fetal bovino (FBS), 7,5% de etilenoglicol (EG), 3,75% dimetilsulfóxido (DMSO) e 1,25% de polivinilpirrolidona (PVP), e a SV de 20% de FBS, 0,5 M de sacarose, 15% de EG e 7,5% DMSO e 2,5% de PVP, por 10 min a 4 °C como mostra a figura 2 (Fujihara et al, 2019).

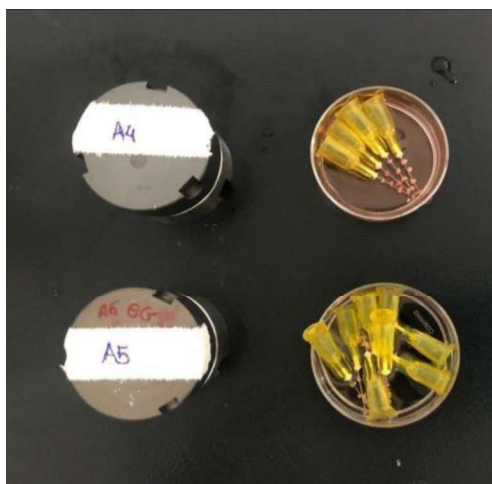


Figura 2. Protocolo de vitrificação sendo aplicado nas técnicas de *ovarian tissue cryosystem* (OTC) e a vitrificação por imersão em agulha adaptada (VIA).

No OTC (Carvalho et al., 2013), os fragmentos foram colocados dentro do dispositivo e expostos a SE e SV, e posteriormente, remoção da solução de vitrificação, o dispositivo foi fechado e, armazenado em nitrogênio líquido (-196°C). Já para a VIA adaptada, utilizou-se uma adaptação da técnica previamente descrita por Fujihara et al. (2019). Nesta, os fragmentos foram transfixados por uma agulha 30 G (quatro fragmentos por agulha) e expostos a SE e SV, em seguida as agulhas foram armazenadas em criotubos e posteriormente, em botijão de nitrogênio líquido (-196°C).

Após sete dias, as amostras criopreservadas foram aquecidas. Para isso, as amostras foram lavadas em solução gradiente (Hank's MEM com 20% de FBS suplementado com 1, 0,5, 0,25 e 0 M de sacarose) por 5 min para remoção dos crioprotetores (Fujihara et al, 2019).

Cultivo in vitro de fragmentos ovarianos

Para o cultivo *in vitro* (CIV), foram utilizados 6 fragmentos (3x1x1mm) de cada grupo, sendo o grupo controle fresco e os demais grupos cultivados (VIA e OTC). Os fragmentos foram alocados em placas de cultura de 24 poços contendo 1,0 mL de meio de cultura consistindo em a-MEM suplementado com 5,5 lg/ml de insulina, 5,5 lg/ml de transferrina, 6,7 ng/ml de selênio, 2 m ML de glutamina, 1 % de penicilina G de sódio, sulfato de estreptomicina e anfotericina B, 0,05 mM de ácido ascórbico, 10 ng/ml de FSH e álcool polivinílico a 0,1% (PVA, isento de proteínas) (Fujihara et al, 2012).

Desse modo, as amostras foram cultivadas a 38,5 °C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. Após CIV por 3 e 9 dias, realizando-se trocas da metade do volume do meio de cultura a cada 3 dias, os fragmentos ovarianos foram destinados a análise da viabilidade, fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 12 h para processamento histológico (Praxedes et al., 2021) e em glutaraldeído 2,5% para avaliação da ultraestrutura.

Teste de viabilidade folicular

Na análise da viabilidade folicular, os fragmentos ovarianos de cada tratamento foram fatiados com lâmina de bisturi e colocados em agitador com MEM de Hank's por 10 min. Após a agitação, a solução foi filtrada em uma tela de filtração de 500 µm e a suspensão centrifugada a 280 × g por 10 min. A suspensão (90 µL) contendo FOPAs individuais foi adicionada a 10 µL de solução de azul de tripano a 0,4 % e subsequentemente, incubada a 28° C por 5 min. Mínimo de 30 FOPAs foram avaliados por grupo sob microscopia invertida com aumento de 40x. Os FOPAs foram classificados como viáveis quando o oócito e < 10 % das células da granulosa não foram corados ou foram considerados inviáveis quando o oócito e/ ou > 10% das células da granulosa foram corados (GUPTA et al., 2002).

Análise histológica

As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%, desidratado em uma série graduada de etanol, clarificado com xileno, embebido em parafina. Os fragmentos foram seccionados em série em 5 µm seções, e a cada quinta seção foi colocada na lâmina, corado

com hematoxilina-eosina (HE), e avaliado usando um microscópio de luz (Nikon, Tóquio, Japão) em ampliação de $100\times$ (Carvalho et al, 2013).

