



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

MARIANA MENDONÇA MAIA CAVALCANTE

**VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS DE “FELIS CATUS” EM SISTEMA SIMPLIFICADO
E DE BAIXO CUSTO: UM MODELO ALTERNATIVO DE BASE PARA
APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE FELÍDEOS**

MACEIÓ – ALAGOAS

2021

MARIANA MENDONÇA MAIA CAVALCANTE

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS DE “FELIS CATUS” EM SISTEMA SIMPLIFICADO E DE BAIXO CUSTO: UM MODELO ALTERNATIVO DE BASE PARA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE FELÍDEOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-graduação em Biotecnologia da Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valesca Barreto Luz.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Camila Calado Vasconcelos.

MACEIÓ – ALAGOAS

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Cavalcante, Mariana Mendonca Maia.

Vitrificação de óocitos de *Felis catus* em sistema simplificado e de baixo custo: um modelo alternativo de base para aplicação na conservação de felídeos [recurso eletrônico] / Mariana Mendonca Maia Cavalcante. - 2021.

88 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Maceió, 2021.

Orientação: Prof.^a Pós-Dra. Valesca Barreto Luz.

Coorientação: Prof.^a Pós-Dra. Camila Calado de Vasconcelos.

1. Criopreservação. 2. Álcool de polivinil.

MARIANA MENDONÇA MAIA CAVALCANTE

VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS DE “FELIS CATUS” EM SISTEMA SIMPLIFICADO E DE BAIXO CUSTO: UM MODELO ALTERNATIVO DE BASE PARA APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE FELÍDEOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 27 de janeiro de 2021.

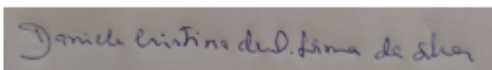
BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Valesca Barreto Luz
(Orientadora)
Centro Universitário CESMAC - CESMAC



Prof. Dr. Silvio Romero de Oliveira Abreu
(Examinador Externo)
Centro Universitário CESMAC - CESMAC



Prof.ª Dr.ª Daniele Cristina de Oliveira Lima da Silva
(Examinadora Externa)
Centro Universitário CESMAC - CESMAC



Prof.ª Dr.ª Gabriela Liberalino Lima
(Examinadora Externa)
IFCE – Campus Crato-CE

Aos meus pais: Elísio da Silva Maia Júnior
e Ivonilda de Araújo Mendonça Maia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao meu marido, Fábio Borba Cavalcante, por ser meu verdadeiro companheiro de jornada e por ter ficado para “o que der e vier comigo”.

Aos meus pais, Elísio da Silva Maia Júnior e Ivonilda de Araújo Mendonça Maia, por todo o empenho durante o meu crescimento.

Às minhas filhas, Lis Maia Borba Cavalcante e Lara Maia Borba Cavalcante, pela paciência durante as minhas ausências como mãe.

À Prof.^a Dr.^a Valesca Barreto Luz, por toda a paciência, motivação, orientação e incentivo no decorrer da caminhada.

À Prof.^a Dr.^a Camila Calado Vasconcelos, pela orientação e ajuda ofertada.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rodrigues da Silva da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), pela concessão do azul de tripan.

À prof. Dr.^a Cristiane Clemente de Mello Salgueiro pela prestimosa revisão do ajuste da presente dissertação às normas do mestrado.

Ao Prof. Dr. Laércio Pol Fachin, pela revisão da análise estatística após a qualificação da presente dissertação.

Ao Prof. MSc. João Geraldo de Oliveira Lima, pela orientação referente ao processo patentário.

Aos membros da banca de qualificação e de defesa, Prof. Dr. Silvio Romero de Oliveira Abreu, Prof.^a Dr.^a Daniele Cristina de Oliveira Lima da Silva, Prof.^a Dr.^a Vanessa Raquel Pinto de Barros e Prof.^a Dr.^a Gabriela Liberalino Lima, pela grande contribuição e enriquecimento do trabalho.

Ao mestrando Márcio Calixto Matias, pela disposição em ajudar na realização desse experimento.

Ao doutorando Agnelo Douglas do Nascimento Júnior, também pela disposição em ajudar na elaboração desse experimento.

À equipe da Pet's House, por toda a disponibilidade.

À equipe da Nordeste *in vitro*.

Aos colegas de mestrado, pelo compartilhamento da jornada.

“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe por provar o contrário.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Foram desenvolvidas várias técnicas para conservação de recursos biológicos como estratégia para a manutenção da biodiversidade e variabilidade genética, especialmente para felídeos selvagens ameaçados de extinção. Uma das técnicas mais promissoras e que permite uma vasta possibilidade de conservação de recursos genéticos é a vitrificação de oócitos, a qual consiste em submeter os oócitos juntamente com crioprotetores a criotemperaturas até que os mesmos adquiram as propriedades de um sólido. Com o objetivo de diminuir a citotoxicidade de crioprotetores e aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos felinos, foi desenvolvido um meio simples para felinos domésticos contendo álcool polivinílico, com subsequente vitrificação de oócitos em hemi-palhetas francesas de 0,25 cc. Após a ovariosalpingohisterectomia (OSH) em clínicas veterinárias de Maceió-AL, os ovários foram colocados em tubos de *Falcon* contendo soro fisiológico e encaminhados a um laboratório de Alagoas para o procedimento de *slicing* e recuperação dos complexos cumulus-oócito (COCs) sob estereomicroscópio. Foram recuperados 817 oócitos e foram selecionados para a vitrificação 540 oócitos provenientes de 22 pares ovários de gatas domésticas, sendo vitrificado um total de 249 oócitos (n=249), enquanto que o controle foi composto de 112 oócitos. A vitrificação foi feita transferindo os oócitos para a gota E1 formada por solução de equilíbrio composta por 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO), 7,5% de etileoglicol, 0,1% de álcool polivinílico em meio base de solução de tampão de fosfato salino (PBS). Os oócitos ficaram 30 segundos na primeira gota e depois 4 minutos na segunda gota (E2) também formada por solução de equilíbrio, numa relação oócitos/meio de 10 oócitos/100 µL. Em sequência, os oócitos foram transferidos para a terceira gota (V1) contendo solução de vitrificação, composta de 15% de DMSO, 15% de etilenoglicol, 0,1% de álcool polivinílico e 0,3M de sacarose. Os oócitos permaneceram na terceira gota por 2 minutos. 150 oócitos foram desvitrificados e destes, 48 oócitos (32%) foram considerados viáveis e 102 oócitos (68%) foram classificados como não viáveis ao passo que 53 (47,32%) oócitos do grupo controle foram considerados não-viáveis e 59 (52,67%) oócitos foram classificados como viáveis. O meio de vitrificação desenvolvido no presente estudo obteve êxito similar a meios menos enriquecidos encontrados na literatura. Entretanto, mais estudos são necessários para a avaliação de outras taxas importantes, como a

taxa de maturação oocitária, taxa de fecundação, taxa de clivagem e taxa de formação de blastocisto.

Palavras-chave: Criopreservação. Álcool de polivinil. Felidae. Banco de germoplasma.

ABSTRACT

Several techniques have been developed for the conservation of biological resources as a strategy for the maintenance of biodiversity and genetic variability, especially for endangered wild felids. One of the most promising techniques that allows a vast possibility of conservation of genetic resources is the vitrification of oocytes, which consists of subjecting the oocytes together with cryoprotectors to cryotemperatures until they acquire the properties of a solid. In order to reduce the cytotoxicity of cryoprotectors and improve the technique of vitrification of feline oocytes, a simple medium was developed for domestic cats containing polyvinyl alcohol, with subsequent vitrification of oocytes in french hemi-reeds of 0.25 cc. After OSH in veterinary clinics of Maceió-AL, the ovaries were placed in Falcon tubes containing saline solution and sent to a laboratory in Alagoas for the procedure of slicing and recovery of COCs under stereomicroscope. 817 oocytes were recovered and 540 oocytes from 22 pairs of ovaries of domestic cats were selected to vitrification, and a total of 249 oocytes (n=249) were vitrified, while the control was composed of 112 oocytes. Vitrification was performed by transferring the oocytes to the E1 drop formed by an equilibrium solution composed of 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO), 7.5% ethylene glycol, 0.1% polyvinyl alcohol in a base medium of saline phosphate buffer (PBS) solution. The oocytes remained for 30 seconds in the first drop and then 4 minutes in the second drop (E2) also formed by equilibrium solution, in an oocytes/medium ratio of 10 oocytes/100 μ L. In sequence, the oocytes were transferred to the third drop (V1) containing vitrification solution, composed of 15% DMSO, 15% ethylene glycol, 0.1% polyvinyl alcohol and 0.3M sucrose. The oocytes remained at the third drop for 2 minutes. After vitrification, the oocytes were thawed and analyzed together with the control group in relation to their viability after staining with Trypan's blue in a ratio of 5 μ L per 100 μ L of PBS. 150 oocytes were thawed and of these, 48 oocytes (32%) were considered viable and 102 oocytes (68%) were classified as non-viable while 53 (47.32%) oocytes of the control group were considered non-viable and 59 (52.67%) oocytes were classified as viable. The vitrification medium developed in the present study was similar to less enriched media found in the literature. However, further studies are needed to evaluate other important rates, such as oocyte maturation rate, fertilization rate, cleavage rate and blastocyst formation rate.

Keywords: Cryopreservation. Polyvinyl alcohol. Felidae. Germplasm bank.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 - Oócito com a membrana plasmática íntegra após a aplicação do corante azul de Tripán.....	50
Figura 2 - Oócito com membrana plasmática rompida após aplicação do corante azul de Tripán.....	50
Figura 3 - Gráfico de distribuição das patentes de acordo com os descritores.....	53
Figura 4 - Deposição de oócitos felinos juntamente com meio de vitrificação simples em hemi-palheta.....	57
Figura 5 - Fluxograma das fases do experimento.....	58
Figura 6 - Tubo tipo Falcon contendo ovários felinos e soro fisiológico.....	59
Figura 7 - Ovários felinos na placa de Petri antes do “slicing”.....	59
Figura 8 - “Pool” de oócitos felinos classificados como grau I, II, III e degenerados.....	60
Figura 9 - Placa de Petri de 90 x 15 mm contendo três gotas de 100 µl de meio artesanal.....	61
Figura 10 - Sequência de vitrificação dos oócitos no meio desenvolvido.....	62
Figura 11 - Hemi-palheta de 0,25 cc com extremidade em bisel.....	62
Figura 12 - Oócitos depositados na extremidade em bisel de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc.....	62
Figura 13 - Aquecimento e coloração com azul de Tripán.....	64
Figura 14 - Oócito não-corado com células do cumulus coradas ao redor.....	65
Figura 15 - Oócito viável no canto superior junto de oócitos não-viáveis.....	66
Figura 16 - Oócito não-corado com células do cumulus coradas ao redor.....	66
Quadro 1 - Distribuição das patentes.....	53

Quadro 2 - Caracterização de documentos relevantes no âmbito patentário.....	54
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPs	Agentes crioprotetores
BSA	Albumina sérica bovina
COC	Complexo cumulus-oócito
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOI	<i>Digital Object Identifier</i>
FIV	<i>Fecundação in vitro</i>
HSA	Albumina Sérica Humana
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ISBN	<i>International Standard Book Number</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PROH	1,2 propanodiol
SFB	Soro Fetal Bovino
SSS	Substituto sintético de soro
TE	transferência de embriões
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 CAPÍTULO 1 – OBTENÇÃO DE OÓCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS COMO ESTRATÉGIA PARA PRESERVAÇÃO DE FELÍDEOS SELVAGENS.....	20
2.2 CAPÍTULO 2 – PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES: O QUE VOCÊ PRECISA SABER.....	31
2.3 SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS.....	44
2.3.1 Dimetilsulfóxido.....	45
2.3.2 Etilenoglicol.....	45
2.3.3 Sacarose.....	46
2.3.4 Álcool polivinílico.....	47
2.4 IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO PARA A ANÁLISE DA VIABILIDADE OOCITÁRIA.....	48
2.5 EMPREGO DO AZUL DE TRIPAN PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITÁRIA PÓS VITRIFICAÇÃO.....	49
2.6 REVISÃO PATENTÁRIA.....	51
3 MATERIAL E METODOS.....	57
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	57
3.2 MODELO DE ESTUDO.....	57
3.3 FASES DO EXPERIMENTO.....	58
3.4 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS OÓCITOS.....	58
3.5 VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS.....	60
3.5.1 Protocolo de vitrificação do meio simples.....	60
3.5.2 Formação do grupo controle.....	63
3.6 AQUECIMENTO E AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E DA VIABILIDADE OOCITÁRIA.....	63
4 RESULTADOS.....	65
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONCLUSÃO.....	77

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS.....	87
ANEXO A – COMPROVANTE DE DEPÓSITO DE PATENTE.....	88

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de conservação de espécies selvagens mostra-se cada vez mais relevante à medida que o hábitat natural desses animais é fragmentado por populações humanas em expansão de centros urbanos e exploração de recursos naturais. Por esse motivo, felídeos selvagens são constantemente afetados por esses fatores e também pela caça ilegal (JANECKA *et al.*, 2014; RUEDA-ZOZAVA *et al.*, 2016).

No Brasil, muitas populações dessas espécies encontram-se em vias de extinção, passando pelos indicadores de espécie vulnerável a criticamente em risco de extinção, apesar da existência de estratégias conservacionistas de órgãos ambientais amparadas por legislação, como a *Panthera onca*, *Leopardus colocolo*, *Leopardus geoffroyi*, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus wiedii* e *Puma yagouaroundi* [INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio), 2018; PRAXEDES *et al.*, 2018].

Visando à proteção e manutenção de espécies ameaçadas de extinção, foram desenvolvidas várias técnicas para conservação de recursos biológicos como estratégia para a manutenção da biodiversidade e variabilidade genética, especialmente para felídeos selvagens ameaçados de extinção, como a formação de bancos de germoplasma animal (JANECKA *et al.*, 2014; KENNEY *et al.*, 2014).

Como os felídeos ameaçados de extinção habitualmente encontram-se em reservas distantes das unidades responsáveis pelos bancos de germoplasma e submetê-los a processos repetitivos de aspiração oocitária para o desenvolvimento de protocolos de vitrificação gera efeitos negativos para o animal e, por isso, é necessário que se estabeleça um modelo experimental, sendo esse papel cumprido com maestria pelo gato doméstico, *Felis silvestres catus*. Pois, possibilitam o aperfeiçoamento da técnica, bem como o aumento de conhecimento a respeito dos aspectos reprodutivos de felídeos com uma maior acessibilidade e menor custo possível (GUTIERREZ, 2014).

Nesse sentido, protocolos utilizando germoplasma de felídeos selvagens podem ser preliminarmente explorados em gatos domésticos para que depois sejam estendidos às espécies selvagens, resguardando-se a necessidade de eventuais alterações pontuais, tendo como base algumas

diferenças fisiológicas existentes entre as espécies. De tal forma que essa exploração em felinos traz repercussões positivas até mesmo para o aprimoramento de biotécnicas que permitam o melhoramento genético em raças de gatos domésticos (MACHADO *et al.*, 2016).

A criopreservação em fêmeas pode ser executada por intermédio da técnica de vitrificação de oócitos, visto que a mesma é um método termodinâmico ultrarrápido, a qual consiste em submeter os oócitos a criotemperaturas até que os mesmos adquiram as propriedades de um sólido. Isto permite uma redução na formação de cristais de gelo intracelulares (ARAYATHAM; TIPTANAVATTANA; THARASANIT, 2017; BAGCHI; WOODS; CRISTER, 2008; MACHADO *et al.*, 2016; SANTIN; BLUME; MONDADORI, 2009).

Para essa biotécnica, os crioprotetores são altamente necessários, por serem os responsáveis pela substituição de água na célula, o que permite a sua criopreservação. Contudo, altas concentrações de crioprotetores são citotóxicas a temperatura ambiente durante o período de exposição ao agente crioprotetor e no momento da descongelação.

Por isso, é muito comum a adição de substâncias que auxiliem na proteção da integridade do oócito e que diminuam a citotoxicidade dos crioprotetores à temperatura ambiente para aumentar a eficiência do meio de vitrificação e sucesso do procedimento.

Dentre essas muitas substâncias que podem ser adicionadas ao meio, o soro fetal bovino (SFB) é a substância mais acrescentada ao meio de vitrificação, apesar de uma série de controvérsias que o envolve, como o sofrimento desnecessário para o feto, dificuldade de controle de qualidade, contaminação por vírus e outros patógenos, além da dificuldade de aquisição para a maioria dos pesquisadores brasileiros devido ao seu alto custo (FAUSTINO *et al.*, 2011; MOURA; CAMARGO JÚNIOR, 2017; VALK *et al.*, 2018).

Por isso, há necessidade do desenvolvimento de um meio de vitrificação simples, eficaz, acessível, que não contenha o SFB e que possa ser utilizado por pesquisadores para aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos felinos, que servem como modelo experimental de felídeos selvagens, com o

intuito de formar bancos de germoplasma e eliminar o problema do risco de extinção dessas espécies.

