



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

RANYELE DOS SANTOS FREITAS

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE CADELAS**

ARAGUAÍNA/TO

2025

RANYELE DOS SANTOS FREITAS

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARINO DE CADELAS**

Relatório de estágio curricular supervisionado apresentado a Universidade Federal do Tocantins Centro de Ciências Agrárias, para obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

Supervisor(a): Prof^a. Dra. Ana Kelen Felipe Lima

ARAGUÍNA/TO

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica SGFC-UFNT

Gerado automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F866r Freitas, Ranyele .

Relatório de estágio curricular supervisionado: Vitrificação de tecido ovariano de cadelas / Ranyele Freitas. - Centro de Ciências Agrárias - CCA, TO, 2025.

40 f.

Relatório de Graduação (Graduação - em Medicina Veterinária) -- Universidade Federal do Norte do Tocantins, 2025.

Orientador: Francisca Elda Ferreira Dias.

1. Criopreservação. 2. TECIDO OVARIANO. 3. REPRODUÇÃO ANIMAL.

CDD 636.089

Orientador(a): Francisca Elda Ferreira Dias

Orientando(a): Ranyele dos Santos Freitas

RANYELE DOS SANTOS FREITAS

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO: VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARINO DE CADELAS

Relatório apresentada à Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), Centro de Ciências Agrárias (CCA), curso de medicina veterinária. Foi avaliado para o título de médica veterinária e aprovado em sua forma final pelo orientador e pela banca examinadora.

Data 11/06/2025

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Francisca Elda Ferreira Dias
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Coelho Ribeiro
Examinadora

Médica Veterinária e MSc. Denise Pereira Silva
Examinadora

Dedico

A Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas.

A José Antônio de Freitas e Marlúcia dos Santos Freitas, por serem meu alicerce e porto seguro.

A Rosenilda Freitas e Thais Freitas, que, com coragem e determinação, enfrentam a vida com força e fé, e nunca deixam de lutar pelos próprios sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela vida, pela força e por me sustentar ao longo dessa jornada. Se hoje sou quem sou, é porque sua mão sempre me acompanhou.

Aos meus pais, José Antônio de Freitas Marlúcia dos Santos Freitas, pilares da minha formação, por todo amor, apoio incondicional e por lutarem de sol a sol para que eu estivesse aqui. Sem vocês, eu não teria conseguido.

Às minhas irmãs, Rosenilda dos Santos Freitas e Thais dos Santos Freitas, por me darem força e coragem, e por serem exemplos de determinação e doação em prol dos meus sonhos, celebrando comigo cada pequena vitória.

Ao meu namorado, Orivaldo Rodrigues de Oliveira, por estar ao meu lado nos dias difíceis, por ser meu incentivador e me encorajar, mesmo quando eu não confiava em mim.

Às amigas da graduação, Jacileia Nascimento Soares, Karine Luz e Grasiella Firmino, com quem compartilhei risadas, angústias, provas, madrugadas e conquistas. Nossa caminhada conjunta foi essencial para tornar este percurso mais leve e significativo.

De maneira especial minha amiga lasmin Alves Martins que foi luz de Deus na minha jornada na graduação.

Às minhas queridas amigas Samara Pereira da Silva e Sinara Pereira da Silva, que mesmo não estando na universidade comigo, foram verdadeiras âncoras quando cheguei em Araguaína com o coração cheio de sonhos e incertezas. Foi ao lado de vocês que encontrei força, companhia e coragem para seguir. Estudamos, lutamos, sonhamos, hoje podemos dizer tudo isso já foi um sonho.

Aos professores: Ana Paula Coelho Ribeiro, pela dedicação e compromisso com o ensino, por sua paciência, que nos permitia tentar, errar e acertar, a senhora fez toda a diferença; Andrea Cintra por ser exemplo de entrega, cuidado e por nos estimular ao raciocínio; Ana Kelen Felipe Lima, que me acolheu com generosidade no estágio; e Francisca Elda Ferreira Dias, por aceitar me orientar, compartilhando seus conhecimentos e dedicando tempo para que eu pudesse oferecer sempre o meu melhor.

Aos alunos do PIBIC e do mestrado que estiveram comigo no estágio, vocês foram uma verdadeira inspiração para mim, no companheirismo, humildade, dedicação e compromisso. Minha gratidão a todos!