Os folículos pré-antrais (FOPAs) foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento como primordial, primário ou secundário (Silva et al, 2008), sendo a morfologia dos FOPAs avaliada de acordo com a integridade do oócitos, células da granulosa e membrana basal. Desse modo, os FOPAs foram contados e classificados como morfolologicamente normais (aqueles com oócito com forma regular e citoplasma uniforme, além de organizadas camadas de células da granulosa) ou degeneradas (quando o oócito exibir o núcleo e / ou citoplasma picnótico, e com camadas de células da granulosa desorganizadas, separada da membrana basal e / ou células aumentadas incluídas) (Silva et al, 2008).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliação tridimensional do tecido ovariano, os fragmentos, após serem retirados do fixador de glutaraldeído 2,5%, foram lavados sucessivamente, 3 vezes por 10 minutos cada, em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, o material foi imerso em tetróxido de ósmio a 1% em água destilada por 75 minutos e depois lavado por 10 minutos em PBS por três duas vezes. A desidratação foi realizada em série crescente de etanol (15%, 25%, 30%, 70%, 90% e 100%). Por fim, as amostras foram fixadas com fita adesiva em stubs de latão e posteriormente revestidas com ouro no metalizador Sutter Coater SCD050/LEICA e observadas em microscópio eletrônico de varredura JSM-6510/JEOL (Chemes et al., 2013).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão (EP). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância foi verificada pelo teste de Bartlett. Os resultados da viabilidade e morfologia dos folículos das amostras frescas, criopreservadas e cultivadas foram analisados usando um modelo linear misto (Mixed Effects Analysis procedure) com medidas repetidas ao longo do tempo, incluindo as diferentes técnicas de vitrificação (OTC e VIA adaptada), o momento de avaliação e suas interações como efeitos principais. Quando efeitos significativos foram encontrados no teste F da análise de variância, o teste de Tukey foi usado como procedimento padrão para comparar as médias obtidas. O teste de Dunnett foi utilizado para comparar o grupo controle e os demais

tratamentos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism[®] versão 9.3.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

Análise de viabilidade folicular

Na análise da viabilidade foi avaliado um total de 1783 folículos pré-antrais. De modo geral, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e os tratamentos, tendo sido observados valores em torno de 70% de folículos viáveis para todos os grupos, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores (médias $\pm$ EP) para a viabilidade folicular dos folículos pré-antrais de cadela no grupo controle fresco e vitrificados por diferentes técnicas (OTC e VIA) após o aquecimento e cultivo *in vitro* de 3 e 9 dias

Grupo	Momento de avaliação	Viabilidade (%)*
Controle	Fresco	77,2 $\pm$ 2,8 (297/667)
	Fresco Cultivado 3 dias	67,3 $\pm$ 6,5 (192/667)
	Fresco Cultivado 9 dias	72,6 $\pm$ 1,8 (178/667)
OTC	Aquecido	85,7 $\pm$ 3,6 (219/536)
	Cultivado 3 dias	81,3 $\pm$ 5,5 (188/536)
	Cultivado 9 dias	64,6 $\pm$ 16,2 (129/536)
VIA	Aquecido	75,7 $\pm$ 2,8 (267/580)
	Cultivado 3 dias	70,6 $\pm$ 4,2 (160/580)
	Cultivado 9 dias	72,8 $\pm$ 7,2 (153/580)
Tempo		
<i>p</i> -valor		0,0535
Grupo		
<i>p</i> -valor		0,7461
Grupo $\times$ Tempo		
<i>p</i> -valor		0,3220

*Não houve diferença significativa entre os grupos.

Análise da morfologia folicular

Ao total, foram avaliados 1221 folículos quanto à sua integridade morfológica. De modo geral, a VIA promoveu uma conservação mais efetiva da morfologia folicular, uma vez que foi capaz de manter a integridade morfológica dos FOPAs primários e primordiais caninos por até 09 dias de cultivo com valores próximos ($P > 0,05$) ao grupo controle fresco. Por outro lado, já aos 03 dias de cultivo, o grupo criopreservado em OTC sofreu uma queda significativa ($P < 0,05$) na integridade morfológica dos folículos primordiais e primários, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Valores (médias $\pm$ EP) para morfologia dos folículos pré-antrais de cadela no grupo controle fresco e vitrificados por diferentes técnicas (OTC e VIA) após o aquecimento e cultivo *in vitro* de 3 e 9 dias.