Portanto, com o objetivo de diminuir a citotoxicidade no período de exposição dos oócitos a agentes crioprotectores à temperatura ambiente, bem como aprimorar a técnica de vitrificação de oócitos felinos, foi desenvolvido um meio simples para felinos domésticos contendo álcool polivinílico em substituição ao SFB, avaliando-se a viabilidade oocitária baseada em padrões morfológicos oocitários com o corante vital Azul de Tripán no período de pós-aquecimento, com o intuito de servir de modelo experimental para a formação de bancos de germoplasma para felídeos ameaçados de extinção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura será iniciada com dois capítulos de livro que já foram publicados, decorrentes do tema do estudo do projeto de mestrado e complementa-se com tópicos mais específicos sobre as soluções crioprotetoras utilizadas e os métodos de avaliação da viabilidade oocitária.

2.1 CAPÍTULO 1

Publicado pela Editora Atena no Livro Eletrônico “Conservação da Biodiversidade e Desenvolvimento Socioambiental” em 2020. ISBN: 978-65-5706-076-6. DOI: 10.22533/at.ed.766202705.

OBTENÇÃO DE OOCITOS DE GATAS DOMÉSTICAS COMO ESTRATÉGIA PARA PRESERVAÇÃO DE FELÍDEOS SELVAGENS

(Obtaining domestic cat oocytes as a strategy for the preservation of wild felids)

Mariana Mendonça Maia Cavalcante

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Paula Berenice Melo de Miranda Motta

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Silvio Romero de Oliveira Abreu

Centro Universitário Cesmac, Curso de Medicina Veterinária, Maceió - AL

Giovana Patrícia de Oliveira e Souza Anderlini

Centro Universitário Cesmac, Curso de Medicina Veterinária, Maceió - AL

Mariah Tenório de Carvalho Souza

Centro Universitário Cesmac, Curso de Medicina Veterinária, Maceió - AL

Marcos Antônio Vieira Filho

Centro Universitário Cesmac, Criatório Conservacionista, Marechal Deodoro - AL

Camila Calado de Vasconcelos

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Valesca Barreto Luz

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

RESUMO: Os felídeos selvagens são constantemente afetados à medida que o habitat natural desses animais é fragmentado por populações humanas em expansão de centros urbanos, exploração de recursos naturais bem como pela caça ilegal, sendo relevante a obtenção de estratégias para conservação do material genético desses animais. Uma das técnicas mais promissoras e que permite uma vasta possibilidade de conservação de recursos genéticos é a preservação de diferentes materiais, células somáticas e/ou gametas, cognominados de germoplasma. Nesse sentido, protocolos utilizando germoplasma de felídeos selvagens podem ser preliminarmente explorados em gatos domésticos para que depois sejam estendidos às espécies selvagens, destacando-se a necessidade de alterações pontuais, tendo como base algumas diferenças fisiológicas existentes entre as espécies. Diante do exposto a presente revisão objetiva relatar a importância de técnicas de recuperação oocitária tendo em vista o desenvolvimento de protocolos de preservação de germoplasma em felídeos selvagens.

PALAVRAS-CHAVES: Gameta feminino; Conservação de germoplasma; *Felis catus*.

ABSTRACT: Wild felids are constantly affected as the natural habitat of these animals is fragmented by expanding human populations of urban centers, exploitation of natural resources as well as illegal hunting, and it is relevant to obtain strategies for the conservation of genetic material of these animals. One of the most promising techniques that allows a vast possibility of conservation of genetic resources is the preservation of different materials, somatic cells and/or gametes, known as germplasm. In this sense, protocols using wild felid germplasm can be preliminarily explored in domestic cats so that they can then be extended to wild species, highlighting the need for specific changes, based on some physiological differences existing between species. In view of the present, this review aims to report the importance of oocyte recovery techniques in view of the development of germplasm preservation protocols in wild felids.

KEYWORDS: Female gamete; Germplasm conservation; *Felis catus*.

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de conservação de espécies selvagens mostra-se cada vez mais relevante à medida que o hábitat natural desses animais é substituído por áreas de expansão urbana e exploração de recursos naturais. Com isso, felídeos selvagens são constantemente afetados sofrendo também pela caça ilegal (JANECKA *et al.*, 2014; PRAXEDES *et al.*, 2018; RUEDA-ZOZAVA *et al.*, 2016).

No Brasil, muitas populações dessas espécies, como *Panthera onca*, *Leopardus colocolo*, *Leopardus geoffroyi*, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus wiedii* e *Puma yagouaroundi*, encontram-se em vias de extinção apesar da existência de estratégias conservacionistas de órgãos ambientais amparadas por legislação (PRAXEDES *et al.*, 2018).

Visando a proteção e manutenção de espécies ameaçadas de extinção, foram desenvolvidas várias técnicas para conservação de recursos biológicos como estratégia para a manutenção da biodiversidade e variabilidade genética, especialmente para felídeos selvagens ameaçados de extinção (JANECKA *et al.*, 2014; KENNEY *et al.*, 2014).

Uma das técnicas mais promissoras e que permite uma vasta possibilidade de conservação de recursos genéticos é a preservação de diferentes materiais, células somáticas e/ou gametas, cognominados de germoplasma. Posteriormente, esses materiais podem ser empregados em programas de conservação de fauna, bem como estudos evolucionários, comparativos, taxonômicos, ecológicos e biotecnológicos (MACHADO *et al.*, 2016; NAPOLITANO *et al.*, 2015).

Como os felídeos ameaçados de extinção encontram-se habitualmente em reservas distantes das unidades responsáveis pelos bancos de germoplasma é necessário que se estabeleça um modelo experimental, sendo esse papel cumprido com maestria pelo gato doméstico, *Felis catus*, pois, permite o aperfeiçoamento da técnica, bem como o aumento de conhecimento a respeito dos aspectos reprodutivos de felídeos com uma maior acessibilidade e menor custo possível (GUTIERREZ, 2014).

Algumas técnicas já consagradas para a formação e manutenção de bancos de germoplasma consistem no processo de criopreservação de gametas, pois possibilitam a produção *in vitro* (PIV) de embriões e possui um custo monetário inferior, bem como uma maior taxa de sucesso que a criopreservação de células somáticas destinadas à utilização em processos de clonagem por transferência nuclear. Para a preservação de gametas femininos, utiliza-se o processo de vitrificação de oócitos obtidos através de técnicas como *slicing* e/ou punção aspirativa (JANECKA *et al.*, 2014; KENNEY *et al.*, 2014).

As técnicas diferem entre si e dependendo do método utilizado pode haver diferença na taxa de sucesso e na otimização do processo de criopreservação e consequente PIV. Um dos fatores mais importantes que podem influenciar o sucesso da PIV é a recuperação eficiente dos complexos cumulus-oócito (COC). Um grande número de oócitos de boa qualidade é necessário para a formação de bancos de germoplasma, uma vez que apenas partes desses oócitos retomam a meiose (taxa de maturação) e apenas uma fração dos oócitos recuperados desenvolvem-se em blastocistos (WARZYCH *et al.*, 2007).

Assim como os bancos de germoplasma, a utilização de biotécnicas reprodutivas em felinos, incluindo a maturação e fecundação *in vitro* de oócitos (MIV e FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), a

criopreservação de folículos, oócitos, sêmen e embriões, com subsequente transferência embrionária (TE) também são de suma importância nesse combate à extinção (FARSTAD, 2000).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DIFICULDADE DE PRESERVAÇÃO DE FELÍDEOS SILVESTRES AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO

A propagação, dominância e expansão dos seres humanos precipitaram um risco de extinção da biodiversidade de caráter mundial, devido à fragmentação e perda do habitat natural dos animais. Estabelecer e manter áreas protegidas são ferramentas fundamentais para a conservação de felídeos. No entanto, isso se mostra insuficiente para muitas espécies, particularmente aquelas que necessitam de amplos espaços, por terem características comportamentais solitárias (DURANT *et al.*, 2017).

Felídeos ameaçados de extinção por restrição de seu hábitat natural estão mais sujeitos à perda de variabilidade genética devido ao isolamento de populações, isto acarreta aumento de consanguinidade, aumento da incompatibilidade genética, maior suscetibilidade a doenças de cunho genético por prevalência de alelos prejudiciais, falhas reprodutivas e perda da capacidade adaptativa dos animais. Esses fatores em conjunto agravam a situação da possibilidade de extinção (JANECKA *et al.*, 2014; KENNEY *et al.*, 2014; PRAXEDES *et al.*, 2018; WESTBURY *et al.*, 2018).

A conservação de muitas dessas espécies, principalmente de grandes felinos, necessita de uma mudança de paradigma na conservação em direção a uma abordagem que incentive a proteção e promova a coexistência humana, com atividades que integrem a preservação juntamente com o desenvolvimento econômico para as populações locais (DURANT *et al.*, 2017).

No Brasil, A lei de nº 5.197, de 3 de janeiro de 1967 rege, no primeiro artigo, que: “os animais de quaisquer espécies, (...) são propriedades do Estado, sendo proibida a sua utilização, perseguição, destruição, caça ou apanha”. Essa mesma lei também denota, no 5º artigo, que o Poder Público criará Reservas Biológicas Nacionais, Estaduais e Municipais, onde qualquer modificação do

meio ambiente fica terminantemente proibida, com ressalva apenas para atividades científicas autorizadas (ANDRADE, 2011).

Posteriormente, em 1998, foi criada a lei de nº 9.605/98, conhecida como Lei dos Crimes Ambientais que considera ilegal a conduta de quem:

“vende, expõe à venda, exporta ou adquire, guarda, tem em cativeiro ou depósito, utiliza ou transporta ovos, larvas ou espécimes da fauna silvestre, nativa ou em rota migratória, bem como produtos ou objetos dela oriundos, provenientes de criadouros não autorizados ou sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente.”

Essa legislação vigente no Brasil, que visa à preservação de animais silvestres e, por conseguinte de felídeos silvestres, é falha justamente no que se propõe, que é promover a conservação das espécies e coibir o tráfico animal. Já que a fiscalização ineficiente não consegue abolir a caça ilegal e o tráfico desses animais. Entretanto, existem alguns pontos positivos na legislação, como a possibilidade de existência de criadouros de animais silvestres para fins comerciais e industriais, sendo a licença para este fim expedida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (ANDRADE, 2011).

No entanto, a dificuldade em se conseguir as licenças, bem como o tempo médio necessário para a emissão da licença não favorece o estabelecimento de criadouros comerciais. Por isso, mesmo com a existência de órgãos ambientais responsáveis pela fiscalização e aplicação de multas para quem descumpra a lei, a densidade estimada de felídeos silvestres, no Brasil, está bastante aquém dos números originais, correndo severos riscos de extinção (ANDRADE, 2011; PAVIOLO *et al.*, 2016).

A *Panthera onca*, um dos felídeos mais ameaçados, tem uma população estimada de menos de 300 exemplares na mata atlântica, ocupando apenas 2,8% de área existente desse bioma, o que a classifica como criticamente em perigo de extinção (PAVIOLO *et al.*, 2016).

A redução na densidade populacional de pequenos felinos selvagens, como o *Leopardus tigrinus*, *Leopardus colocolo* e *Leopardus geoffroyi* também é observada no Brasil, sendo essas espécies classificadas como vulneráveis. Trigo *et al.* (2008) observou o aumento da hibridização entre essas três espécies de pequenos felídeos selvagens no Brasil devido à redução da densidade

populacional dessas três espécies, com consequente dificuldade de acasalamento.

O aumento da hibridização com consequente diminuição da densidade populacional e legislação vigente ineficiente denotam a necessidade de formação de bancos de germoplasma felídeo para que a variabilidade genética seja mantida e a dificuldade de preservação existente seja superada (SILVA *et al.*, 2012).

No Estado de Alagoas, muitas populações dessas espécies, como: *Leopardus tigrinus*, *Puma yagouaroundi* e *Puma concolor*, encontram-se em vias de extinção apesar da existência de estratégias conservacionistas de órgãos ambientais amparadas por legislação (AL, 2017). Novas alternativas de estratégias conservacionistas, como a utilização de bancos de germoplasma felídeo, servem como alternativa viável e segura para garantir a biodiversidade, variabilidade genética e assegurar um futuro viável dessas espécies, diminuindo qualquer probabilidade de extinção (MOREIRA, 2017).

2.2 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE OÓCITOS

As técnicas para obtenção de oócitos diferem entre si e a depender do método utilizado pode haver diferença na quantidade e na qualidade dos complexos cumulus-oócito (COCs) destinados a formação de bancos de germoplasma. Esse material genético armazenado somente cumpre o seu papel de auxílio na preservação de animais ameaçados de extinção caso haja a possibilidade de utilização na PIV de embriões e consequente formação de um novo espécime (ARAYATHAN; TIPTAVAVATANNA; THARASANIT, 2017; KHALILI *et al.*, 2017).

Um dos fatores mais importantes que podem influenciar o sucesso da PIV é a recuperação eficiente dos COCs. Um grande número de oócitos de boa qualidade são necessários para a formação de bancos de germoplasma, uma vez que apenas aproximadamente 30% dos oócitos recuperados desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (PALMA, 2008).

Para fêmeas de felídeos selvagens, a técnica de aspiração folicular via videolaparoscopia pós estimulação ovariana com gonadotrofinas é a mais indicada. Pois, viabiliza a obtenção de COCs sem necessidade de remoção do

ovário, o que possibilita a continuidade da vida reprodutiva dessa fêmea sem danos reprodutivos (PAZ *et al.*, 2009).

Essa técnica consiste na aplicação de três trocartes no abdômen após incisão. Sendo o primeiro trocar para a passagem da óptica e insuflação do abdômen com ar. O segundo trocar serve para a passagem da pinça ovariana e o último trocar é introduzido para a penetração da bainha acoplada à mangueira e agulha de aspiração. A mangueira deve ser acoplada a um tubo coletor contendo soro fisiológico ou solução tampão fosfato-salina (PBS) a 37 °C, acrescido de heparina. O tubo deve ser conectado a uma bomba de vácuo (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Outras duas técnicas de recuperação oocitária denominadas de *slicing* e isolamento enzimático podem ser utilizadas em *Felis silvestres catus* e também em fêmeas de felídeos selvagens em situações que permitam a retirada dos ovários pelo procedimento de ovariosalpingohisterectomia (OSH) ou por meio da remoção *post mortem* dos ovários (CARREIRO *et al.*, 2017; ZHAN *et al.*, 2018).

O *slicing* consiste no fatiamento transversal e repetitivo do ovário em uma placa de Petri com o auxílio de um bisturi para a liberação dos COCs. Esse procedimento pode ser realizado até após 36 horas a partir dos ovários armazenados *ex-situ* em meio fisiológico (CARREIRO *et al.*, 2017).

O isolamento enzimático constitui-se na utilização de diferentes enzimas específicas para remover o tecido conjuntivo dos folículos. A vantagem do uso do método enzimático dá-se no menor efeito sobre a viabilidade oocitária que essa técnica possui sobre métodos mecânicos em diferentes espécies. Enquanto sua desvantagem é o acréscimo de custos monetários para a aquisição das enzimas, com consequente impacto no custo da recuperação oocitária (ZHAN *et al.*, 2018).

Métodos enzimáticos envolvendo tripsina, colagenase, hialuronidase e liberase sozinhas e/ou associadas foram desenvolvidos com sucesso para isolar os folículos intactos em diferentes espécies, com diferentes graus de pureza. Embora a utilização de enzimas purificadas, como é o caso da liberase, resulte em melhores taxas de recuperação e viabilidade, o isolamento enzimático utilizando enzimas não-purificadas, como a colagenase, também é um método

efetivo, mas pode potencialmente prejudicar a qualidade do folículo (LIERMAN *et al.*, 2015).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para se dispor de uma efetiva ferramenta de preservação de espécies por intermédio de bancos de germoplasma é de fundamental importância o emprego de técnicas eficientes de coleta de oócitos, a qual pode ser feita por fatiamento ovariano conhecido como *slicing*, punção aspirativa e digestão ovariana. Todas estas técnicas têm por objetivo único obter o maior número de oócitos íntegros que poderão ser destinados a diferentes biotécnicas de reprodução assistida, como a PIV de embriões, cujo êxito está diretamente relacionado à quantidade e qualidade dos oócitos recuperados. Desta forma, as biotécnicas surgem então como uma estratégia potencial para preservação de animais em risco ou em vias de extinção pois possibilitam sua multiplicação.

REFERÊNCIAS

AL tem 15 espécies de animais ameaçadas ou em risco de extinção, diz IMA. 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/al-tem-15-especies-de-animais-ameacados-ou-em-risco-de-extincao-diz-ima.ghtml>>. Acesso em: 09 mar. 2020.

ANDRADE, H. B. **A ameaça do tráfico de animais silvestres no Brasil: o caso da arara-azul e do mico-leão-dourado.** 2011. Monografia (Licenciatura) – Universidade de Brasília/ Universidade Estadual de Goiás, Consórcio Setentrional de Educação à Distância, Brasília, Distrito Federal, 2011.

ARAÚJO, E. A. B. *et al.* Aspiração folicular videolaparoscópica comparativa em ovelhas dorper e santa inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n.1, p. 98-104, 2016.

ARAYATHAN, S.; TIPTAVAVATANNA, N.; THARASANIT, T. Effects of vitrification and a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 inhibitor on the meiotic and developmental competence of feline oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 5, p. 511-517, 2017.

CARREIRO, A. N. *et al.* Obtenção de oócitos *post mortem* em *Leopardus tigrinus* Schreber, 1775 – Relato de Caso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n. 41, p.688-690, 2017.

DURANT, S. M. *et al.* The global decline of cheetah *Acinonyx jubatus* and what it means for conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 114, n. 3, p. 528-533, 2017.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 175-86, 2000.