À técnica Gilzelle Luz da Silva, por compartilhar seus conhecimentos comigo durante o estágio supervisionado, sempre com entrega e excelência no trabalho.

A todos os locais e profissionais que abriram suas portas durante minha trajetória em especial, ao Centro de Castrações e toda a equipe que, com paciência, me

proporcionaram espaços, experiências e aprendizados que enriqueceram este trabalho e a minha formação profissional.

Agradeço a UFNT na pessoa de todos os professores, técnico administrativos e o pessoal terceirizado, pois todos de alguma maneira contribuíram na minha formação durante todo o período da minha graduação.

Costumo dizer que Deus foi muito generoso comigo por colocar as pessoas certas nos momentos certos. Sou profundamente grata por cada companhia, apoio e palavra de incentivo que recebi ao longo dessa jornada. Levo cada um no coração com muito carinho.

A cada um de vocês, minha mais sincera gratidão. Este trabalho carrega um pouco de todos que me ajudaram a chegar até aqui.

Penso, logo existo (René Descartes)

Depois do medo vem o mundo (Clarice Lispector)

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado, realizado no Laboratório de Reprodução (LARA), da Universidade Federal do Norte do Tocantins, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) na BR-153, S/N, Km 112, na zona rural de Araguaína-TO, CEP 77804-970, totalizando 390 horas, orientado pela Prof^a. Dr^a. Francisca Elda Ferreira Dias e supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Ana Kelen Felipe Lima. O estágio teve como foco a área de biotecnologia aplicada à reprodução, com ênfase na criopreservação de tecido ovariano de cadelas por meio da técnica de vitrificação. Durante o estágio, foram desenvolvidas atividades práticas como coleta e preparação de tecido ovariano, preparo de soluções crioprotetoras e execução do protocolo de vitrificação. Dentre as diversas atividades desenvolvidas durante o estágio, este trabalho descreverá mais detalhadamente o processo de vitrificação de tecido ovariano de cadelas, que consiste em uma técnica de congelamento ultrarrápido que utiliza altas concentrações de crioprotetores sem formação de cristais de gelo, com objetivo de preservar a integridade celular e posteriormente ser utilizado em programas de reprodução assistida.

Palavras-chave: Estágio supervisionado. Criopreservação. Tecido ovariano. Vitrificação. Reprodução animal. Reprodução. Caninos.

ABSTRACT

This report describes the activities carried out during the Supervised Curricular Internship, conducted at the Reproduction Laboratory (LARA) of the Federal University of Northern Tocantins, located at the Center for Agricultural Sciences (CCA) on BR-153, S/N, Km 112, in the rural area of Araguaína-TO, ZIP code 77804-970. The internship totaled 390 hours and was supervised by Prof. Dr. Francisca Elda Ferreira Dias and overseen by Prof. Dr. Ana Kelen Felipe Lima. The internship focused on the area of biotechnology applied to reproduction, with an emphasis on the cryopreservation of canine ovarian tissue through the vitrification technique. During the internship, practical activities were carried out, such as the collection and preparation of ovarian tissue, preparation of cryoprotective solutions, and execution of the vitrification protocol. Among the various activities performed, this report will detail the process of vitrification of canine ovarian tissue, which consists of an ultra-rapid freezing technique that uses high concentrations of cryoprotectants without the formation of ice crystals, aiming to preserve cellular integrity for later use in assisted reproduction programs.