Grupo	Momento de avaliação	Morfologia primordial (%)	Morfologia primário (%)	Morfologia secundário (%)
Controle	Fresco	85,5 $\pm$ 7,3 ^a (141/362)	60,1 $\pm$ 11,5 ^a (53/123)	22,9 $\pm$ 19,5 (14/26)
	Fresco Cultivado 3 dias	81,1 $\pm$ 7,0 ^a (83/362)	63,6 $\pm$ 21,7 ^a (38/123)	15,0 $\pm$ 15,0 (6/26)
	Fresco Cultivado 9 dias	70,1 $\pm$ 11,0 ^{ab} (138/362)	60,7 $\pm$ 16,7 ^a (32/123)	20,0 $\pm$ 20,0 (6/26)
	Aquecido	91,7,0 $\pm$ 5,4 ^{aA} (115/277)	73,3 $\pm$ 19,4 ^{aA} (28/47)	30,0 $\pm$ 20,0 (6/9)
OTC	Cultivado 3 dias	52,6 $\pm$ 15,4 ^{abAB} (96/277)	39,6 $\pm$ 15,7 ^{abAB} (16/47)	0,0 $\pm$ 0,0 (3/9)
	Cultivado 9 dias	34,1 $\pm$ 9,0 ^{bB} (66/277)	0,0 $\pm$ 0,0 ^{bB} (3/47)	0,0 $\pm$ 0,0 (0/9)
	Aquecido	82,1 $\pm$ 7,1 ^a (138/323)	86,8 $\pm$ 6,0 ^a (38/50)	0,0 $\pm$ 0,0 (0/4)
VIA	Cultivado 3 dias	62,7 $\pm$ 20,4 ^a (70/323)	58,3 $\pm$ 30,0 ^a (10/50)	0,0 $\pm$ 0,0 (0/4)
	Cultivado 9 dias	63,6 $\pm$ 6,7 ^a (115/323)	25,0 $\pm$ 25,0 ^a (2/50)	0,0 $\pm$ 0,0 (4/4)
	Tempo <i>p</i> -valor	0,0014	0,0005	0,4267
	Grupo <i>p</i> -valor	0,3794	0,5551	0,5452
	Grupo $\times$ Tempo <i>p</i> -valor	0,5064	0,9516	0,8570

Letras minúsculas (^{a, b}) indicam diferenças significativas entre os momentos de avaliação do controle e os intervalos dos grupos experimentais (teste de Dunnett; $p < 0,05$). Letras maiúsculas sobrescritas (^{A, B}) indicam diferenças significativas nos momentos de avaliação nos grupos experimentais (teste de Tukey; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

A Figura 3 observa-se detalhes da morfologia folicular nas diferentes categorias (primordial e primário), na qual as alterações mais visualizadas foram retração de citoplasma, desorganização de células da granulosa e núcleo picnótico.