GUTIERREZ, R. **Avaliação da viabilidade e desenvolvimento in vitro de oócitos de gatas domésticas após vitrificação em meio suplementado com vitamina E**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Jaboticabal, São Paulo, 2014.

JANECKA, J. *et al.* Loss of genetic diversity among ocelots in the United States during the 20th century linked to human induced population reductions. **PloS One**, v. 9 n. 2, 2014.

KENNEY, J. *et al.* How much gene flow is needed to avoid inbreeding depression in wild tiger populations?. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, v. 281, n. 1789, 2014.

KHALILI, M. A. *et al.* Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 11, p. 1413-1426, 2017.

LIERMAN, S. *et al.* Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: A comparison of different isolation protocols. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 30, n. 2, p. 181-90, 2015.

MACHADO, L. *et al.* Manutenção da biodiversidade brasileira através de bancos de germoplasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n. 1, p. 62-66, 2016.

MOREIRA, N. Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.116-120, 2017.

NAPOLITANO, C. *et al.* Reduced genetic diversity and increased dispersal in guigna (*Leopardus guigna*) in chilean fragmented landscapes. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 522-536, 2015.

PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. In: **Biotecnología de la reproducción**. 2. ed. Mar del Plata - Argentina, p. 313-380, 2008.

PAVILOLO, A. *et al.* A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37147, 2016.

PAZ, R.C.R *et al.* Análise citogenética de oócitos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) coletados após

estimulação ovariana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n. 4, p.309-316, 2009.

PRAXEDES, E. *et al.* Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoobiology**, v. 37, n. 4, p. 258-263, 2018.

RUEDA-ZOZAVA, P. *et al.* Genetic variability and structure of jaguar (*Panthera onca*) in Mexican zoos. **Genetica**, v. 144, n.1, p. 59-69, 2016.

SILVA, A. R. *et al.* Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n.1, p. 219-234, 2012.

TRIGO, T. C. *et al.* Inter-species hybridization among 46 Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular Ecology**, v.17. p. 4317-4333, 2008.

WARZYCH, E. *et al.* Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction & Development**, v. 74, n. 3, p. 280-289, 2007.

WESTBURY, M. *et al.* Extended and continuous decline in effective population size results in low genomic diversity in the world's rarest hyena species, the brown hyena. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 5, p. 1225-1237, 2018.

ZHAN, C. *et al.* Explorations of the optimal method for isolating oocytes from zebrafish (*Danio rerio*) ovary. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 8, p. 417-426, 2018.

2.2 CAPÍTULO 2

Publicado pela Editora Atena no Livro Eletrônico “A Pesquisa nos Diferentes Campos da Medicina Veterinária 2” em 2020. ISBN: 978-65-5706-653-9. DOI: 10.22533/at.ed.539200712.

PROCESSOS DE VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS E EMBRIÕES: O QUE VOCÊ PRECISA SABER?

(Oocyte and embryo vitrification processes: What you need to know?)

Mariana Mendonça Maia Cavalcante

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Marcio Calixto Matias

Universidade Federal de Alagoas, Laboratório de Reprodução Animal, Viçosa - AL

Agnelo Douglas do Nascimento Junior

Universidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal Assistida, Viçosa – AL

Sandra Simone de Barros Lima

Clínica Veterinária Pet House, Maceió - AL

Simone Firmino dos santos

Clínica Veterinária Pet House, Maceió - AL

Gilsan Aparecida de Oliveira

Centro Universitário Cesmac, Curso de Medicina Veterinária, Maceió – AL

Raíssa Karolliny Salgueiro Cruz

Centro Universitário Cesmac, Curso de Medicina Veterinária, Maceió - AL

Zelma Holanda do Nascimento

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Camila Calado de Vasconcelos

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

Valesca Barreto Luz

Centro Universitário Cesmac, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Maceió - AL

RESUMO: A vitrificação consiste em um método de preservação de amostras biológicas ultrarápido, barato, e fácil de ser realizado que permite o armazenamento por tempo indeterminado dessas amostras para uso futuro. Existem distintos procedimentos de vitrificação usando diferentes formulações de meios adequadas às espécies bem como diversos dispositivos para vitrificação, que são agrupados e classificados em sistema abertos e fechados. Diante dessa variedade, objetivou-se na presente revisão reunir e relatar sobre a técnica de vitrificação em suas variantes de procedimentos. Para tanto foram consultadas publicações dos últimos 20 anos nas bases de dados como Google Acadêmico, SciELO e PubMed e PubVet. Ambas as técnicas de vitrificação tanto aberta como fechada, se bem conduzidas, alcançam resultados semelhantes. Dessa maneira, a escolha de uma técnica ou outra, vai depender da familiaridade do manipulador com a técnica, dos objetivos a serem alcançados com a vitrificação, e relação custo/benefício relacionada a cada espécie.

PALAVRAS-CHAVES: Criopreservação. Germoplasma. Ovário.

ABSTRACT: The vitrification consists of an ultra-fast, inexpensive, and easy-to-be-performed of a biological sample preservation method that allows indefinite storage of these samples for future use. There are different vitrification procedures using different formulations which are suitable for the species as well as various devices for vitrification. Vitrification technique is grouped and classified in open and closed system. In view of this variety, the aim of this review was to gather and report on the vitrification technique and its procedure variants. Publications from the last 20 years were consulted in the databases such as Google Scholar, SciELO and PubMed and PubVet. Both open and closed vitrification techniques, if well conducted, achieve similar results. Thus, the choice of one technique or another will depend on the familiarity of the handler with the technique, the objectives to be achieved with the vitrification, and cost/benefit ratio related to each species.

KEYWORDS: Cryopreservation. Germplasm. Ovary.

1 INTRODUÇÃO

A técnica de vitrificação é a produção de um estado vítreo amorfo por meio da solidificação de uma solução conseguida por uma combinação de uma alta concentração de agentes crioprotetores (ACPs) pelo qual um fluido eleva de maneira extrema a sua viscosidade quando submetido a baixas temperaturas numa taxa de velocidade de resfriamento de 2500 °C/min., estabilizando na temperatura de -196 °C. O estado vítreo permite que o fluido tenha características mecânicas de um sólido, já que parte das cadeias moleculares se encontra desorganizada e há uma certa flexibilidade entre as moléculas (ARAYATHAM; TIPTAVAVATANNA; THARASANIT, 2017; KHALILI *et al.*, 2017; PALMA, 2008).

Com o objetivo de evitar a formação de cristais de gelo no ooplasma e também no meio extracelular, bem como impedir o rompimento da membrana plasmática, por conseguinte, danos celulares irreversíveis, a vitrificação de

oócitos foi desenvolvida e aplicada como uma técnica inovadora no âmbito científico (CARVALHO *et al.*, 2011).

Diante disto, a vitrificação permite uma melhor estocagem de material genético para a formação de bancos de germoplasma (gametas e embriões) e com esta finalidade se caracteriza como a técnica mais viável de criopreservação por propiciar taxa de sobrevivência, implantação e taxa de gestação significativamente mais altas do que a congelação lenta (KHALILI *et al.*, 2017; LEVI-SETTI; PATRIZIO; SCARAVELLI, 2016).

Existem distintos processos de vitrificação usando diferentes formulações de meios adequadas às espécies bem como diversos dispositivos para vitrificação. Mas, basicamente os procedimentos se dividem em: sistemas de vitrificação abertos e fechados (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CARVALHO *et al.*, 2011). Diante da relevância da importância desse processo, objetivou-se resumir e relatar sobre a técnica de vitrificação em suas variantes de procedimentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TIPOS DE VITRIFICAÇÃO

A vitrificação aberta envolve o contato direto entre oócitos ou embriões e o nitrogênio líquido, usando dispositivos que comportam apenas uma pequena quantidade de material a ser vitrificado, com a vantagem de promover uma curva de resfriamento mais rápida, de tal forma que o tempo de contato dos oócitos com os ACPs a temperatura ambiente é abreviado, com isso, diminui-se a citotoxicidade dos mesmos (YOUM *et al.*, 2018; ZHE *et al.*, 2019).

Em contrapartida, a vitrificação fechada envolve o contato indireto entre oócitos ou embriões e o nitrogênio líquido utilizando sistemas de tubulação. Esse tipo de vitrificação tem por vantagem minimizar o risco de transmissão microbológica através de nitrogênio líquido durante os procedimentos de resfriamento, armazenamento e aquecimento. Visto que a maioria dos microrganismos pode sobreviver em temperaturas baixas e crioprotetores ou componentes do meio podem protegê-los de lesões. Por essa razão, muitas estratégias têm sido desenvolvidas para evitar o contato direto das células, tanto

na vitrificação quanto no armazenamento (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CASTELLÓ *et al.*, 2018; GHASEM; NEGAR, 2013; YOUM *et al.*, 2018).

Entretanto, essa proteção extra conferida pelo sistema de vitrificação fechado também resulta em uma diminuição da velocidade de resfriamento que pode reduzir a eficácia do protocolo de vitrificação (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; GHASEM; NEGAR, 2013; YOUM *et al.*, 2018).

2.1.1 Sistemas de vitrificação aberta

2.1.1.1 Vitrificação em palhetas abertas

Consiste na utilização de uma palheta fabricada e adaptada de maneira artesanal, seja com a utilização de uma lâmina de bisturi ou de uma lâmina de barbear. De modo que a extremidade da palheta, onde ficarão os oócitos juntamente com o meio de vitrificação, assume um formato de bisel, destacando que essa extremidade não é selada (Fig. 1). Esse processo foi desenvolvido com o intuito de se obter uma velocidade de criopreservação ainda mais rápida e eficiente, para se evitar a formação de cristais de gelo (AMIDI; KHODABANDEH; MOGAHI, 2018).

Figura 1 – Palheta aberta



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

2.1.1.2 Pipetas de desnudamento “flexipet”

Seu formato e intuito de utilização é bastante similar à vitrificação em palhetas abertas descritas anteriormente, com a única diferença de que as pipetas de desnudamento *flexipet* não são fabricadas de modo artesanal, mas, de modo industrial (Fig. 2) com o intuito de serem empregadas na manipulação de embriões (CARVALHO *et al.*, 2011).

Figura 2 - Flexipet

Fonte: https://www.cookmedical.com/products/wh_fpip3_webds/. Acesso em: 09/10/2020.

2.1.1.3 Vitrificação por cobertura direta

A técnica baseia-se em submeter os criotubos com a tampa aberta, contendo o material a ser vitrificado juntamente com os ACPs escolhidos, em nitrogênio líquido (Fig. 3). Como a tampa não é fechada justamente para permitir o contato do nitrogênio líquido com os oócitos e, dessa forma, possibilitar uma redução brusca de temperatura. Minimiza-se a toxicidade dos ACPs pela aplicação de menor volume dos mesmos (CHEN *et al.*, 2006).

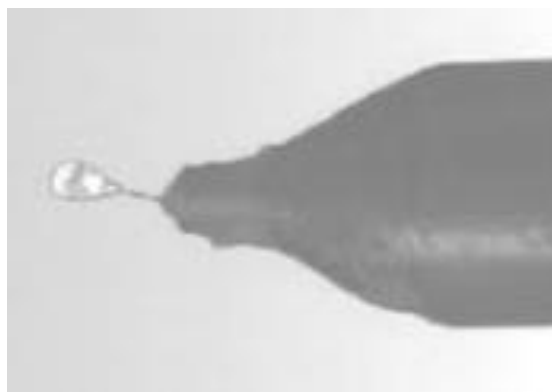
Figura 3 – Vitrificação por cobertura direta

Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2006).

2.1.1.4 “Cryoloops”

Considerados os dispositivos mais adaptáveis para vitrificação disponíveis devido à possibilidade de personalização necessária para cada amostra. Corresponde à utilização de um laço de nylon de 0.5-0.7 milímetros de diâmetro, montado em um tubo de aço inoxidável pequeno introduzido na tampa de um criotubo (Fig. 4) (LIU *et al.*, 2011). O centro do laço deve ser preenchido com um meio de vitrificação e os embriões são adicionados com o auxílio de uma micropipeta, formando uma tensão superficial, que impedirá o extravasamento destes. Destaca-se que o tempo cujo blastocistos são mantidos no laço em contato com o ar deve ser o mais curto possível, porque a solução evapora facilmente (CARVALHO *et al.*, 2011; MUKAIDA, 2002).

Figura 4 – “Cryoloop”



Fonte: Adaptado de Karain *et al.* (2002).

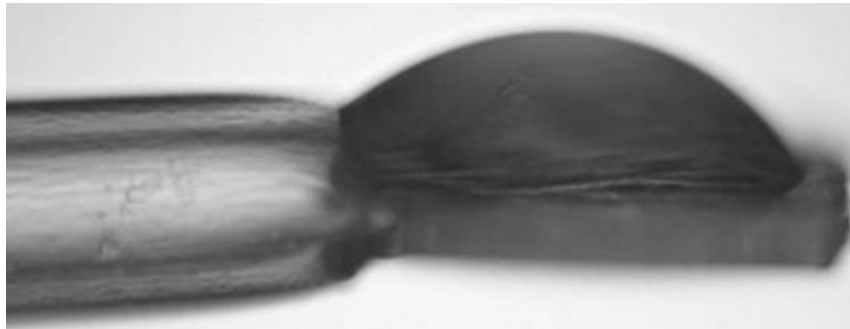
2.1.1.5 Vitrificação em espátula

Para a montagem dessa espátula, a ponta de uma ponteira de carregamento de gel é esmagada com o auxílio de dois fórceps finos, suavemente aquecidos com um bico de Bunsen para gerar uma ponta achatada em formato de pétala de 1 mm² (Fig. 5). A borda distal deve ser selada por calor para evitar infiltração líquida e a outra extremidade da ponteira de carregamento de gel é removida para encurtar o talo da espátula (TSANG e CHOW, 2009).

Esse processo foi desenvolvido para suportar uma maior quantidade de oócitos ao passo que viabiliza uma velocidade de criopreservação rápida e eficiente com volume e tempo de exposição ao ACPs em temperatura ambiente

reduzidos. Mostrou-se uma técnica artesanal útil e simples para a vitrificação de embriões murinos de 2 células e de 8 células produzidos *in vitro* ou *in vivo* (MEIKLE *et al.*, 2018). Como desvantagem as espátulas são unicamente produzidas de modo artesanal levando em torno de um a dois minutos sua produção (TSANG; CHOW, 2009).

Figura 5 – Vitrificação em espátula



Fonte: Tsang e Chow (2009).

2.1.1.6 Cryotop

Constitui-se num dispositivo desenvolvido para permitir a vitrificação de amostras com um volume mínimo 0,1 μ l, proporcionando não apenas melhores taxas de refrigeração e aquecimento (-23.000 $^{\circ}$ C/min. e 42.000 $^{\circ}$ C/min., respectivamente), mas, também menor toxicidade dos ACPs, conseqüentemente, melhores taxas de sobrevivência. O sistema possui duas vertentes diferentes: aberta e fechada. Sendo a aberta, composta por uma palheta de plástico resistente a criotemperatura associada a uma haste plástica utilizada para a manipulação, que evita o contato direto da mão do manipulador com a palheta (Fig. 6) (KUWAYAMA *et al.*, 2005).

Figura 6 – “Cryotop” de sistema aberto



Fonte: Adaptado de Antinori (2007).

2.2 SISTEMAS DE VITRIFICAÇÃO FECHADOS

2.2.1 Vitrificação convencional

Consiste no enchimento de palhetas francesas e/ou criotubos com os ACPs juntamente do material a ser vitrificado (Fig. 7). Essas devem, então, ser seladas antes de serem submetidas ao nitrogênio líquido (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; ISHIJIMA *et al.*, 2006).

Adaptações no método foram desenvolvidas com o intuito de diminuir a quantidade de ACPs e, por conseguinte, sua toxicidade à célula, como o método da hemi-palheta, que consiste em cortar pela metade uma palheta francesa de 0,25 ml em formato de bisel e pipetar uma gota contendo o material a ser vitrificado com o ACP para então submergir em nitrogênio líquido. Alguns autores relatam que, antes de submergir a palheta em nitrogênio líquido, é necessário ainda inseri-la em uma palheta de 0,5 ml (CARVALHO *et al.*, 2011).

Figura 7 – Criotubo sistema fechado



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

2.2.2 Vitrificação em palhetas fechadas

Por ser um método fechado, carrega as vantagens e desvantagens desse tipo de vitrificação, consistindo na utilização de uma palheta fabricada de modo artesanal, a partir de uma palheta francesa, com o auxílio do calor para que fique alongada e a máxima eficiência quanto a velocidade de criopreservação seja alcançada (GHASEM; NEGAR, 2013). Após a deposição

dos oócitos juntamente com a solução crioprotetora, faz-se a retirada do excesso de meio na palheta artesanal por capilaridade, e então fecha-se sua extremidade para que o nitrogênio líquido e seus vapores não penetrem no interior da mesma (Fig. 8) (CARVALHO *et al.*, 2011).

Figura 8 – Palheta fechada



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

2.2.3 “Cryotop”

O *Cryotop* em sistema fechado consiste em um plástico firme formando a palheta e a haste de manipulação em que é adicionada uma fina película transparente, de maneira a revestir toda a estrutura da palheta-haste, impedindo o contato com o nitrogênio líquido, diminuindo as chances de contaminação do material vitrificado (Fig. 9) (AMIDI; KHODABANDEH; MOGAHI, 2018).