Keywords: Supervised internship. Cryopreservation. Ovarian tissue. Vitrification. Animal reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Laboratório de reprodução animal/Campus Araguaína.....	17
Figura 2 - Localização do laboratório de reprodução.....	18
Figura (A) - Banho-maria.....	19
Figura (B) - Botijão de nitrogênio.....	19
Figura (C) - Capela de fluxo laminar.....	20
Figura (D) - Computador.....	20
Figura (E) - Freezer biológico.....	20
Figura (F) - Geladeira.....	20
Figura (G) - Maca laparoscópica.....	20
Figura (H) - Manta térmica.....	20
Figura (I) - Microscópios e Lupas.....	20
Figura(J) - Eletrojaculador Bovino.....	20
Gráfico 1 - Percentuais das atividades realizadas no período de estágio...	22
Figura 3 - Esquema de protocolo usado para vitrificação.....	23
Figura 4 - (A) Lavagem do Tecido Ovariano com Solução Fisiológica (B) Corte Frontal do Ovário.....	25
Figura 5 - (A) Remoção do Corpo Lúteo (B) Fragmentação do Tecido.....	26
Figura 6 - Esquema representativo aplicado aos fragmentos ovarianos.....	26
Figura 7 - Fragmentos ovarianos imersos na solução de criopreservação..	28
Figura 8 - (A) Vitrificação dos fragmentos (B) Armazenamento do tecido vitrificado em macrotubos.....	29
Figura 9 - Armazenamento em nitrogênio líquido.....	30
Figura 10 - Reaquecimento de fragmentos ovariano em banho Maria.....	31

Figura 11 - Diluição dos crioprotetores em escala decrescente de concentração.....	31
Figura 12 - Diagrama geral do processo de vitrificação.....	32
Figura 13 – Classificação folicular normal (A) e degenerado (B).	34
Figura 14 - Corte histológico do ovário de cadela grupo controle.....	34
Figura 15 - Corte histológico do ovário de cadela grupo exposição.....	35
Figura 16 - Corte histológico do ovário de cadela grupo vitrificado.....	35
Figura 17 - Corte histológico ovário de cadela grupo vitrificado.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Principais equipamentos disponíveis no laboratório de reprodução.....	19
Quadro 2 - Atividades desenvolvidas na área da reprodução durante período de estágio.....	21
Quadro 3 - Fazendas visitadas durante período de estágio.....	22
Quadro 4 - Crioprotetores utilizados no processo de vitrificação.....	28

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ACPs	Agentes Crioprotetores
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEP	Código de Endereçamento Postal
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
Dr ^a .	Doutora
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
HE	Hematoxilina e Eosina
LARA	Laboratório de Reprodução Animal
LN ₂	Nitrogênio Líquido
Km	Kilômetro
M	Molar
MEM	Meio Essencial Mínimo
NPCPAs	Agentes Crioprotetores Não Penetrantes
PA	Pará
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
Prof ^a .	Professora
PROH	Propanodiol
SAC	Sacarose
SSV	Vitrificação em Superfície Sólida
TO	Tocantins
UFNT	Universidade Federal do Norte do Tocantins
µm	Micrômetro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	17
2.1 Local do Estágio.....	17
2.2 Atividades Realizadas.....	21
2.2.1 Criopreservação de Tecido Ovariano.....	22
2.2.2 Etapas da Vitrificação de Tecido Ovariano.....	24
2.2.3 Coleta de tecido Ovariano.....	24
2.2.4 Exposição aos crioprotetores.....	27
2.2.5 Vitrificação propriamente dita.....	28
2.2.6 Armazenamento.....	29
2.2.7 Aquecimento e remoção do crioprotetores.....	30
2.3 Análise Histológica.....	33
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

O presente relatório tem como objetivo discorrer o estágio supervisionado obrigatório, disciplina exigida para conclusão da graduação em medicina veterinária, desenvolvido sob orientação da Prof^a. Dr^a. Francisca Elda Ferreira Dias e supervisão da Prof.^a Dr^a. Ana Kelen Felipe Lima, conduzida no Laboratório de Reprodução, da Universidade Federal do Norte do Tocantins, no período de 10 de março a 22 de maio de 2025. Durante esse período, a carga horária diária foi de 8 horas, totalizando 40 horas semanais, alcançando um total de 390 horas.

Durante o estágio foi possível explorar conhecimento teóricos e práticos adquiridos durante a formação na área da reprodução, tendo em vista que é uma área crescente e de grande importância para o mercado de trabalho. Além de aprimorar habilidades técnicas, interpessoais e senso crítico para atuação com mais segurança na esfera profissional.

Assim, o presente relatório traz a apresentação e caracterização do local de estágio, as atividades desenvolvidas a rotina acompanhada durante o período descreve mais detalhadamente um protocolo de vitrificação de tecido ovariano de cadelas referenciando-a.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 Local do Estágio

O estágio foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal(LARA) é uma unidade de suporte ao ensino da graduação e pós-graduação pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) (FIGURA 1).Suas atividades foram iniciadas por volta dos anos 2000 e, desde então o laboratório tem se dedicado a serviços de ensino, pesquisa e extensão em biotecnologias aplicadas à reprodução animal, promovendo conhecimento prático aos alunos do curso de Medicina Veterinária da UFNT.