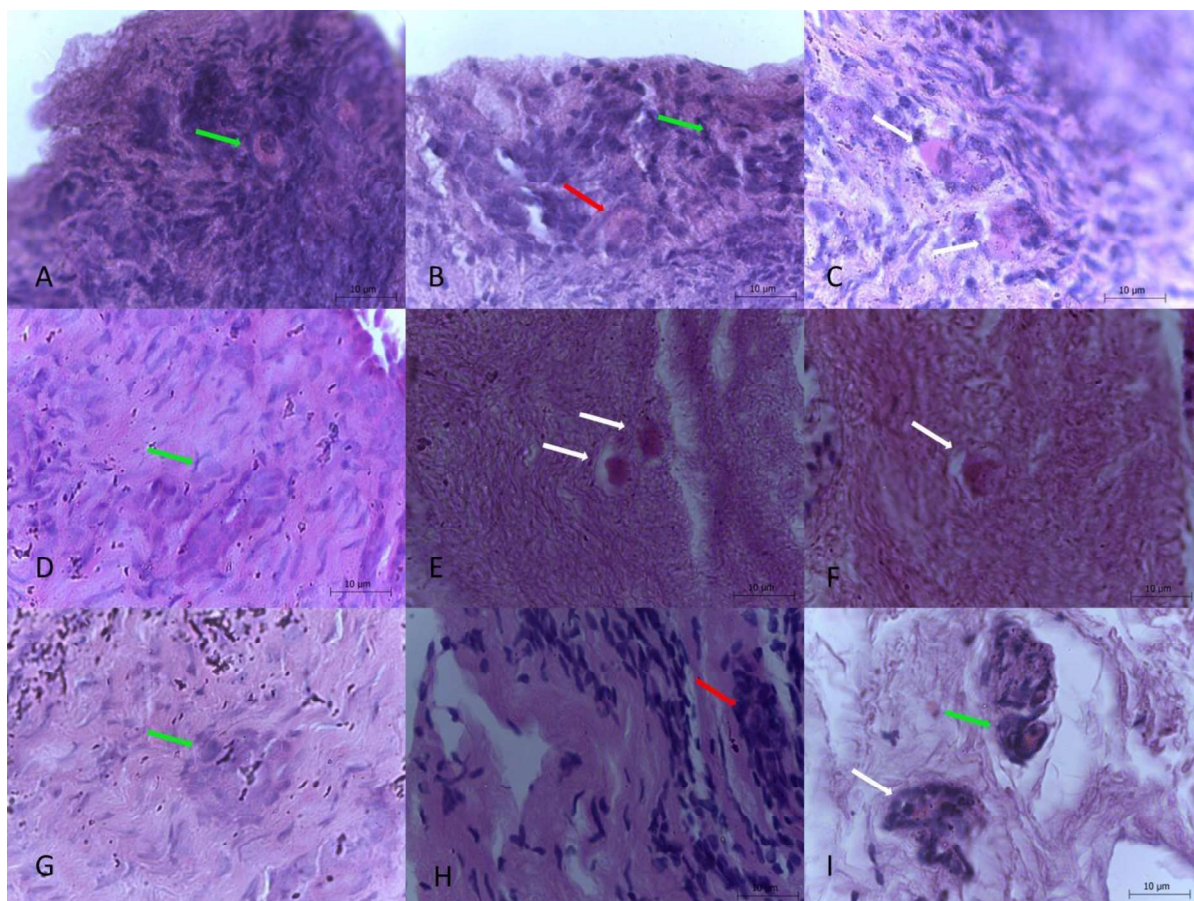


Figura 3. Fotomicrografias do tecido ovariano de cadela. (A) tecido de controle fresco, (B) controle fresco cultivado por 3 dias, (C) controle fresco cultivado por 9 dias, (D) OTC aquecido, (E) OTC cultivado 3 dias, (F) OTC cultivado 9 dias, (G) VIA aquecido, (H) VIA cultivado 3 dias, (I) VIA cultivado 9 dias. As setas verdes indicam folículos primordiais normais, as setas vermelhas indicam folículos primários normais e as setas brancas indicam folículos degenerados.

Avaliação da ultraestrutura folicular

Na microscopia eletrônica de varredura, avaliou-se a qualidade da ultraestrutura do tecido ovariano. Verificou-se possíveis danos à superfície ovariana causados pela vitrificação e observamos a desorganização das células estromais nos tratamentos OTC cultivado 3 e 9 dias comparado ao grupo controle fresco e fresco cultivado por 3 e 9 dias. Ademais, os tratamentos VIA aquecido, VIA cultivado 3 e 9 dias conseguiram manter a organização dos

tecidos com redução do tamanho das células em comparação com o tratamento controle fresco e controle fresco cultivados (Figura 4).