Castelló *et al.* (2018) ao comparar o *Cryotop* sistema fechado com o *Cryotop* sistema aberto conseguiram dados análogos no que diz respeito à taxa de sobrevivência do embrião (inclusive, utilizando-se embriões com ativação partenogênica), integridade do eixo cromossômico e potencial de desenvolvimento de embriões.

Figura 9 – “Cryotop” em sistema fechado



Fonte: Adaptado de Antinori (2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da técnica de vitrificação de oócitos ser mais dependente da habilidade do manipulador do que no método de congelação lenta, esta se mostra mais eficaz em reduzir os danos celulares ocasionados por baixas temperaturas.

Ambas as técnicas de vitrificação tanto aberta como fechada, se bem conduzidas, alcançam resultados semelhantes no que diz respeito às taxas para integridade da membrana plasmática, competência oocitária e danos oocitários em geral, ressaltando algumas diferenças pontuais.

Dessa forma, a preferência de utilização de uma técnica ou outra, vai depender da familiaridade do manipulador com a técnica, dos objetivos a serem alcançados com a vitrificação, e relação custo/benefício relacionada a cada espécie e localidade a ser aplicada a técnica.

REFERÊNCIAS

AMIDI, F.; KHODABANDEH, Z.; MOGAHI, M. H. N. Comparison of the effects of vitrification gene expression of mature mouse oocytes using cryotop and open pulled straw. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 12, n. 1, p. 61-67, 2018.

ANTINORI, M. *et al.* Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 1, p. 72-79, 2007.

ARAYATHAN, S.; TIPTAVAVATANNA, N.; THARASANIT, T. Effects of vitrification and a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 inhibitor on the meiotic and developmental competence of feline oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 5, p. 511-517, 2017.

ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 440-449, 2016.

CARVALHO, A. A. *et al.* Vitriificação: Uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CASTELLÓ, D. *et al.* Pre-clinical validation of a closed surface system (Cryotop SC) for the vitrification of oocytes and embryos in the mouse model. **Cryobiology**, v. 81, p. 107-116, 2018.

CHEN, S. *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v. 21, n. 11, p. 2794-2800, 2006.

GHASEM, S.; NEGAR, K. Effect of vitrification on number of inner cell mass in mouse blastocysts in conventional straw, closed pulled straw, open pulled straw and cryoloop carriers. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 4, 2013.

ISHIJIMA, T. *et al.* Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 293-299, 2006.

KHALILI, M. A. *et al.* Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 11, p. 1413-1426, 2017.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 3, p. 300-308, 2005.

LEVI-SETTI, P.; PATRIZIO, P.; SCARAVELLI, G. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 23, n. 6, p.445-450, 2016.

LIU, L. *et al.* Successful cryoloop vitrification and subsequent in vitro maturation of mouse preantral follicles. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, n. 3, p. 149-153, 2011.

MEIKLE, M. N. *et al.* Minimum volume spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. **Cryobiology**, v. 84, p. 77-81, 2018.

MUKAIDA, T. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 6, n. 2, p. 221-225, 2002.

PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. In: **Biología de la reproducción**. 2. ed. Mar del Plata - Argentina, p. 313-380, 2008.

TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. **Biotechniques**, vol. 46, n. 7, p. 550-552, 2009.

YOUM, H. S. *et al.* Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: A meta-analysis. **Cryobiology**, v. 77, p. 64-70, 2018.

ZHE, J. *et al.* Causes of oocyte vitrification and its value in assisted reproductive technology. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 39, n. 7, p. 766-771, 2019.

2.3 SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS

Várias combinações de agentes crioprotetores penetrantes e não-penetrantes podem ser utilizadas nas soluções crioprotetoras formando a ampla gama de protocolos de vitrificação existentes, com o aumento da viscosidade da solução e redução do ponto de congelação. Os agentes crioprotetores (ACPs) são empregados a fim reduzir o dano celular, impedindo a formação do gelo. São classificados em agentes crioprotetores intracelulares (também chamados de penetrantes) ou extracelulares (também conhecidos por não penetrantes), dependendo de sua habilidade de atravessar a membrana plasmática (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CASTRO *et al.*, 2011; MUNCK; VAJTA, 2017).

A eficiência destes ACPs pode variar em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, do tipo de combinação de ACPs e concentração, além do tempo de exposição utilizado antes do processo de criopreservação. As diferenças estruturais entre as espécies animais é também um fator que pode influenciar na eficácia de um ACP (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CASTRO *et al.*, 2011; MUNCK; VAJTA, 2017).

Dentre os principais ACPs penetrantes, que podem ser utilizados em felinos, encontram-se: dimetilsulfóxido (DMSO); glicerol; 1,2 propanodiol (PROH) e o etilenoglicol. Os principais ACPs não-penetrantes são carboidratos como a glicose, frutose, sacarose, trealose e Ficoll; além de proteínas como as presentes no SFB e também polímeros como o álcool polivinílico (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CASTRO *et al.*, 2011; FAUSTINO *et al.*, 2011; MUNCK; VAJTA, 2017).

A necessidade de utilização tanto de ACPs intracelulares quanto de extracelulares dá-se por conta das diferentes funções que esses ACPs desempenham durante o protocolo de vitrificação, devido à permeabilidade da membrana plasmática em relação aos mesmos (CASTRO *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2020).

Enquanto os ACPs intracelulares atuam substituindo parcialmente a água no interior da célula com formação de pontes de hidrogênio entre o ACP intracelular e moléculas de água no interior da célula, os ACPs extracelulares têm por função o auxílio da entrada dos ACPs intracelulares na célula, redução

da concentração e, por conseguinte, diminuição da toxicidade dos ACPs intracelulares (CASTRO *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2020).

Fato explicado por sua utilização acarretar na desidratação por osmose com posterior reidratação das células após o aquecimento/descongelamento e estabilização da membrana plasmática. Outro fator muito relevante ao uso de ACPs extracelulares é que, via de regra, esses aditivos apresentam toxicidade considerada nula, mesmo quando adicionados em grande quantidade aos meios de criopreservação (CASTRO *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2020).

2.3.1 Dimetilsulfóxido

O DMSO puro é um líquido transparente, levemente amarelo claro, que congela a uma temperatura de 18,5 °C. É formado por dois átomos de carbono, seis átomos de hidrogênio e um de enxofre e oxigênio de acordo com a estrutura apresentada na figura 1 (BRAYTON, 1985).

A sua ação crioprotetora é atribuída primeiramente à afinidade dos átomos de hidrogênio presentes no DMSO a moléculas de água e que formam ligações três vezes mais fortes que as pontes de hidrogênio presentes nas moléculas de água, impedindo a formação de cristais de gelo. Secundariamente, o DMSO pode eliminar os radicais liberados durante o processo de descongelamento e aquecimento, cujo efeito danifica os oócitos durante esse procedimento (BRAYTON, 1985; CASTRO *et al.*, 2011).

Por isso, DMSO tem sido usado como um excelente agente crioprotetor, visto que ele consegue penetrar nas células e organelas celulares, permitindo que as células e até mesmo blastocistos possam retomar o seu metabolismo normalmente após o processo de vitrificação/aquecimento. Em algumas situações, o DMSO é considerado superior ao glicerol para a criopreservação (BRAYTON, 1985; CASTRO *et al.*, 2011; PALMA, 2008).

2.3.2 Etilenoglicol

É caracterizado por ser um álcool com duas hidroxilas com a fórmula molecular $C_2H_4(OH)_2$, obtido a partir da reação do óxido de etileno com a água.

É um composto químico largamente utilizado como agente crioprotetor, pois, esse composto estabelece fortes pontes de hidrogênio com a água e impede a formação de cristais de gelo (ABIDALLA; ROVERSI, 2018).

O etilenoglicol é frequentemente proposto como o principal crioprotetor em diferentes meios porque exibe baixa citotoxicidade quando não metabolizado e alta permeabilidade. Por isso, a grande utilização do etilenoglicol na criopreservação de oócitos é justificada (ABIDALLA; ROVERSI, 2018; CASTRO *et al.*, 2011).

2.3.3 Sacarose

Constitui-se por um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose associada a uma molécula de frutose. Cumpre a função de estabilizar a bicamada de fosfolipídios dos oócitos a serem criopreservados, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio e a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água. Apesar de ser um ACP extracelular importante para estabilização da membrana plasmática, deve-se ter cautela com a sua concentração, pois, é capaz de reagir com álcoois e polióis (KUSUDA; TERANISHI; KOIDE, 2002).

3.3.4 Soro Fetal Bovino

O soro fetal bovino (SFB) é uma mistura complexa de diferentes fatores e contém um grande número de componentes, como: fatores de crescimento; proteínas; vitaminas e hormônios. Estes componentes são essenciais para conferir uma maior viabilidade oocitária após a vitrificação, uma vez que os componentes não-proteicos atuam auxiliando a manutenção celular, enquanto que a parte proteica liga-se às cabeças de fosfolipídeos da membrana celular (FAUSTINO *et al.*, 2011; VALK *et al.*, 2010).

Essa ligação entre proteínas do soro fetal bovino e fosfolipídeos é responsável pela redução do choque osmótico, mantendo a integridade da membrana plasmática e controlando a entrada de água na célula (FAUSTINO *et al.*, 2011).

De acordo com Zhou *et al.* (2016), melhores resultados de fertilização foram encontrados em várias espécies quando o meio de vitrificação continha o SFB. Isso se dá pela presença de fetuína, que evita o endurecimento precoce da zona pelúcida, além do fato de que o crioprotetor residual é completamente extrudado pela presença de SFB no espaço perivitelino, aumentando as taxas de fertilização (ZHOU *et al.*, 2016).

No entanto, o uso de SFB é controverso por uma série de razões. Para a coleta do soro, há sofrimento desnecessário para o feto, ainda vivo, que acabou de ser retirado do útero no momento do abate de sua mãe. Além do mais, existem variações na composição do soro (dificultando o controle de qualidade), o que resulta em variações de resultados de vitrificação. Além disso, devido à probabilidade de contaminação, o uso de derivados animais é desencorajado. De acordo com VALK *et al.* (2010), cerca de 20-50% de SFB produzido no mundo é contaminado com vírus.

2.3.4 Álcool polivinílico

O álcool polivinílico é um polímero sintético, solúvel em água, com aplicações variadas. Ele pode ser aplicado em indústrias têxteis, bem como em cosméticos, dispositivos biomédicos e em soluções de cultivo celular e de criopreservação (PATHAN *et al.*, 2015).

Por se tratar de um polímero, em soluções de vitrificação, é utilizado em substituição ao SFB e a proteínas como a Albumina Sérica Bovina (BSA) para conferir estabilidade à membrana plasmática de oócitos e embriões em processo de vitrificação e aquecimento, uma vez que o SFB e BSA podem ser uma fonte de risco para a transmissão de patógenos (ASADA *et al.*, 2002).

Além do mais, a adição de álcool polivinílico em substituição a fontes proteicas em meios de vitrificação diminui de forma considerável o custo de aquisição do meio. Também foi relatado que a adição de álcool polivinílico em meios de vitrificação para bovinos, ovinos e equinos reduz a necessidade de maiores concentrações de crioprotetores, diminuindo o efeito tóxico dos mesmos aos oócitos, e evita a adesão a superfícies durante o período cultural. Dessa maneira, o álcool polivinílico é um constituinte importante em soluções de

vitrificação sem fontes proteicas (ASADA *et al.*, 2002; CURCIO *et al.*, 2014; NAITANA *et al.*, 1997).

2.4 IMPORTÂNCIA DE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO PARA A ANÁLISE DA VIABILIDADE OOCITÁRIA

A utilização de diferentes técnicas que permitam o monitoramento da qualidade e da viabilidade oocitária antes e após a vitrificação é importante para o aprimoramento da técnica. O aperfeiçoamento da técnica influencia diretamente na aquisição de competência oocitária para o desenvolvimento do embrião *in vitro* (HOSHINO, 2018).

Visto que o desenvolvimento embrionário precoce ocorre de forma independente da ativação do genoma embrionário, sendo totalmente dependente do legado de proteínas, substratos energéticos e organelas citoplasmáticas deixado pelo oócito; esse legado altamente organizado, muitas vezes incorre em sérios danos após a vitrificação (HOSSEINI; NARS-ESFAHANI, 2016).

Alguns desses danos e irregularidades morfológicas são facilmente avaliados sob microscopia ótica e eletrônica; e podem comprometer a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, a seleção de oócitos baseada em parâmetros morfológicos e ultraestruturais pode ser satisfatoriamente útil para a seleção de oócitos competentes (HOSHINO, 2018).

A seleção de oócitos baseada em parâmetros morfológicos e ultraestruturais deve ser realizada utilizando-se, no mínimo, duas técnicas em conjunto a fim de se obter uma maior precisão sobre a qualidade oocitária. Pois, quanto mais parâmetros e técnicas forem utilizados em conjunto para avaliar os oócitos após a vitrificação, mais precisa será a interpretação da qualidade e da viabilidade oocitária (MATOS *et al.*, 2007).

A maioria das técnicas para a avaliação da viabilidade de oócitos emprega a utilização de corantes (tanto vitais quanto fluorescentes). Nesse seguimento, existem vários requisitos para uma molécula ser considerada adequada para funcionar como corante (HANANI, 2011).

Dentre as características verificadas nas moléculas candidatas a corantes, a solubilidade na água é uma das mais importantes. Pois, permite a dissolução da molécula e na propagação dentro da célula e evita vazamentos da célula injetada (HANANI, 2011).

Ademais uma molécula considerada apropriada para ser utilizada como corante também deve possuir a propriedade da fixabilidade. Isto é a habilidade do corante em permanecer limitado aos componentes celulares e não ser desperdiçado durante o processamento do tecido (HANANI, 2011).

Outra característica desejável é a não toxicidade, cuja finalidade é evitar danos celulares. Ao mesmo tempo que a detectabilidade é uma das propriedades mais significativas do corante e se refere à quantidade de corante que deve ser injetada na célula para permitir a sua visualização (HANANI, 2011).

Assim, um bom corante não fluorescente deve ter alta absorção, enquanto um corante fluorescente adequado deve ter um bom rendimento quântico, ou seja, alta absorção e alta eficiência de emissão (HANANI, 2011).

Por fim, uma grande vantagem na injeção de corantes fluorescentes sobre os não fluorescentes é a capacidade de observar a célula injetada em tempo real, usando ótica epifluorescente. Isso permite a identificação direta das células injetadas, o que é crucial quando várias células adjacentes também fazem parte da amostra, ou quando ocorre o acoplamento de corantes.

2.5 EMPREGO DO AZUL DE TRIPAN PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE OOCITARIA PÓS VITRIFICAÇÃO

A maioria das técnicas para a avaliação da viabilidade de oócitos emprega a utilização de corantes (tanto vitais quanto fluorescentes). O Azul de Tripán, originalmente, é um corante utilizado como um agente quimioterapêutico contra infecções causadas por protozoários do gênero *Trypanosoma* na África do século 19. Atualmente, o corante é utilizado para testes de exclusão de corante, que consistem em aplicá-lo em células vivas, como oócitos, para determinar o número de células viáveis presentes em uma suspensão celular (JOHN *et al*, 2016).

O princípio do teste de exclusão fundamenta-se no fato de que as células vivas possuem a membrana plasmática intacta e por isso, não terão o

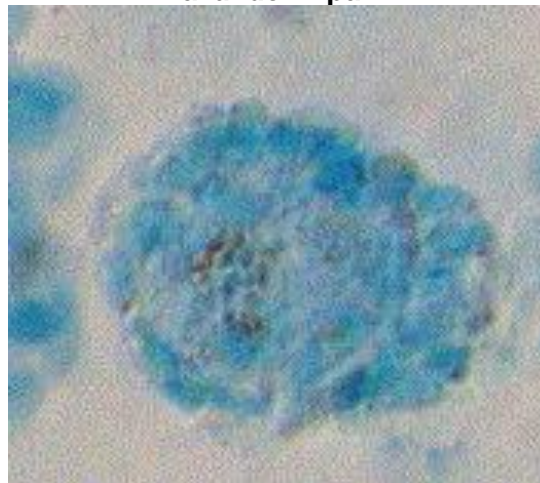
citoplasma corado com o corante Azul de Tripán. Neste teste, o corante é adicionado em alguma suspensão celular e, em seguida, a placa contendo as células é visualmente examinada para determinar quais possuem o citoplasma azul (não-viáveis) (Fig. 2) e quais permanecerão com o citoplasma claro (viáveis) (Fig. 1) (STROBER, 2015).

Figura 1 - Oócito com a membrana plasmática íntegra após a aplicação do corante azul de Tripán



Fonte: Adaptado de Fauque *et al.* (2007).

Figura 2 - Oócito com membrana plasmática rompida após aplicação do corante azul de Tripán



Fonte: Adaptado de Fauque *et al.* (2007).

Em oócitos, o teste utilizando a coloração é bastante utilizado para verificar a viabilidade dos mesmos após procedimentos com potenciais riscos de danificação, como é o caso da vitrificação, pois é uma alternativa rápida e segura

(MATOS *et al.*, 2007). Com respeito à precisão do teste de exclusão, Amorim *et al.* (2003) concluíram que o teste possui resultados similares à histologia clássica para avaliar a viabilidade celular, sendo mais prático.