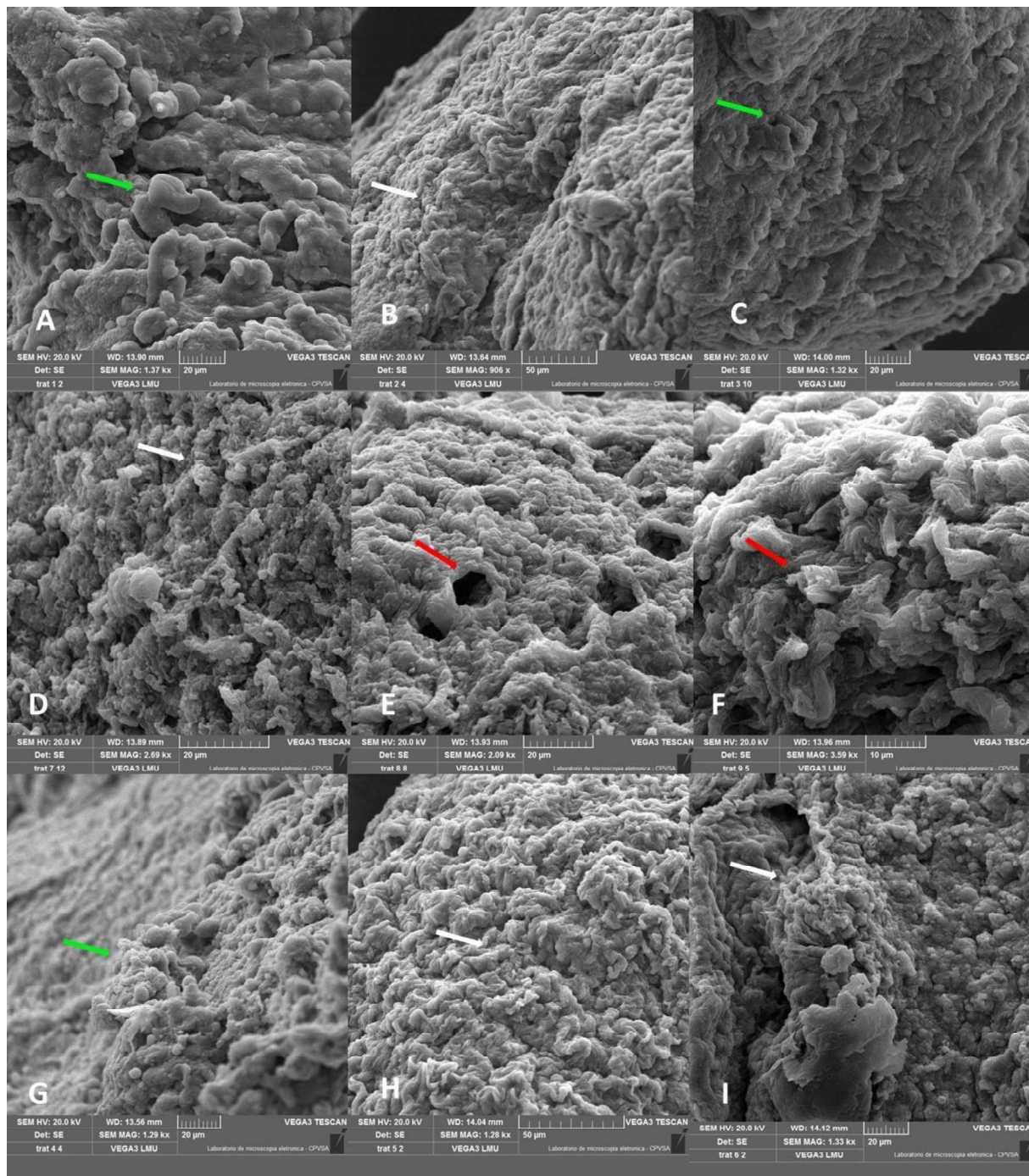


Figura 4. Avaliação da ultraestrutura. (A) tecido de controle fresco, (B) controle fresco cultivado por 3 dias, (C) controle fresco cultivado por 9 dias, (D) OTC aquecido, (E) OTC cultivado 3 dias, (F) OTC cultivado 9 dias, (G) VIA aquecido, (H) VIA cultivado 3 dias, (I) VIA cultivado 9 dias. Seta verde indicando tecido com organização estromal ovariana, seta vermelha indica desorganização do estroma ovariano e seta branca indicada redução do tamanho das células estromais ovarianas.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro ao descrever o processo de criopreservação de tecido ovariano de cadela (*Canis lupus familiaris*) comparando diferentes sistemas fechados de vitrificação, o ovarian tissue cryosystem (OTC) (Carvalho et al., 2013) e a vitrificação por imersão em agulha (VIA) (Fujihara et al, 2019) adaptada. Vale ressaltar também, que este é pioneiro em verificar os efeitos da vitrificação de folículos pré-antrais *in situ* após o cultivo *in vitro* de 3 e 9 dias, avaliando a viabilidade e morfologia folicular, bem como na ultraestrutura do tecido ovariano.

Atualmente, há estudos que comparam a vitrificação e o congelamento lento para conservação do tecido ovariano de cadela. Jivago et al (2018) encontraram que a vitrificação foi superior na preservação dos FOPAS primordial e primário na ultraestrutura. Fujihara et al (2012), observou que apenas os folículos vitrificados mantiveram sua morfologia normal após 5 dias de xenotransplante. Já Stábile et al (2024), relata a superioridade do congelamento lento, uma vez que esta apresentou altas taxas de integridade folicular e baixos níveis de apoptose.

No presente estudo, a VIA adaptada conseguiu preservar a quantidade folicular apresentando uma taxa de 75% ao ser aquecido e aproximadamente, 72% após o cultivo *in vitro*, assemelhando-se ao grupo controle fresco (77%) e fresco cultivado (72%) ($P < 0,05$). Além disso, esta preservou as características morfológicas dos FOPAs após o procedimento de vitrificação. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados por Fujihara et al (2012), no qual os fragmentos cultivados por 15 dias mantiveram sua viabilidade conservada.

Conforme observado, os FOPAS mantiveram sua integridade morfológica nos diferentes tratamentos, exceto no grupo OTC cultivado 9 dias, em que houve uma diferença significativa quanto a morfologia dos FOPAS primordiais e primários. Tal resultado pode ter sido ocasionado em virtude dos danos ao tecido, em decorrência do rápido processo de vitrificação, na qual a superfície metálica tem contato direto com a parte externa do fragmento (Carvalho et al., 2013). Assim, tais danos foram observados apenas após a análise do CIV de 9 dias.

No tocante a proporção das categorias foliculares, observou-se que os folículos primordiais foram mais resistentes que os primários e secundários, após diferentes técnicas de vitrificação e CIV, sendo esperado devido a redução do seu metabolismo, por não possuírem zona pelúcida e apresentar pequena quantidade de lipídios intracitoplasmáticos. Desse modo,

tais condições tornam os FOPAs primordiais menos sensíveis ao processo de criopreservação (Akar e Oktay, 2005). Assim, estas categorias (primordial, primário e secundário) não diferiram entre si, apenas no grupo OTC cultivado (3 e 9 dias) diferiram dos demais grupos. Tal fato pode ter ocorrido devido a quantidade de FOPAs avaliados, todavia, compreende-se devido ao baixo número de fragmentos cultivados e posteriormente processados.

Desse modo, a VIA adaptada conseguiu preservar o material biológico, bem como a funcionalidade celular após a criopreservação. Este resultado provavelmente se deve à rápida vitrificação devido à condução de calor pela agulha, já que não houve contato direto com o nitrogênio, o qual pode causar contaminação (Grout, e Morris, 2009), sendo assim um fator de risco. Além disso, os fragmentos enfiados na agulha e armazenados em criotubos, apresentaram menor variação da mudança de temperatura, sendo esta menos abrupta que a VIA convencional, apresentando também a transição do meio líquido para o estado amorfo rapidamente, permitindo a conservação folicular (Santos et al., 2007).

Vale destacar também a rápida cobertura dos crioprotetores aos fragmentos enfiados na agulha 30 G, no qual fica em contato com o interior dos fragmentos, diferentemente da técnica OTC, já que a solução penetra também por diferença de osmolaridade (Mazur, 1984; Luvoni, 2006), mas há pouca superfície de contato comparada a VIA adaptada. Portanto, a utilização da agulha armazenada em criotubo (material de baixa condutividade térmica, como polipropileno) na VIA adaptada, pode retardar a taxa de resfriamento (Sansinena et al., 2012). Assim, possivelmente a eficiência da vitrificação foi alterada e observou-se que a técnica VIA adaptada, mostrou-se muito promissora para a criopreservação de tecido ovariano em cadelas, podendo ser extrapolada para outras espécies, inclusive canídeos silvestres ameaçados de extinção.

Quanto a microscopia eletrônica de varredura, ressalta-se que não há relato na literatura desta avaliação em tecido ovariano de cadelas, portanto o presente trabalho se destaca por utilizar tal análise como parâmetro para diferenciar a qualidade do tecido após criopreservação utilizando o CIV, a fim de buscar qual o melhor método de vitrificação para a espécie canina. Assim, quanto à ultraestrutura, o OTC foi a única técnica que apresentou redução na qualidade da preservação do tecido nos tratamentos cultivados (3 e 9 dias). Esse fato provavelmente se deve à combinação de lesões que causaram danos aos FOPAs devido à vitrificação, culminando com maior incidência de defeitos. Então, ficou evidente que essa técnica também não preservou

os FOPAS primordiais adequadamente quanto à morfologia no tratamento OTC cultivado 9 dias. Em contrapartida, a técnica VIA demonstrou-se capaz de preservar a ultraestrutura das células da granulosa, bem como das células do estroma nos FOPAs humanos (Xiao et al., 2010).

Para mais, o aumento maior dos cortes transversais do córtex podem ser realizados, uma vez que não foi possível observar a ultraestrutura dos FOPAs para compreender a morfologia funcional do desenvolvimento folicular e das estruturas ovarianas, portanto a ultraestrutura realizada por microscopia eletrônica de transmissão, pode ser uma alternativa para obtenção de informações que favoreçam avanços biotecnológicos reprodutivos no âmbito da conservação animal (Santos et al., 2018) e melhoramento genético. Nesse sentido, vale ressaltar que o conhecimento sobre dados morfométricos dos folículos (Jivago et al., 2018), bem como sobre a capacidade proliferativa celular (AgNOR) (Castro et al., 2014) são imprescindíveis para compreensão da degeneração ou preservação de FOPAs diante das diferentes técnicas de vitrificação após o CIV.

Dado o exposto, evidenciou-se que houve diferença significativa entre os sistemas fechados (OTC e VIA adaptada). No entanto, apesar do OTC destaca-se por ser um dispositivo de fácil manuseio, reutilizável e por armazenar uma quantidade maior de fragmentos (Carvalho et al., 2013), a VIA adaptada sobressaiu-se por melhor preservar a viabilidade folicular, morfologia e a ultraestrutura do tecido ovariano, demonstrando-se o método de vitrificação mais promissora para a criopreservação de FOPAs caninos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os métodos de vitrificação avaliados o OTC e VIA, esta última é a mais recomendada para a vitrificação em tecido ovariano de cadela, uma vez que apresentou-se mais eficiente ao manter a sobrevivência dos folículos pré-antrais inclusos no tecido após o cultivo *in vitro* de 3 e 9 dias.

Dado o exposto, a partir dessas informações, há a possibilidade de um maior desenvolvimento, aperfeiçoamento e adaptação de técnicas de reprodução assistida com o intuito de salvaguardar o material genético desta espécie em bancos de germoplasma, bem como de espécies filogeneticamente relacionadas.

REFERÊNCIAS

ABEDELAAHI, A., Salehnia, M., & Allameh, A. A. (2010). Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. **Human Reproduction**, 25, 977-985.

AMORIM, C. A., Jacobs, S., Devireddy, R. V., Van Langendonck, A., Vanacker, J., Jaeger, J. Dolmans, M.-M. (2013). Successful vitrification and autografting of baboon (*Papio anubis*) ovarian tissue. **Human Reproduction**, 28(8), 2146–2156.

ANDRADE, E. R., Van Den Hurk, R., Lisboa, L. A., Hertel, M. F., Melo-Sterza, F. A., Moreno, K., Bracarense, A. P., Landim-Alvarenga, F. C., Seneda, M. M., & Alfieri, A. A. (2012). Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, 5, 1-10.