2.6 REVISÃO PATENTÁRIA

Para a espécie felina, há escassez de registro a respeito de meios de vitrificação, bem como de dispositivos voltados para essa espécie. Em revisão de literatura prévia, foi constatado que os meios de vitrificação para essa espécie são constituídos basicamente de meios comerciais (como o TCM-199®) acrescidos de crioprotetores como o etilenoglicol, DMSO e SFB para conferir estabilidade à membrana plasmática, além de algum dissacarídeo com algumas diferenças pontuais de autor para autor (APPARICIO; RUGGERI; LUVONI, 2012; COLOMBO *et al.*, 2019; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012).

Contudo, a utilização de SFB é algo controverso por uma série de razões. Sendo a probabilidade de contaminação do SFB uma das razões mais importantes para a sua substituição em meios de criopreservação. Já que, de acordo com Valk *et al.* (2018), aproximadamente 20-50% do SFB produzido no mundo é contaminado com vírus.

Nesse sentido, a utilização de álcool polivinílico em meios de criopreservação é uma alternativa de substituição ao SFB por conferir estabilidade à membrana plasmática, sendo já descrita com sucesso em protocolos para a espécie bovina, ovina e equina (ASADA *et al.*, 2002; CURCIO *et al.*, 2014; NAITANA *et al.*, 1997). Apesar de haver relato de sua utilização nessas diferentes espécies supracitadas, não há relatos em literatura a respeito de sua utilização na espécie felina.

No tocante ao instrumento responsável por conservar o meio de vitrificação juntamente com os oócitos vitrificados no botijão de nitrogênio, existe um denso relato em literatura em diferentes espécies. Em felinos, há relatos da utilização do Cryotop® (FERNANDEZ-GONZALEZ; JEWGENOW, 2017; GALIGUIS *et al.*, 2014; HERRICK; WANG; MACHATY, 2017; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012; OCHOTA; WOJTASIK; NIZANSKI, 2017), criotubos (LIMA *et al.*, 2018; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012), *cryoloop* (SOWINSKA *et al.*, 2017), pipeta de desnudamento *flexipet* (THARASANIT *et al.*, 2011), palheta aberta

(COCCHIA *et al.*, 2010) e hemi-palhetas de 0,25 cc acrescidas de bolhas de ar e conteúdo de vitrificação de 15 µl a 20 µl e seladas com calor (APPARICIO; RUGGERI; LUVONI, 2012; THURATUM *et al.*, 2018).

Como apresentado acima, apesar da existência de relato em literatura de dispositivos para a vitrificação de oócitos felinos, não há relatos a respeito da utilização da técnica adaptada de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc sem a aspiração de bolhas de ar, com deposição de mínimo conteúdo vitrificado, volume depositado com o auxílio de uma pipeta variando entre 2 µl a 3 µl no máximo e sem a utilização de temperatura para o selamento da hemi-palheta.

Esse tipo de técnica adaptada de vitrificação com o auxílio de uma hemi-palheta francesa é de extrema importância para a preservação da viabilidade oocitária após a criopreservação. visto que quanto menor a concentração de agente crioprotetor na palheta, menor a citotoxicidade ao oócito e maior a sua viabilidade pós-vitrificação (ARGYLE; HARPER; DAVIES, 2016; CASTRO *et al.*, 2011; FAUSTINO *et al.*, 2011; MUNCK; VAJTA, 2017).

Uma investigação científica foi realizada para o delineamento da atual situação patentária acerca do desenvolvimento do processo de vitrificação de oócitos felinos na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), e *World Intellectual Property Organization* (WIPO-PATENTSCOPE), utilizando como descritores as seguintes palavras: vitrificação de oócitos, criopreservação de oócitos, dispositivo de vitrificação, dispositivo de criopreservação, palhetas de criopreservação, processo de vitrificação e processo de criopreservação.

Empregou-se os descritores descritos acima na base WIPO-PATENTSCOPE, com a marcação da opção “organismos – PCT” e com a utilização do campo “página de cobertura” para busca de patentes com pedido de depósito via PCT para os descritores. No INPI, a pesquisa foi realizada com o uso do campo “buscar patente” e com o emprego dos descritores citados acima no campo “resumo”.

Aplicando os descritores citados acima foi encontrado um total de 66 patentes depositadas no INPI e 428 patentes depositadas no WIPO. Porém, todas essas não foram específicas para o processo de vitrificação de oócitos felinos e/ou incluíam meio contendo álcool polivinílico. A distribuição das patentes por descritores e base de dados está descrita no quadro 1 e figura 3 e

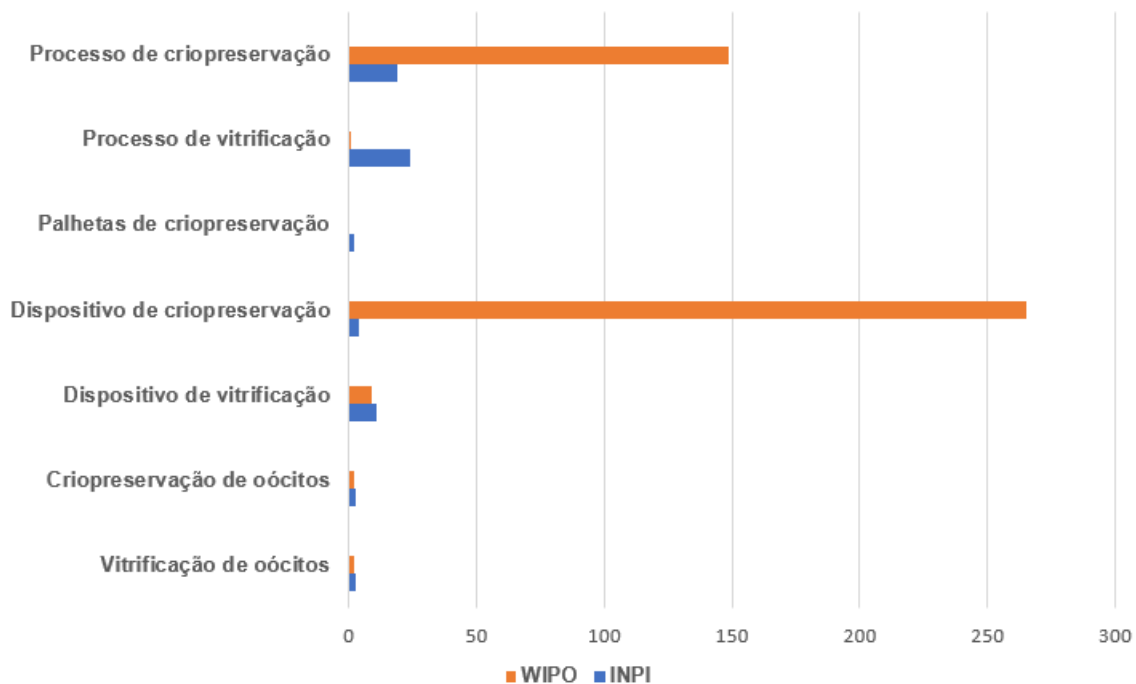
os documentos relevantes no âmbito patentário foram descritos abaixo, sendo seu resumo descrito no quadro 2.

Quadro 1 – Distribuição das patentes

Descritores	INPI	WIPO
Vitrificação de oócitos	3	2
Criopreservação de oócitos	3	2
Dispositivo de vitrificação	11	9
Dispositivo de criopreservação	4	265
Palhetas de criopreservação	2	-
Processo de vitrificação	24	1
Processo de criopreservação	19	149
<i>Total</i>	<i>66</i>	<i>428</i>

Fonte: Elaborado pela própria autora (2020).

Figura 3 – Gráfico de distribuição das patentes de acordo com os descritores



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Quadro 2 – Caracterização de documentos relevantes no âmbito patentário

Número do documento	Plataforma	Descrição da Patente
PI1106685-7	WIPO	Estrutura metálica para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos em palhetas com adição de copolímero.
PI1101451-2	WIPO	Preservação de tecido ovariano caprino com adição de antioxidantes.
BR1120130039299	INPI	Método de vitrificação com produção de uma gotícula de vitrificação para embriões.
BR1020170224520	INPI	Dispositivo para vitrificação de tecido ovariano.
BR1120170129450	INPI	Dispositivo de criopreservação em sistema fechado com câmara oca.
BR2020130197390	INPI	Dispositivo metálico capsular para criopreservação de tecido ovariano.
BR1020160032920A2	INPI	Tecnologias para a criopreservação de embriões de ungulados para a implantação em receptoras.
PI0605800-0	WIPO	Haste de plástico de 0,5 mm de diâmetro com utilização em vitrificação de óvulos, envolta em um tubo de plástico.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2020).

O documento PI1106685-7 refere-se a uma estrutura metálica criada para vitrificação, servindo como suporte para manipulação, armazenamento e estocagem dos oócitos em palhetas; e a adição de copolímero bloqueador de gelo às soluções crioprotetoras de vitrificação. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 µl a 3 µl do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

O documento PI1101451-2 refere-se à preservação de todo o tecido ovariano caprino e não apenas de oócitos, utilizando um meio com a adição de antioxidantes. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de

uma pipeta) de 2 µl a 3 µl do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

O documento BR1120130039299 se refere a um método de vitrificação superficial de embriões em nitrogênio líquido e produção de uma gotícula de vitrificação. A gotícula de vitrificação é produzida a partir de um instrumento com um canal e vertida diretamente para dentro do nitrogênio em fase líquida produzindo uma gotícula vitrificada, que posteriormente é armazenada em criotubos.

A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 µl a 3 µl do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

O documento BR1020170224520 se refere a um dispositivo para vitrificação de tecido ovariano em superfície sólida constituído de três partes: base, *insert* e tampa; apresentando-se como um sistema fechado sendo este dispositivo aplicado apenas na vitrificação de tecido ovariano. A presente invenção difere desse documento por compreender o processo de adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 µl a 3 µl do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

O documento BR1120170129450 compreende um dispositivo de criopreservação de sistema fechado com uma tampa alongada para fechar de forma vedável um espécime biológico com uma câmara oca alongada. A presente invenção difere desse documento por ser um dispositivo de vitrificação de sistema aberto, já que os oócitos a serem vitrificados são depositados em hemi-palhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da

ponta em bisel (o que configuraria um sistema de vitrificação fechado). Além do mais, há a adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação.

O documento BR2020130197390 abrange um dispositivo metálico para vitrificação e criopreservação de tecidos no formato de uma cápsula fabricada em metal (aço inox 304 ou aço cirúrgico), mais uma vez caracterizando um dispositivo de sistema fechado. A presente invenção difere desse documento por ser um dispositivo de vitrificação de sistema aberto, já que os oócitos a serem vitrificados são depositados em hemi-palhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel (o que configuraria um sistema de vitrificação fechado). Além do mais, há a adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação.

O documento BR1020160032920A2 descreve tecnologias para a criopreservação de embriões de ungulados para a implantação em fêmeas receptoras. A presente invenção difere desse documento por se tratar de um processo de vitrificação de oócitos exclusivamente felino com adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação, bem como a subsequente etapa de vitrificação de oócitos felinos pelo depósito (através de uma pipeta) de 2 μ l a 3 μ l do conteúdo a ser vitrificado em uma hemi-palheta de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas e sem o fechamento da ponta em bisel ou a adição de bolhas de ar.

O documento PI0605800-0 se configura por estar relacionado a uma haste de plástico de 0,5 mm de diâmetro com utilização em vitrificação de óvulos de humanos e animais, que depois necessita ser inserida em um tubo plástico. A presente invenção difere desse documento por ter sido desenvolvido para vitrificação de oócitos felinos com hemi-palhetas de 0,25 cc com a ponta em formato de bisel, sem ser utilizado nenhum tipo de suporte auxiliar para as hemi-palhetas (não é colocado em nenhum criotubo) e sem o fechamento da ponta em bisel. Além do mais, há a adição de álcool polivinílico ao meio de vitrificação.

Com a prospecção científica no âmbito patentário, pôde-se constatar que não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os processos da presente invenção, de forma que o processo de vitrificação aqui exposto é inédito.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Após submissão do presente projeto ao comitê de ética, foi deferido que: “o protocolo não necessita de apreciação ética” conforme o protocolo de número 06A/2018.

3.2 MODELO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental de caráter quantitativo e qualitativo, resultando no desenvolvimento de um processo de vitrificação de oócitos felinos utilizando-se hemi-palhetas francesas (Fig. 4) em combinação com meio simples contendo álcool polivinílico em substituição ao SFB, com o intuito de servir como modelo experimental para auxiliar a formação de bancos de germoplasma de felídeos selvagens ameaçados de extinção.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de *chi-quadrado de Pearson* no pacote SPSS. Diferenças consideradas significativas entre duas variáveis analisadas para o presente estudo foram aquelas com o $p < 0,05$. Também foi calculado o *Odds-Ratio*, com a seguinte fórmula: $a \times d / b \times c$.

Figura 4 – Deposição de oócitos felinos juntamente com meio de vitrificação simples em hemi-palheta

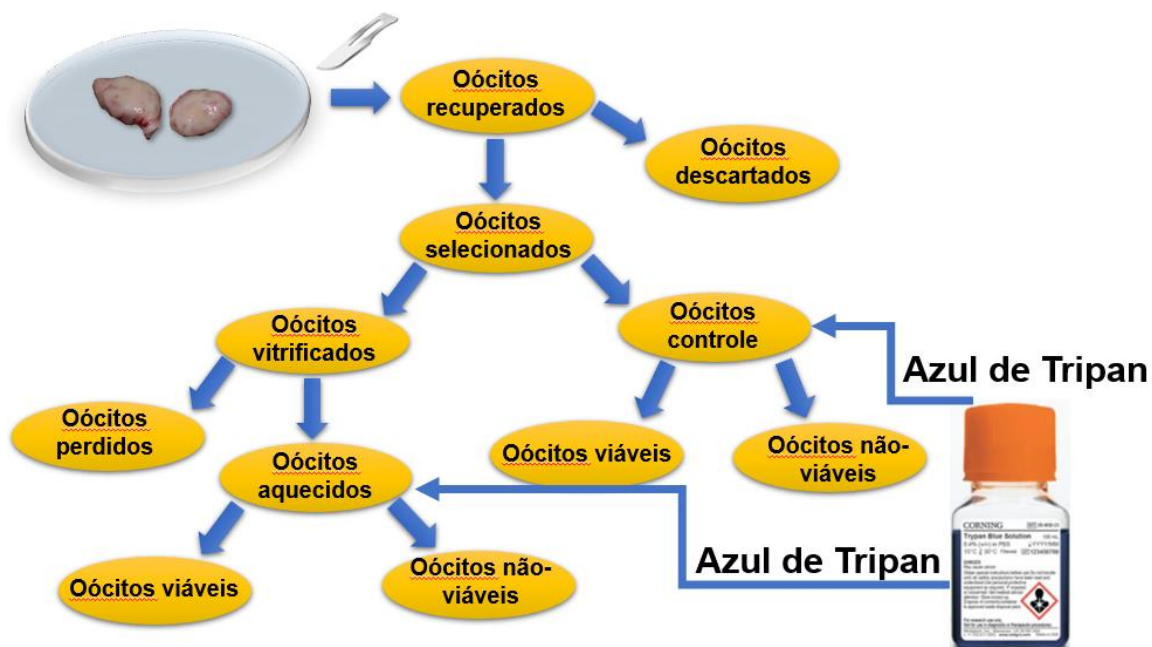


Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

3.3 FASES DO EXPERIMENTO

As fases do desenvolvimento do experimento (Fig. 5) para o aperfeiçoamento do processo de vitrificação utilizando-se o meio de vitrificação desenvolvido no presente estudo foram: obtenção dos ovários e recuperação dos oócitos, seleção dos oócitos para vitrificação e formação de grupo controle, vitrificação, aquecimento dos oócitos vitrificados, adição do azul de tripan para análise da viabilidade oocitária dos oócitos vitrificados/aquecidos e do grupo controle.

Figura 5 - Fluxograma das fases do experimento



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

3.4 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

Os ovários foram obtidos assepticamente durante o procedimento de OSH de gatas que se candidataram ao procedimento na clínica veterinária *Pet's House*. Os ovários foram transferidos para tubos falcon de 50 ml contendo soro fisiológico a temperatura ambiente e encaminhados ao laboratório de Reprodução Animal da unidade de Marechal Deodoro do Centro Universitário CESMAC, em até 1 hora (Fig. 6).

Figura 6 - Tubo tipo Falcon contendo ovários felinos e soro fisiológico



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Em seguida, foram colocados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo soro fisiológico (temperatura ambiente), onde foram fatiados com lâmina de bisturi ao longo de seu comprimento e largura (*slicing*), para a liberação dos COCs e posteriormente foram lavados com o auxílio de uma seringa com soro fisiológico e filtro coletor para serem realocados em placas de Petri (30 x 15 mm) contendo soro fisiológico para o auxílio da recuperação dos COCs sob estereomicroscópio (Fig. 7).