ARUNAKUMARI, G., Shanmugasundaram, N., & Rao, V. H. (2010). Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, 74, 884-894.

BASSO AC, Esper CR. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, p.311–331, 2002.

BRANDÃO, F. A. S., Alves, K. A., Brito, D. C. C., Pereira, L. M. C., Morais, G. B., Nãupas, L. V. S., ... Teixeira, D. Í. A. (2021). Vitrification of canine ovarian tissue using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) device. **Reproduction in Domestic Animals**, 56(8), 1156–1161.

BRISTOL-GOULD S, Woodruff TK. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.513, 2006.

CARVALHO, AA; FAUSTINO, LR; SILVA, CM; CASTRO, SV; LOPES, CA; SANTOS, RR; BÁO, SN; FIGUEIREDO, JR; RODRIGUES, AP Novo método de ampla capacidade para vitrificação de ovários caprinos: Criosistema de Tecido Ovariano (OTC). **Ciência da Reprodução Animal**. v.138, n. (3-4), pág. 220-7, 2013.

CASTRO, SV, Carvalho, AA, Silva, CM, Santos, FW, Campello, CC, Figueiredo, JR, Rodrigues, AP (2014) Tecido ovariano congelado e fresco requer diferentes meios de cultura

para promover o desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais bovinos. **Biopreservação e biobanco**. 12,5.

COSTA, P.M.; MARTINS, C.F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Univ. Ci. Saúde, Brasília**, v.6, n.1, p.3955, jan/jun, 2008.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. anim.**, v.34, p.3749, 2010.

DERUSSI, A. A. P.; LOPES, M. D. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 231-237, 2009.

DURLEJ, M. G., Duda, M., Knapcyk, K., & Słomczyńska, M. (2008). Effects of transferrin on aromatase activity in porcine granulosa cells in vitro. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, 46, 423-428.

DURRANT B.S., Pratt N.C., Russ K.D., Bolamba D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology** 49:917-32

FAIR T, Hulshof CJ, Hyttel P, Greve T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anat Embryol**, v.195, p.327–336, 1997a.

FAUSTINO, L.R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.35, v.1, p.3-15, 2011.

FATHI R, Valojerdi SENHOR, Eimani H, HASAN F, Ele escreveu SOBRE, Ajdaru A PARTIR DE, Tahaei LS. Vitrificação de tecido ovariano de ovelhas por dois diferentes protocolos de desidratação e métodos de imersão de agulhas, **Cartas criogênicas**, 2011, vol. 32 (pág. 51-56)

FAYRER-HOSKEN RA, Dookwah HD, Brandon CI. Immunocontrol in dogs. **Anim Reprod Sci**, v.60/61, p.365372, 2000.

FIGUEIREDO J.R., Gonçalves P.B.D., Freitas V.J.F. 2008. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2 ed. Roca, São Paulo, p.408.

FIGUEIREDO, J. R., Rodrigues, A. P. R., Amorim, C. A., & Silva, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-natais, In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Editors). (2008). **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução animal**. São Paulo: Roca, 261-291.

FIGUEIREDO J.R., Gonçalves, P.B.D., Freitas, V.J.F. 2002. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª edição. Varela, São Paulo, p.340.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 5, p. 845-858, 1995.

FIGUEIREDO, j. R., J. J. H. Celestino, A.P.R. Rodrigues, and J.R.V. Silva, 2007: Importância da biotécnica de MIOFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 31, 143-152.

FIGUEIREDO, J. R., Hulshof, S. C., Van Den Hurk, R., Nusgens, B., Bevers, M. M., Ectors, F. J., & Beckers, J. F. (1994). Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, 41, 1333-1346.

FUJIHARA, M., Kaneko, T. & Inoue-Murayama, M. A vitrificação de tecidos ovarianos caninos com polivinilpirrolidona preserva a sobrevivência e a capacidade de desenvolvimento dos folículos primordiais. **Sci Rep** n.9, p. 3970,2019.

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. s6, p. 102–108, dez. 2012.

GROUT, BWW & MORRIS, GJ 2009. Vapor de nitrogênio líquido contaminado como fator de risco na transferência de patógenos. **Teriogenologia**. 71: 1079-1082.

HARTSHORNE GM. In vitro culture of ovarian follicles. **Rev Reprod**, v.2, p.94-104, 1997.

HICKEY TE, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor-9 on porcine granulosa cells. **Biol Reprod**, v.73, p.825-832, 2005.

HYTTEL P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23–32, 1997.

HULSHOF S.C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly** 16:78-80.

HULSHOF SCJ, Figueiredo JR, Bekers, JF, Bevers MM, Van Den Hurk R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet Quart**, v.2, n.16, p.78–80, 1994.

KITAGAWA, B. Y.; Coutinho, S. D. 2004. Benefícios advindos da interação homem-cão. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde**;22(2):123-128.