Figura 7 - Ovários felinos na placa de Petri antes do “slicing”

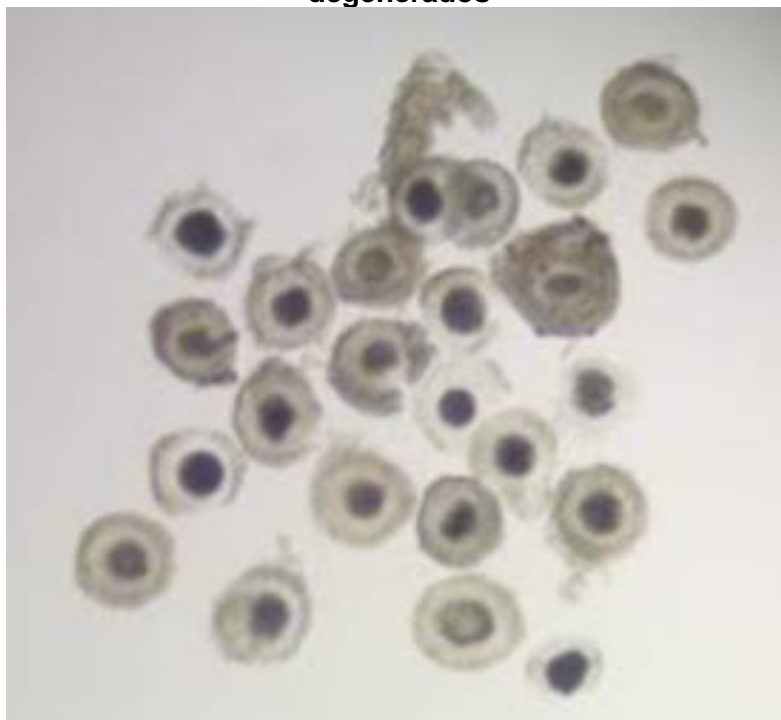


Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Todos os COCs recuperados após o *slicing* foram agrupados de acordo com a classificação recebida (grau I, grau II, grau III e degenerados) e, somente aqueles que obtiveram uma classificação grau I, grau II ou grau III foram vitrificados.

Os oócitos classificados como grau I foram aqueles circundados com três ou mais camadas de células do cumulus, com citoplasma escuro ou vesicular. Já os classificados como grau II e III foram aqueles que possuíam poucas células do cumulus, mas citoplasma escuro ou vesicular. Enquanto os degenerados eram desnudos e possuíam alterações citoplasmáticas (Fig. 8).

Figura 8 – “Pool” de oócitos felinos classificados como grau I, II, III e degenerados



Fonte: Elaborado pela própria autora (2020).

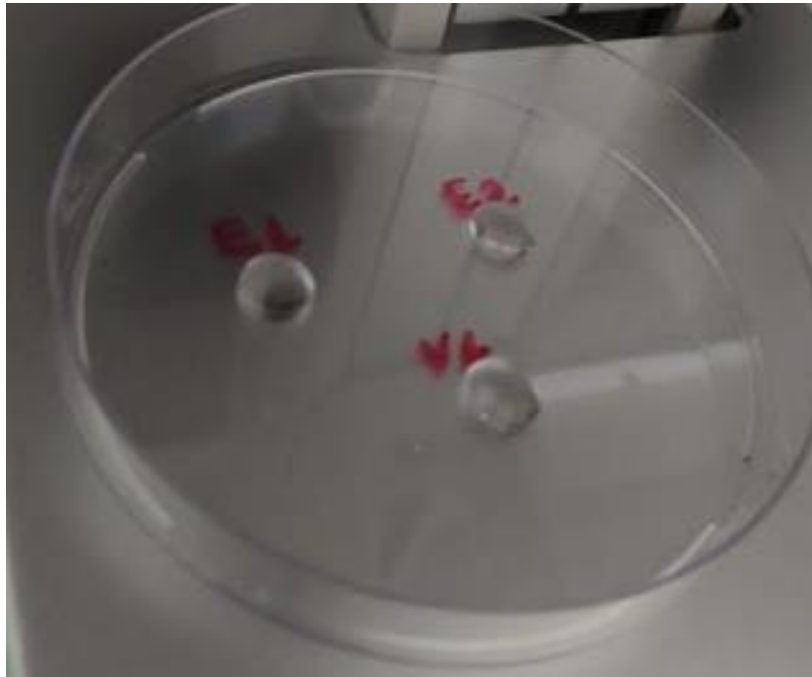
3.5 VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS

3.5.1 Protocolo de vitrificação do meio simples

Após o procedimento de *slicing* dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos em soro fisiológico, os oócitos foram transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo três gotas de 100 µl (cada) do meio desenvolvido (Fig. 9). As duas primeiras gotas de 100 µl foram formadas por solução de equilíbrio,

composta por 0,1% de álcool polivinílico, 7,5% de DMSO e 7,5% de etilenoglicol em meio base PBS. Os oócitos ficaram 30 segundos na primeira gota e depois quatro minutos na segunda gota, numa relação oócitos/meio de 10 oócitos/100 μ l.

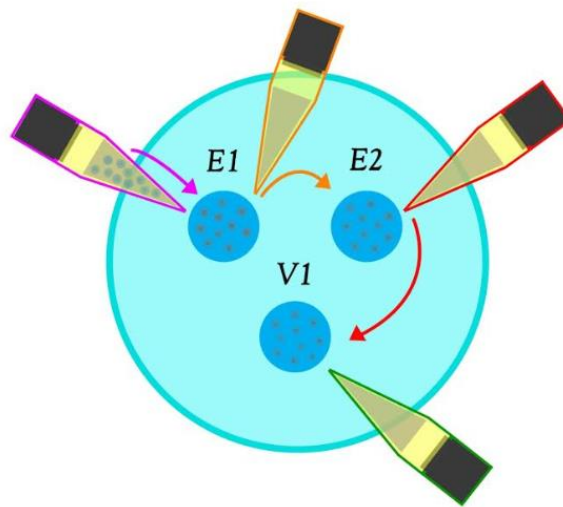
Figura 9 - Placa de Petri de 90 x 15 mm contendo três gotas de 100 μ l de meio artesanal



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Em sequência, os oócitos foram transferidos para a terceira gota contendo solução de vitrificação, composta de 0,1% de álcool polivinílico, 15% de DMSO, 15% de etilenoglicol, 0,3 M de sacarose em meio base PBS (Fig. 10). Os oócitos permaneceram na terceira gota por dois minutos e foram transferidos para a extremidade em bisel de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc com o auxílio de uma pipeta de 10 μ l, ao mesmo tempo que se retirou a máxima quantidade possível de meio, deixando os oócitos com uma quantidade mínima de meio (Fig. 11 e 12).

Figura 10 – Sequência de vitrificação dos oócitos no meio desenvolvido



E1 e E2: solução de equilíbrio.

V1: solução de vitrificação.

Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Figura 11 - Hemi-palheta de 0,25 cc com extremidade em bisel



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Figura 12 - Oócitos depositados na extremidade em bisel de hemi-palhetas francesas de 0,25 cc



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

A extremidade em bisel das hemi-palhetas foi mergulhada diretamente em nitrogênio líquido e não foi selada nem de forma mecânica ou de forma térmica. Após isso, as hemi-palhetas foram submergidas diretamente em nitrogênio líquido e colocadas em *racks* do botijão de nitrogênio líquido.

3.5.2 Formação do grupo controle

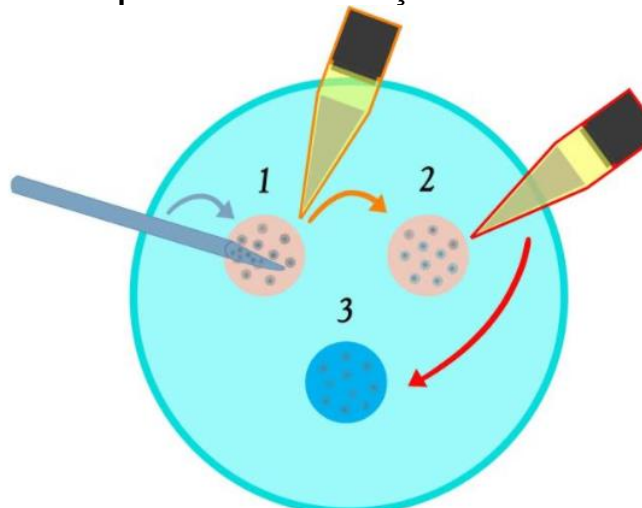
O grupo controle consistiu em oócitos frescos, recém-recuperados dentre os 540 oócitos selecionados para o experimento e que não foram submetidos à vitrificação. Após a recuperação dos oócitos, esses foram submetidos à coloração com o azul de Tripán numa proporção de 100 µl de soro fisiológico para 5 µl de azul de Tripán. Posteriormente, foram submetidos à avaliação em estereomicroscópio quanto a sua morfologia e viabilidade baseada no critério de permeabilidade da membrana plasmática.

3.6 AQUECIMENTO E AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA E DA VIABILIDADE OOCITÁRIA

Os oócitos foram aquecidos e os crioprotetores foram removidos de acordo com o protocolo desenvolvido para o meio simples de vitrificação contendo álcool polivinílico.

O protocolo consistiu, após ensaios prévios, em retirar as hemi-palhetas das *racks* do botijão de nitrogênio líquido com o auxílio de uma pinça anatômica e submergir a extremidade em bisel contendo os oócitos com o meio residual em uma gota de 100 µl contendo a solução de desvitrificação composta por PBS e 0,075 M de sacarose por três minutos (Fig. 13).

Figura 13 – Aquecimento e coloração com azul de Tripán



- 1: PBS e 0,075 M de sacarose por três minutos.
 2: 100 μ l de PBS por 2 minutos.
 3: 100 μ l de PBS e 5 μ l de azul de Tripán por 2 minutos.
 Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Em seguida, os oócitos foram removidos cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta e transferidos para a segunda gota de 100 μ l durante dois minutos, a qual continha apenas PBS.

Logo após, os oócitos foram transferidos para a terceira gota de 100 μ l compreendendo PBS e azul de Tripán, numa proporção de 5 μ l de azul de Tripán para cada 100 μ l de PBS. Os oócitos permaneceram por dois minutos nessa última gota e foram avaliados sob estereomicroscópio, bem como microscópio invertido quanto a aspectos morfológicos: quantidade de camadas de células do cumulus, aspecto, coloração e/ou alterações citoplasmáticas após exposição ao corante vital.

Dessa forma, os oócitos foram agrupados em viáveis ou não viáveis de acordo com a pigmentação de seu ooplasma, sendo obtida a porcentagem de oócitos viáveis e não viáveis para a realização da análise estatística com o teste de *chi-quadrado de Pearson* e *Odds-Ratio*.

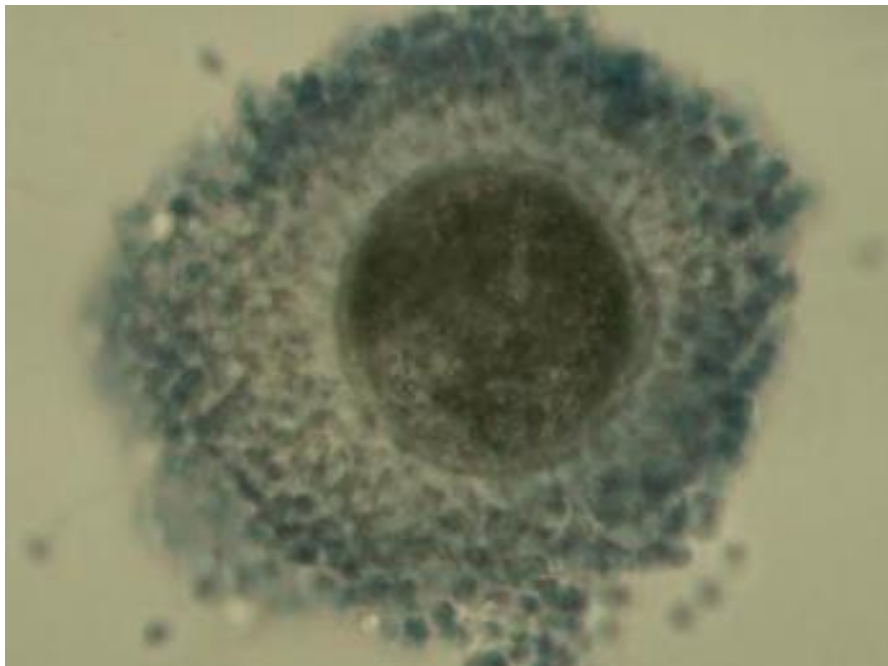
4 RESULTADOS

Foi recuperado um total de 817 oócitos provenientes de 22 ovários de gatas domésticas, sendo que dentre os oócitos recuperados foram selecionados para o experimento apenas aqueles considerados grau I, grau II e grau III, totalizando 540 oócitos, representando 66% dos oócitos recuperados.

Desses oócitos selecionados, 249 oócitos foram vitrificados seguindo todas as diretrizes descritas no presente trabalho, o que equivale a aproximadamente 49,12% dos oócitos selecionados para o estudo.

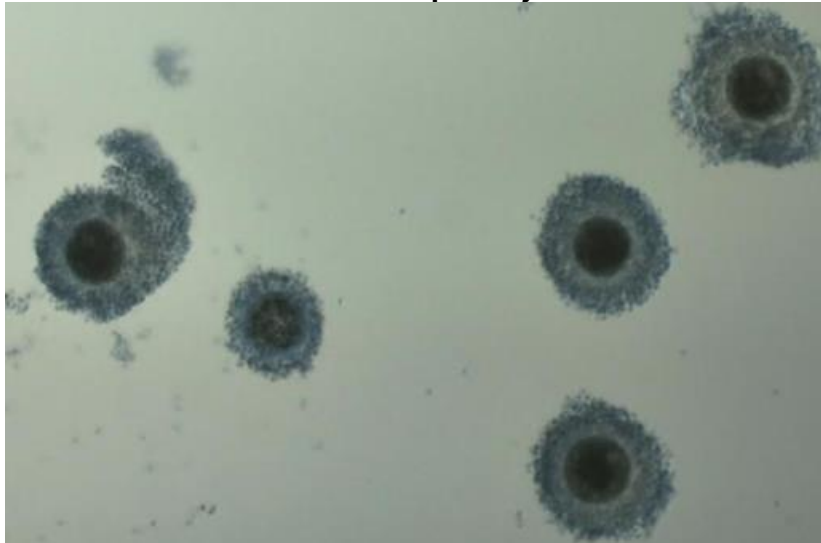
Após o aquecimento e avaliação morfológica sob estereomicroscópio e microscopia invertida com o azul de tripan, foi observado um total de 48 oócitos viáveis e 102 oócitos não viáveis, contabilizando 150 oócitos desvitrificados, o que equivale a 60,24% dos oócitos vitrificados. Dessa forma, 32% dos oócitos aquecidos foram considerados viáveis (Fig. 14-16) e 68% dos oócitos aquecidos foram considerados não-viáveis (Fig. 14 e 16).

Figura 14 - Oócito não-corado com células do cumulus coradas ao redor



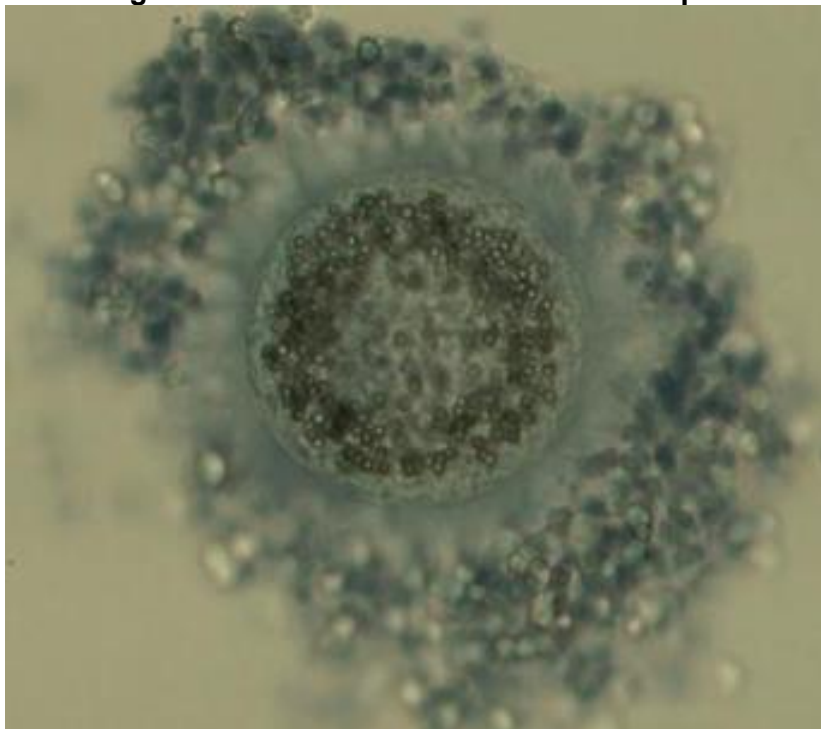
Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Figura 15 - Oócito viável no canto superior junto de oócitos não-viáveis



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Figura 16 - Oócito corado com azul de Tripán



Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

É importante salientar que ocorreram perdas durante o processo de desvitrificação, visto que 21 oócitos desintegraram durante o processo de aquecimento e os demais ficaram aderidos à hemi-palheta ou à ponteira da pipeta ou ainda foram perdidos no armazenamento em nitrogênio líquido e/ou

durante o procedimento. De modo que aproximadamente 39,75% dos oócitos vitrificados foram perdidos no processo de aquecimento (Fig. 5).

O grupo controle foi composto de 112 oócitos daqueles selecionados para o experimento, correspondendo a aproximadamente 20,74% do total de oócitos selecionados. Destes, 53 oócitos coraram com o azul de Tripán e foram considerados não-viáveis e 59 oócitos permaneceram sem a coloração do azul de Tripán. Logo, aproximadamente 47,32% dos oócitos foram considerados não-viáveis e aproximadamente 52,67% dos oócitos foram considerados viáveis (Fig. 15).