LEITÃO, C. C. F., Costa, J. J. N., Brito, I. R., Magalhães-Padilha, D. M., Almeida, A. P., Figueiredo, J. R., Van Den Huk, R., & Silva, J. R. V. (2014). Effects of GDF-9 and FSH on mRNA expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs in in vitro cultured goat preantral follicles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(2), 200-208.

LIMA, G.L.; SANTOS, E.A.A.; LIMA, L.F.; LUZ, V.B.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, A.R. Preservação de folículos ovarianos pré antrais de *Pecari tajacu* por curtos períodos utilizando meios a base de solução salina fosfatada tamponada (PBS) ou água de coco em pó (ACP). **Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia (in press)**, 2014.

LOPES, C.A.P.; DOS SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short- term preservation of canine preantral follicles: effects of temperature, medium and time. **Anim. Reprod. Sci.** 115, 2012-14, 2009.

LOPES KRF, Silva AR. Considerações sobre a importância do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) dentro da sociedade humana. **Acta Vet Bras**, v.6, p.177–185, 2012.

LUCCI CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bão N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Res**, v.41, p.61–69, 2001.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v.66, p.101–111, 2006

LUZ MR, Silva AR. Reprodução de Cães. **Barueri:Manole**. 2019, 432p.

MARKSTRÖM E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23–30, 2002.

MARTINS F.S., Silva J.R.V., Rodrigues A.P.R., Figueiredo J.R. 2008. Fatores Reguladores da Foliculogênese em Mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte** 32(1):36-49.

MAYER LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biol Reprod**, v.71, p.130-138, 2004.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v.247, p.125–142, 1984.

MCLAUGHLIN, M., & Telfer, E. E. (2010). Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, 139, 971-978.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T; Embryo development and structural analysis of in vitro matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. **Theriogenology** 70(9), 1536-1543, 2008.

MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrication of oocytes, embryos and blastocysts. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology** 26, 789-803, 2012.

PICTON, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., & Chambers, E. L. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, 136(6), 703-715.

ROCHA, C. D. Vitricação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol. 2017. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – **Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia**, 2017.

LUZ, N.R.N. Comparison of open and closed-methods for the vitrication of preantral follicles enclosed in canine ovarian tissue. *In*: X International Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR). 10., 2024, Fortaleza. Anais. **Anim Reprod**, 2024. p.11-11.

ROSSETTO R, Lima IMT, Saraiva MVA, Lima-Verde ETS, Figueiredo JR. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Act Vet Bras**, v.5, ed.1, p.15–23, 2011.

SANTOS, RR; Tharasanit, T.; Van Haeften, T.; Figueiredo, JR; Silva, JRV; Van den Hurk, R. Vitricação de folículos pré-antrais de cabra encerrados em tecido ovariano usando métodos convencionais e de vitricação de superfície sólida. **Pesquisa de Tecido Celular**, v.327, n.1, p.167-176, 2007.

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. **Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte**, v.32, n.1, p.9-15, jan./mar. 2008.

SANTOS, E. A. A., Lima, G. L., Praxedes, E. C. G., Silva, A. M., Maia, K. M., Oliveira, M. F., Silva, A. R. (2018). Estimation, morphometry and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in agouti (*Dasyprocta leporina*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(1), 175–182. doi:10.1590/1678-5150-pvb-4946

SANSINENA M, Santos MV, Zaritzky N, Chirife J. Comparison of heat transfer in liquid and slush nitrogen by numerical simulation of cooling rates for French straws used for sperm cryopreservation. **Theriogenology**. 2012; 77, 1717–1721

SAUMANDE, J.; CAHILL, L. P.; RAVAUULT, J. P.; BLANC, M.; THIMONIER, J.; MARIANA, J. C. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 141-150, 1981.

SILVA, A. R.; LUZ, M. R. Particularidades reprodutivas raciais na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 453–458, 2021.

SMITX, J.E.J; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*, **Reproduction** 123, 185-202, 2002.

SPANEL-BOROWSKI K. 1981. Morphological investigations on follicular atresia in canine ovaries. **Cell. Tiss. Res.** 214:158-168.

STÁBILE, N.A.L. et al. Cryopreservation of canine ovarian tissue by slow freezing and vitrification: Evaluation of follicular morphology and apoptosis rate. **Theriogenology**, v. 230, p. 8–14, dez. 2024.

TELFER EE. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v.45.

TELFER EE, McLaughlin M, Ding C, Joo Thong K. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod**, v.23, ed.5, p.1151–1158, 2008.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol reprod Dev.** 51(1), 53-58, 1998.

WANG Y, Xiao Z, Li L, Fan W, Li Sw. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. **Hum Reprod**, v.23, p.2256-2265, 2008.

WILLIAMS GL. Suckling as regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **J Anim Sci**, v.68, p.831-852, 1990.

XIAO, Z., Wang, Y., Li, L., Luo, S., & Li, S.-W. (2010). Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and Sterility**, 94(6), 2323–2328.