Baseada nos aspectos morfológicos oocitários da amostra de oócitos vitrificados/aquecidos e do grupo controle após coloração com o azul de Tripán, a taxa de viabilidade oocitária do presente estudo mostrou diferença significativa ($p < 0,0008$) em relação ao grupo controle (Tab. 1). Com relação aos oócitos não-viáveis, houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de oócitos frescos (47,32%) e oócitos vitrificados/aquecidos (68,00%), com p-valor de 0,0008 (Tab. 1) e realizando-se a análise estatística com relação aos oócitos vitrificados/aquecidos, houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de oócitos viáveis (32,00%) e oócitos não-viáveis (68,00%), com $p < 0,0001$ (Tab. 1).

Tabela 1 – Viabilidade de oócitos felinos frescos e/ou vitrificados após coloração com azul de Tripán

	Total de oócitos	Oócitos viáveis	Oócitos não-viáveis
Oócitos frescos (grupo controle)	112	59 (52,67%)*	53 (47,32%)‡
Oócitos vitrificados/aquecidos	150	48 (32%)* χ	102 (68%) ‡ χ

*‡ Diferença significativa entre os valores das colunas da tabela, com o p-valor $< 0,0008$.

χ Diferença significativa entre os valores da linha da tabela, com o p-valor $< 0,0001$.

Fonte: Elaborada pela própria autora (2020).

Mas, é importante frisar que essa diferença significativa entre o grupo controle e o grupo que foi vitrificado/aquecido já era esperada e está próxima dos valores esperados para essa técnica, por isso, para quantificar a força de associação foi realizado o *Odds ratio*, que aplicado à pesquisa realizada, obteve a razão de 2,365.

O desenvolvimento do processo de vitrificação de oócitos felinos com hemi-palhetas com o meio simples gerou como resultado uma patente de invenção com depósito no INPI com o número de registro: BR1020200246003 (Anexo A).

A patente invenção situa-se no campo da biotecnologia e refere-se a dois processos de produção, sendo o primeiro o processo de produção de hemi-palhetas francesas e o segundo o processo de produção do meio. Além disso, também é descrito um processo de vitrificação de oócitos felinos imaturos compreendendo a etapa de exposição dos oócitos felinos ao álcool polivinílico, etilenoglicol, DMSO, sacarose e solução salina tamponada, de modo que os oócitos após à exposição a estes agentes crioprotetores são posteriormente transferidos a hemi-palhetas francesas de 0,25 cc.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como intuito analisar a integridade oocitária pós-aquecimento de oócitos vitrificados com o meio simples contendo álcool polivinílico. Para tanto, foram selecionados para o estudo COCs grau I, II e III sendo que a média de oócitos recuperados e selecionados por animal submetido a OSH foi de 49 oócitos.

A média do presente estudo diferiu do encontrado por Karja *et al.* (2002), em que foi observada uma média inferior. Foram obtidos 1080 COCs de 54 gatas nos mais variados estágios de desenvolvimento folicular com número médio de COCs de 20 oócitos por animal sendo estes de grau I, II e III.

Essas discrepâncias referentes à média de recuperação e seleção oocitária por animal ocorrem por fatores que incluem a espécie e idade do animal, já que de acordo com May-Panloup *et al.* (2016) a quantidade e a qualidade oocitária presente no parênquima ovariano é negativamente afetada com o passar da idade.

Outro fator a se levar em consideração, de acordo com Fujii *et al.* (2000), para discrepâncias na taxa de recuperação oocitária por pares de ovário submetido à técnica de *slicing* são as diferenças na metodologia da técnica de *slicing* e que pode variar de acordo com cada manipulador. Adicionalmente, estes autores também identificaram que a taxa de recuperação oocitária pode variar de acordo com a fase do ciclo estral que o animal se encontra, sendo os menores números referentes ao pró-estro e estro.

Em relação à taxa de oócitos perdidos durante o procedimento de desvitrificação, as perdas durante o armazenamento e processo de desvitrificação ocorrem em relatos da literatura. Moniruzzaman *et al.* (2009), em experimento avaliando o desenvolvimento de folículos primordiais de suínos vitrificados em xenoenxertos, relatou uma perda severa de oócitos após vitrificação. Eles relataram uma perda estimada de mais de 50% de oócitos que foram vitrificados.

Tal perda pós-vitrificação foi atribuída ao pipetamento durante o aquecimento, uma vez que há a necessidade de realizar a transferência de oócitos com o auxílio de uma pipeta para as diferentes soluções de aquecimento, de modo que alguns oócitos ficam aderidos à ponteira da pipeta. Acontecimento

semelhante ocorreu no presente estudo, além disso, as perdas também são atribuídas ao armazenamento em nitrogênio líquido ou à aderência dos oócitos nas hemi-palhetas.

Como observado nos resultados, ao se fazer o teste de *chi-quadrado de Pearson* constatou-se diferença significativa entre as taxas encontradas no grupo controle e no grupo de oócitos pós-aquecidos. Após a realização do *Odds ratio* para quantificar a força da associação entre as taxas de viabilidade encontradas no grupo controle e grupo de oócitos pós-aquecidos, chega-se à conclusão que oócitos vitrificados tem 2,36 mais chances de se tornarem não-viáveis após o procedimento de desvitrificação, em comparação com oócitos frescos.

É importante salientar que essa diferença também é encontrada de modo vasto na literatura em diferentes espécies, visto que a técnica de vitrificação ainda não conseguiu superar alguns obstáculos para que consiga atingir o mesmo sucesso em relação à utilização de oócitos frescos (BONTE *et al.*, 2020; KUSHNIR *et al.* 2018).

De modo similar, Cocchia *et al.* (2010), ao analisar a viabilidade com o azul de Tripan de COCs felinos frescos e vitrificados, também obtiveram uma taxa de viabilidade com diferença significativa entre o grupo controle e o de COCs vitrificados. Sendo que 45,3% dos COCs vitrificados durante o experimento foram considerados viáveis e 54,5% de COCs não viáveis.

É pertinente observar que a taxa de 45,3% de viabilidade oocitária pós-vitrificação/aquecimento alcançada por Cocchia *et al.* (2010) é superior à taxa de 32% de viabilidade de oócitos vitrificados/aquecidos do presente estudo e há diferença estatística ($p = 0,0182$). Entretanto, essa diferença não desqualifica o meio desenvolvido no presente estudo, pois, essa heterogeneidade entre as taxas de viabilidade do atual estudo para as de Cocchia *et al.* (2010) pode ser explicada pela inclusão de oócitos grau III, além dos de grau I e II, na corrente pesquisa enquanto que Cocchia *et al.* (2010) apenas se ativeram a oócitos grau I e grau II em sua pesquisa.

De modo que a taxa de viabilidade dos oócitos frescos conseguida no estudo vigente foi de cerca de 52,67%, já Cocchia *et al.* (2010) alcançaram uma taxa de viabilidade de 89% para oócitos frescos. Quando as taxas de viabilidade de oócitos frescos dos dois trabalhos são comparadas, há diferença significativa

entre o percentual de oócitos frescos e viáveis de Cocchia *et al.* (2010) e os conseguidos no presente estudo ($p < 0,0001$).

Tal diferença confirma a vantagem da qualidade dos oócitos utilizados por Cocchia *et al.* (2010) em relação aos utilizados no presente estudo e, portanto, a diferença significativa observada entre a taxa de viabilidade de oócitos vitrificados/aquecidos do presente estudo para a taxa de viabilidade de oócitos vitrificados/aquecidos em estudo conduzido por Cocchia *et al.* (2010) não inabilita o presente meio de vitrificação desenvolvido.

Dado que, ao se comparar as taxas de viabilidade dos dois estudos, nota-se que a diferença estatisticamente significativa é maior em relação aos oócitos frescos do que em relação aos oócitos vitrificados/aquecidos dos dois estudos. Com isso, demonstra-se que o presente meio desenvolvido conseguiu superar, em parte, a vantagem da qualidade oocitária de Cocchia *et al.* (2010) e a eficácia do meio desenvolvido pôde ser confirmada.

As taxas de viabilidade de oócitos felinos após a vitrificação variam de autor para a autor, sendo encontradas taxas que variam de 25% a 62% (COCCHIA *et al.*, 2010; GUTIERREZ, 2014; MERLO *et al.*, 2008; MIKOLAJEWSKA *et al.*, 2012; MURAKAMI *et al.*, 2004; NOWAK *et al.*, 2020). Esse fato é explicado devido ao emprego de diferentes crioprotectores e diferenças na técnica, como distinção entre os dispositivos de criopreservação e habilidade do manipulador (MITSUHATA *et al.*, 2020).

As menores taxas são conseguidas com utilização de meios menos enriquecidos e as maiores taxas com a utilização de meios mais sofisticados, de alto custo de aquisição e combinados com dispositivos também mais aprimorados.

Entretanto, é importante ressaltar que a taxa de viabilidade no presente estudo (32%) está dentro do espectro de taxa de viabilidade oocitária pós-vitrificação/aquecimento para a espécie felina encontrada na literatura. Além disso, o presente meio foi desenvolvido com o intuito de ser um meio de vitrificação simples e reproduzível em diferentes localidades, eficaz, acessível para a maioria da realidade dos pesquisadores e sem o SFB. Por ser considerado um meio simples, a taxa de viabilidade com o meio do presente estudo é ligeiramente inferior ao encontrado na literatura, porém, ainda funcional.

Em algumas espécies domésticas de interesse econômico, como bovinos, a técnica está mais avançada e as taxas de viabilidade oocitária são maiores do que as encontradas no presente estudo, com alguns autores chegando a uma taxa de 100% de viabilidade oocitária pós-vitrificação/aquecimento (ARAV *et al.*, 2018).

Entretanto, é importante mencionar que existem diferenças estruturais entre um oócito bovino e um felino, como menor presença de lipídeos intracitoplasmáticos e maior presença de receptores que aumentam a eficiência do processo de absorção de nutrientes por endocitose. Essas diferenças indicam um melhor uso ou armazenamento ativo de energia pelo oócito bovino em relação ao oócito felino e essas diferenças estruturais podem explicar o porquê a taxa de viabilidade do oócito felino pós-vitrificação/aquecimento é menor em relação ao oócito bovino (PAVANI *et al.*, 2020).

Além disso, é relevante ressaltar que Galiguis *et al.* (2014) identificaram alguns aspectos morfológicos desafiante para a vitrificação de oócitos felinos, características que o tornam menos criotolerante que oócitos de outras espécies e até menos criotolerante que embriões. Ele identificou que a dificuldade de criopreservação de oócitos felinos pode ser explicada da mesma maneira pela qual a vitrificação de oócitos suínos é considerada um desafio.

O fator fundamental para a dificuldade de vitrificação de oócitos suínos é a grande quantidade de lipídeos citoplasmáticos, que agem como grandes obstáculos à troca osmótica intracelular pelos ACPs intracelulares (ZHOU; LI, 2009). Da mesma maneira que o oócito suíno encontra-se repleto de gotículas lipídicas, o oócito felino também possui um alto teor de lipídeos citoplasmáticos (GALIGUIS *et al.*, 2014).

A remoção de gotículas lipídicas intracelulares e delipidação antes da vitrificação devem ser levadas em consideração para o aumento da viabilidade de oócitos felinos desvitrificados, de acordo com Galiguis *et al.* (2014). Alguns autores tiveram bastante êxito utilizando métodos de remoção lipídica, que consistiam em centrifugação e/ou remoção dos lipídeos polarizados usando um micromanipulador (GALIGUIS *et al.*, 2014; HARA *et al.*, 2005; KARJA *et al.*, 2006).

Entretanto, apesar da remoção lipídica resultar em melhores taxas de viabilidade oocitária, também é relatado que esses mesmos oócitos, submetidos

à remoção lipídica, quando fecundados *in vitro* e cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto, resultam muitas vezes em gestações anormais com subsequente reabsorção gestacional (GALIGUIS *et al.*, 2014).

Esse acontecimento também foi observado em oócitos murinos sujeitos à remoção lipídica. Os autores observaram que apesar do desenvolvimento ter sido considerado normal até o estágio de blastocisto, houve prejuízo severo do desenvolvimento embrionário precoce, resultando em anormalidades na implantação do embrião (AIZAWA *et al.*, 2019).

Ainda não está elucidado o motivo pelo qual o desenvolvimento embrionário precoce é afetado quando os oócitos passam pelo processo de remoção lipídica. McKeegan e Sturmey (2011) explicam que os ácidos graxos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário precoce, atuando no metabolismo celular, no estresse oxidativo, na composição da membrana plasmática, nos eventos de sinalização celular e na expressão gênica.

Yoneda *et al.* (2004) indicaram que a ausência de lipídeos citoplasmáticos nos oócitos causa redução no número de células em blastocistos e defeitos nesse desenvolvimento embrionário precoce, visto que os lipídeos removidos são importantes para a divisão celular e atuam como fonte de energia. Por isso, no presente estudo foi optado por não se realizar a remoção parcial e/ou total dos lipídeos citoplasmáticos.

Outras alterações que contribuem para menores taxas de viabilidade oocitária felina após o processo de vitrificação e desvitrificação são mencionadas por Turathum *et al.* (2018). Eles descobriram que cerca de 32 proteínas estavam completamente ausentes em oócitos vitrificados (em comparação com o controle fresco), dessas, a maioria era proveniente de proteínas da membrana celular.

Os autores concluíram que ainda é necessário o desenvolvimento de protocolos de vitrificação mais adequados à espécie felina, visando à diminuição dessas perdas proteicas, principalmente na membrana plasmática (THURATUM *et al.*, 2018). Por isso, o presente estudo utilizou o álcool polivinílico para conferir estabilidade à membrana plasmática, alcançando uma taxa de viabilidade de 32%.

A taxa de viabilidade oocitária atingida no presente estudo pós-vitrificação/aquecimento se mostra inferior à taxa de viabilidade de oócitos

felinos vitrificados com o emprego de soluções contendo SFB e outras substâncias compondo meios mais complexos, porém sem diferença estatística para alguns autores. Como exemplo, Mikolajewska *et al.* (2012) em estudo sobre a viabilidade oocitária felina pós-vitrificação com meios enriquecidos contendo SFB e Ficoll conseguiram uma taxa de viabilidade de 41%. Entretanto, é importante ressaltar que os pesquisadores conseguiram uma taxa inferior de viabilidade oocitária (25%) ao do presente estudo quando utilizaram somente o SFB sem o Ficoll.

Ao se fazer o teste de *chi-quadrado de Pearson* para a realização de análise estatística entre os dados sobre viabilidade oocitária apresentados no presente estudo e aqueles referentes à taxa de viabilidade oocitária conseguidos por Mikolajewska *et al.* (2012), não se encontrou diferença significativa nem entre os oócitos vitrificados com SFB e Ficoll com os dados do presente estudo ($p > 0,2$) e nem entre aqueles vitrificados apenas com SFB com a taxa de viabilidade oocitária do presente estudo ($p > 0,4$).

Essa análise corrobora o êxito do meio desenvolvido no presente estudo de cumprir com a sua função de manutenção da viabilidade oocitária em níveis aceitáveis de acordo com a literatura, bem como ser um meio simples, acessível e reproduzível em diferentes localidades e que pode ser tão eficaz quanto meios contendo o SFB, cuja composição é constituída por várias substâncias complexas, como: colesterol, proteínas, aminoácidos, minerais, glicose e vitaminas (TENÓRIO *et al.*, 1989). Por conta dessa rica constituição, os benefícios do SFB vão muito além da estabilização da membrana plasmática (como é o caso do álcool polivinílico).

Entre os benefícios adicionais do uso do SFB em meios de vitrificação, é relatado em literatura que ele impede o endurecimento precoce da zona pelúcida, incidente que pode ser desencadeado com a vitrificação e pode favorecer o rompimento precoce da zona pelúcida durante o processo de desvitrificação (WIESAK *et al.*, 2017).

Esse rompimento precoce da zona pelúcida foi explicado por Dhali *et al.* (2000), como sendo a alteração mais importante em oócitos vitrificados e que isso leva a extrusão do citoplasma. Essa extrusão do citoplasma deixa apenas parte do esqueleto do oócito, sendo que este logo é desintegrado com a

realização de pipetagens para a transferência dos mesmos a outras soluções de desvitrificação.

Essa desintegração foi observada em 21 oócitos no presente experimento. Por isso, para um maior sucesso nos procedimentos de vitrificação/desvitrificação de oócitos felinos comparável aos resultados com SFB, deve-se considerar a possibilidade do acréscimo de outras substâncias, além do álcool polivinílico, que impeçam o endurecimento precoce da zona pelúcida, não aumentem o risco de contaminação do meio de vitrificação e que sejam acessíveis à maioria da realidade das pesquisas.

Alguns exemplos de substâncias que são citadas como adjuvantes para diminuição da ocorrência do endurecimento precoce da zona pelúcida em substituição ao SFB, além do álcool polivinílico, e que podem ser incorporadas ao meio sem que haja aumento do risco de transmissão de patógenos e sua composição seja conhecida são a fetuína B, bem como o substituto sintético de soro (SSS) e BSA.

O mecanismo de ação da fetuína B dá-se por meio da inibição da ovastacina, que está intimamente ligada ao endurecimento da zona pelúcida. Deste modo, o controle da ovastacina é indispensável para a fertilidade feminina e o acréscimo de fetuína B para impedir o endurecimento precoce da zona pelúcida é uma boa alternativa para todas as espécies de mamíferos (KARMILIN *et al.*, 2019).

O SSS é formado por 6% de proteínas diluídas em soro fisiológico, sendo que a Albumina Sérica Humana (HSA) compõe 84% das proteínas totais, enquanto que a alfa e beta globulinas correspondem a 16% das proteínas totais. O uso do SSS em meios de vitrificação é interessante já que o SSS é formado por proteínas e essas poderiam suprir as perdas proteicas que ocorrem durante a vitrificação. Entretanto, o SSS é de difícil aquisição e possui um alto valor monetário (GRAHAM *et al.*, 1995).

O BSA, por ser formado exclusivamente pela proteína albumina sérica bovina purificada, cuja composição é de 583 aminoácidos, é um composto altamente estável e pode ser utilizado com a mesma finalidade do álcool polivinílico (de estabilidade da membrana plasmática). Por ser altamente estável e de composição conhecida, tem a vantagem de não interferir em reações

biológicas, entretanto, não é de fácil aquisição e a depender de seu grau de pureza pode ter um alto custo (JAHANBAN-ESFAHLAN *et al.*, 2019).

Todos esses exemplos de substâncias adjuvantes para diminuição da ocorrência do endurecimento precoce da zona pelúcida em substituição ao SFB possuem suas vantagens de utilização. Não obstante, a interação dessas substâncias com o álcool polivinílico necessita de mais aprofundamento e é importante observar se a adição dessas substâncias ao presente meio não irá descaracterizá-lo quanto a sua acessibilidade, simplicidade e reprodução em diferentes localidades.

6 CONCLUSÃO

O meio de vitrificação desenvolvido no presente estudo, com o intuito de ser um meio de vitrificação simples, reproduzível em diferentes localidades, eficaz e sem o SFB, obteve êxito similar a meios menos enriquecidos encontrados na literatura na manutenção da viabilidade oocitária felina durante o processo de vitrificação/aquecimento para o estudo de peculiaridades reprodutivas felinas, servindo como base para ser aplicado em protocolos de vitrificação de oócitos de felídeos, contribuindo para a formação de bancos de germoplasma de espécies de felídeos selvagens.

Entretanto, mais estudos são necessários para a avaliação de outras taxas importantes para a composição de bancos de germoplasma para a conservação de espécies felíneas, como a taxa de maturação oocitária, taxa de fecundação, taxa de clivagem e taxa de formação de blastocisto.

Adicionalmente, deve-se considerar a possibilidade do acréscimo de outras substâncias ao meio em questão, além do álcool polivinílico, que impeçam anomalias oocitárias pós-aquecimento observadas no presente estudo, aumentando, dessa maneira, a taxa de viabilidade oocitária. É importante salientar que as substâncias escolhidas não podem aumentar o risco de contaminação do meio de vitrificação e devem ser acessíveis à maioria da realidade das pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDALLA, M.; ROVERSI, P. F. Vitrification assessment: Thermal analysis of cryoprotective aqueous solutions 1,2 propanediol and ethylene glycol. **Biopreservation and Biobanking**, v. 16, n. 3, 2018.

AIZAWA, R. *et al.* Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development. **Development**, vol. 146, n. 22, 2019.

AL tem 15 espécies de animais ameaçadas ou em risco de extinção, diz IMA. 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/al/alagoas/noticia/al-tem-15-especies-de-animais-ameacados-ou-em-risco-de-extincao-diz-ima.ghtml>>. Acesso em: 09 mar. 2020.

AMIDI, F.; KHODABANDEH, Z.; MOGAHI, M. H. N. Comparison of the effects of vitrification gene expression of mature mouse oocytes using criotop and open pulled straw. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 12, n. 1, p. 61-67, 2018.

AMORIM C.A. *et al.* Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, v.79, p.683-686, 2003.

ANDRADE, H. B. **A ameaça do tráfico de animais silvestres no Brasil: o caso da arara-azul e do mico-leão-dourado.** 2011. Monografia (Licenciatura) – Universidade de Brasília/ Universidade Estadual de Goiás, Consórcio Setentrional de Educação à Distância, Brasília, Distrito Federal, 2011.

ANTINORI, M. *et al.* Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 1, p. 72-79, 2007.

APPARICIO, M.; RUGGERI, E.; LUVONI, G.C. Vitrification of immature feline oocytes with a commercial kit for bovine embryo vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-7, 2012.

ARAÚJO, E. A. B. *et al.* Aspiração folicular vídeolaparoscópica comparativa em ovelhas Dorper e Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n.1, p. 98-104, 2016.

ARAV, A. *et al.* A new, simple, automatic vitrification device: preliminary results with murine and bovine oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 7, p. 1161-1168, 2018.

ARAYATHAN, S.; TIPTAVAVATANNA, N.; THARASANIT, T. Effects of vitrification and a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 inhibitor on the meiotic and developmental competence of feline oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 63, n. 5, p. 511-517, 2017.

ARGYLE, C. E.; HARPER, J. C.; DAVIES, M. C. Oocyte cryopreservation: where are we now? **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 4, p. 440-449, 2016.

ASADA, M. *et al.* Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1199-1208, 2002.

BAGCHI, A.; WOODS, E.; CRISTER, J. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert Review of Medical Devices**, v. 5, n. 3, p. 359-370, 2008.

BONTE, D. *et al.* Vitrification negatively affects the Ca²⁺-releasing and activation potential of mouse oocytes, but vitrified oocytes are potentially useful for diagnostic purposes. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 40, n. 1, p. 13-25, 2020.

BRAYTON, C. F. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): a review. In: **The Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 1, p. 61, Nova Iorque, Estados Unidos, 1986.

CARREIRO, A. N. *et al.* Obtenção de oócitos post mortem em *Leopardus tigrinus* Schreber, 1775 – Relato de Caso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n. 41, p.688-690, 2017.

CARVALHO, A. A. *et al.* Vitriificação: Uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CASTRO, S. V. *et al.* Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CHEN, S. *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v. 21, n. 11, p. 2794-2800, 2006.

COCCHIA, N. *et al.* Immature cat oocyte vitrification in open pulled straws (OPSs) using a cryoprotectant mixture. **Cryobiology**, v. 60, n. 2, p. 229-234, 2010.

COLOMBO, M. *et al.* Granulosa cells in three-dimensional culture: A follicle-like structure for domestic cat vitrified oocytes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 00, p. 1-7, 2019.

CURCIO, B. R. *et al.* Vitrification of equine oocytes with a polyvinyl alcohol after in vitro maturation with equine growth hormone and insulin-like growth factor-i. **Cryo-Letters**, vol. 35, n. 2, p. 90-94, 2014.

DHALI, A. *et al.* Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 6, p. 1295-1303, 2000.

DURANT, S. M. et al. The global decline of cheetah *Acinonyx jubatus* and what it means for conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 114, n. 3, p. 528-533, 2017.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 175-86, 2000.

FAUQUE, P. et al. Use of trypan blue staining to assess the quality of ovarian cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 5, p. 1200-1207, 2007.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 3-15, 2011.

FERNANDEZ-GONZALEZ, L.; JEWGENOW, K. Cryopreservation of feline oocytes by vitrification using commercial kits and slush nitrogen technique. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 230-234, 2017.

FUJII, M. et al. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 3, p. 305-307, 2000.

GALIGUIS, J. et al. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 459-466, 2014.

GHASEM, S.; NEGAR, K. Effect of vitrification on number of inner cell mass in mouse blastocysts in conventional straw, closed pulled straw, open pulled straw and cryoloop carriers. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 63, n. 4, 2013.

GRAHAM, M. C. et al. A prospective comparison of Synthetic Serum Substitute* and human serum albumin in culture for in vitro fertilization-embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 64, n. 5, p. 1036-1038, 1995.

GUTIERREZ, R. R. **Avaliação da viabilidade e desenvolvimento *in vitro* de oócitos de gatas domésticas após vitrificação em meio suplementado com vitamina E**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Jaboticabal, São Paulo, 2014.

HANANI, M. Lucifer yellow – an angel rather than the devil. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 1, p. 22-31, 2012.

HARA, K. et al. Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: Centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. **Cryobiology**, v. 50, n. 2, p. 216-222, 2005.

HERRICK, J.; WANG, C.; MACHATY, Z. The effects of permeating cryoprotectants on intracellular free-calcium concentrations and developmental potential of in vitro-matured feline oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 599-607, 2017.

HOSHINO, Y. Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index. **Reproductive Medicine and Biology**, vol. 17, n. 4, p. 434-441, 2018.

HOSSEINI, S. M.; NARS-ESFAHANI, M. H. What does the cryopreserved oocyte look like? A fresh look at the characteristic oocyte features following cryopreservation. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 32, n. 4, p. 337-387, 2016.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: Volume II – Mamíferos**. 1. ed. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018.

ISHIJIMA, T. *et al.* Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 293-299, 2006.

JAHANBAN-ESFAHLAN, A. *et al.* Recent developments in the detection of bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 602-617, 2019.

JANECKA, J. *et al.* Loss of genetic diversity among ocelots in the United States during the 20th century linked to human induced population reductions. **PLoS One**, v. 9 n. 2, 2014.

JOHN, T. *et al.* Effect of trypan blue on descemet membrane elasticity. **Cornea**, v. 35, n. 11, p.1401-1403, 2016.

KAMATH, M. S.; MUTHUKUMAR, K. **Cryopreservation of Mammalian Gametes and Embryos**. Methods in Molecular Biology, vol 1568. Humana Press, New York, NY, 2017.

KARJA, N. W. K. *et al.* In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2289-2298, 2002.

KARJA, N. W. K. *et al.* In vitro development and post-thaw survival of blastocysts derived from delipidated zygotes from domestic cats. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 415-423, 2006.

KARMILIN, K. *et al.* Mammalian plasma fetuin-B is a selective inhibitor of ovastacin and meprin metalloproteinases. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

KENNEY, J. *et al.* How much gene flow is needed to avoid inbreeding depression in wild tiger populations? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1789, 2014.

KHALILI, M. A. *et al.* Vitrification of human immature oocytes before and after in vitro maturation: a review. **J Assist Reprod Genet**, vol. 34, n. 11, p. 1413-1426, nov. 2017.

KUSHNIR, V. A. *et al.* New national outcome data on fresh versus cryopreserved donor oocytes. **Journal of Ovarian Research**, v. 11, n. 2, 2018.

KUSUDA, S.; TERANISHI, T.; KOIDE, N. Cryopreservation of chum salmon blastomeres by the straw method. **Criobiology**, v. 45, n. 1, p. 60-67, 2002.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 3, p. 300-308, 2005.

LEVI-SETTI, P.; PATRIZIO, P.; SCARAVELLI, G. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity**, v. 23, n. 6, p.445-450, 2016.

LIERMAN, S. *et al.* Follicles of various maturation stages react differently to enzymatic isolation: A comparison of different isolation protocols. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 30, n. 2, p. 181-90, 2015.

LIMA, D. B. C. *et al.* Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, v. 110, p. 110-115, 2018.

LIU, L. *et al.* Successful cryoloop vitrification and subsequent in vitro maturation of mouse preantral follicles. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, n. 3, p. 149-153, 2011.

MACHADO, L. *et al.* Manutenção da biodiversidade brasileira através de bancos de germoplasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n. 1, p. 62-66, 2016.

MADEIRA, E. M. *et al.* Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol. 65, n. 2, p. 415-420, 2020.

MATOS, M. H. T. *et al.* Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.4, p.433-442, 2007.

MAY-PANLOUP, P. *et al.* Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles. **Human Reproduction Update**, v. 22, n. 6, p. 725-743, 2016.

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n.1, p. 59-67, 2011.

MEIKLE, M. N. *et al.* Minimum volume spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. **Cryobiology**, v. 84, p. 77-81, 2018.

MERLO, B. *et al.* Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 1, p. 126-130, 2008.

MIKOLAJEWSKA, N. *et al.* Vitrification of domestic cat oocytes – effect on viability and integrity of subcellular structures. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 295-299, 2012.

MITSUHATA, S. *et al.* Effect of equilibration time on clinical and neonatal outcomes in human blastocysts vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 19, n. 3, p. 270-276, 2020.

MONIRUZZAMAN, M. *et al.* Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 280-288, 2009.

MOREIRA, N. Técnicas reprodutivas para a conservação de felídeos silvestres. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.116-120, 2017.

MOURA, E. G.; CAMARGO JÚNIOR, K. R. A crise no financiamento da pesquisa e pós-graduação no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, 2017.

MUKAIDA, T. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 6, n. 2, p. 221-225, 2002.

MUNCK, N.; VAJTA, G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. **Cryobiology**, v. 78, p. 119-127, 2017.

MURAKAMI, O. M. *et al.* Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 341-348, 2004.

NAITANA, S. *et al.* Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n.2-4, p. 247-256, 1997.

NAPOLITANO, C. *et al.* Reduced genetic diversity and increased dispersal in guigna (*Leopardus guigna*) in chilean fragmented landscapes. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 1, p. 522-536, 2015.

NOWAK, A. *et al.* Survivability and developmental competences of domestic cat (*Felis catus*) oocytes after Cryotech method vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 8, p. 992-997, 2020.

OCHOTA, M.; WOJTASIK, B.; NIZANSKI, W. Survival rate after vitrification of various stages of cat embryos and blastocyst with and without artificially collapsed blastocoel cavity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 281-287, 2017.

PALMA, G. A. **Producción in vitro de embriones bovinos**. In: Biotecnología de la reproducción. 2ª ed. Mar del Plata - Argentina, p. 313-380, 2008.

PATHAN, S. G. *et al.* Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 8, p. 1652-1662, 2015.

PAVANI, K. C. *et al.* Novel ultrastructural findings in bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 143, p. 88-97, 2020.

PAVIOLO, A. *et al.* A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. **Scientific Reports**, v. 6, n. 37147, 2016.

PAZ, R.C.R *et al.* Análise citogenética de oócitos de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) coletados após estimulação ovariana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.46, n. 4, p.309-316, 2009.

PORFÍRIO, G. Etnozoologia e conservação da onça-pintada (*Panthera onca*) no Brasil. **Interações**, v. 20, n. 2, p. 559-574, 2019.

PRAXEDES, E. *et al.* Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. **Zoobiology**, v. 37, n. 4, p. 258-263, 2018.

RUEDA-ZOZAVA, P. *et al.* Genetic variability and structure of jaguar (*Panthera onca*) in Mexican zoos. **Genetica**, v. 144, n.1, p. 59-69, 2016.

SANTIN, T.; BLUME, H.; MONDADORI, R. Criopreservação de embriões- metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 561-574, 2009.

SILVA, A. R. *et al.* Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n.1, p. 219-234, 2012.

SOWINSKA, N. *et al.* Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after in vitro maturation and vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 5, p. 806-813, 2017.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, 2015.

- TENÓRIO, E. C. N. *et al.* Caracterização bioquímica de soros de bezerros utilizados na manutenção de culturas celulares usadas em virologia. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, n. 2, p. 162-169, 1989.
- THARASANIT, T. *et al.* Successful pregnancy following transfer of feline embryos derived from vitrified immature cat oocytes using 'stepwise' cryoprotectant exposure technique. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1442-1449, 2011.
- TURATHUM, B. *et al.* Missing and overexpressing proteins in domestic cat oocytes following vitrification and in vitro maturation as revealed by proteomic analysis. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 27, 2018.
- TRIGO, T. C. *et al.* Inter-species hybridization among 46 Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular Ecology**, v.17. p. 4317-4333, 2008.
- TSANG, W. H.; CHOW, K. L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. **Biotechniques**, vol. 46, n. 7, p. 550-552, 2009.
- VALK, J. *et al.* Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. **Alternatives to Animal Experimentation**, v. 35, n. 1, p. 99-118, 2018.
- WARZYCH, E. *et al.* Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction & Development**, v. 74, n. 3, p. 280-289, 2007.
- WESTBURY, M. *et al.* Extended and continuous decline in effective population size results in low genomic diversity in the world's rarest hyena species, the brown hyena. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 5, p. 1225-1237, 2018.
- WIESAK, T. *et al.* Effect of vitrification on the zona pellucida hardening and follistatin and cathepsin B genes expression and developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 76, p. 18-23, 2017.
- YONEDA, A. *et al.* Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 3, p. 287-295, 2004.
- YOUM, H. S. *et al.* Closed versus open vitrification for human blastocyst cryopreservation: A meta-analysis. **Cryobiology**, v. 77, p. 64-70, 2018.
- ZHAN, C. *et al.* Explorations of the optimal method for isolating oocytes from zebrafish (*Danio rerio*) ovary. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 330, n. 8, p. 417-426, 2018.

ZHE, J. *et al.* Causes of oocyte vitrification and its value in assisted reproductive technology. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 39, n. 7, p. 766-771, 2019.

ZHOU, G.; LI, N. Cryopreservation of porcine oocytes: recent advances. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 5, p. 279-285, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de depósito de patente



01/12/2020 870200151478
18:59

29409161926772112

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 024600 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL JAYME DE ALTAVILA - FEJAL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 12207742000171

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: RUA CONEGO MACHADO, Nº 918 - FAROL

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57051-160

País: Brasil

Telefone: 82 3215 5011

Fax:

Email: michella.grey@cesmac.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 01/12/2020 às 18:59, Petição 870200151478