FIGURA 1 – Laboratório de Reprodução Animal localizado no centro de ciências agrária, Campus de Araguaína-TO – Universidade Federal do Norte do Tocantins
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

Está localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) na BR-153, S/N, Km 112, na zona rural de Araguaína- TO, CEP 77804-970 (FIGURA 2), disponível no endereço eletrônico <https://pnipe.mcti.gov.br/laboratory/20397>.O horário de funcionamento é de segunda-feira a sexta-feira, das 8h às 18h, sob a coordenação da Prof^o Dr^a Ana Kelen Felipe Lima.

O Laboratório de Reprodução Animal atua na área de animais de pequeno e grande porte, disponibilizando serviços como exame andrológico, exame ginecológico e criopreservação de células. No momento, conta com a colaboração de uma mestranda e três alunos de Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), todos envolvidos no desenvolvimento de experimentos.

Para garantir a qualidade das análises e dos procedimentos realizados, o laboratório dispõe de uma infra-estrutura adequada, composta por diversos equipamentos essenciais para a pesquisa e experimentação. Assim sendo, os principais equipamentos estão descritos abaixo (Tabela 1), com suas respectivas funções e identificação nas figuras.

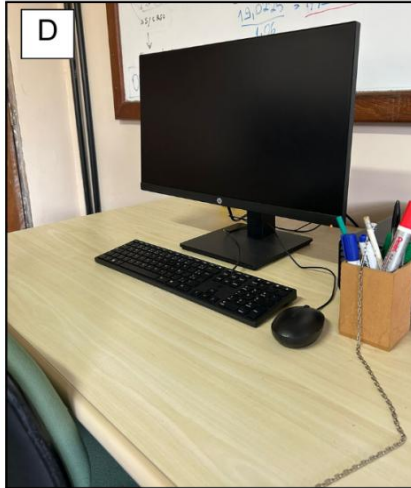
O Laboratório contribui significativamente para o avanço de pesquisas no desenvolvimento de atividades de pesquisa de alunos da iniciação científica e mestrandos além de local de aulas práticas de alunos da graduação proporcionando um ambiente adequado para o desenvolvimento de experimentos e atividades relacionadas Biotecnologias Aplicadas à Reprodução Animal.

Quadro 1 – Principais equipamentos disponíveis no laboratório de reprodução.

EQUIPAMENTO	FUNÇÃO	FIGURA
Banho-maria	Procedimentos com controle térmico preciso	Figura A
Botijão de nitrogênio	Criopreservação de células	Figura B
Capela de fluxo laminar	Garantir ambiente livre de contaminantes	Figura C
Computador	Pesquisas e registro de dados	Figura D
Freezer	Conservação de materiais biológicos	Figura E
Geladeira	Armazenamento de amostras biológicas	Figura F
Maca para laparoscopia	Contenção e posicionamento de pequenos ruminantes	Figura G
Manta térmica	Aquecimento de soluções ou amostras biológicas	Figura H
Microscópios e lupas	Observação de células e estruturas reprodutivas	Figura I
Eletrojaculador Bovino	Coleta de sêmem	Figura J



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.



Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

2.2 Atividades Realizadas

Durante o período de estágio no LARA- UFNT, foram desenvolvidas diversas atividades na área da reprodução animal, tais como coleta de ovário, vitrificação de tecido ovariano, organização e preparo de meio de conservação de folículo ovariano, avaliação de sêmen congelado, aspiração folicular, análise de lâminas de tecido ovariano e atividades acompanhadas a campo como diagnóstico de gestação e IATF (Quadro 2 e 3) .

Além das atividades desenvolvidas no laboratório, também foram exploradas atividades relacionadas à gestão, como controle de estoque e pedidos de materiais. Ademais, foram selecionados temas ligados à reprodução para revisão de literatura e discussão de artigos científicos sob a orientação da supervisora, o que contribuiu para o aprofundamento teórico e a compreensão crítica da área.

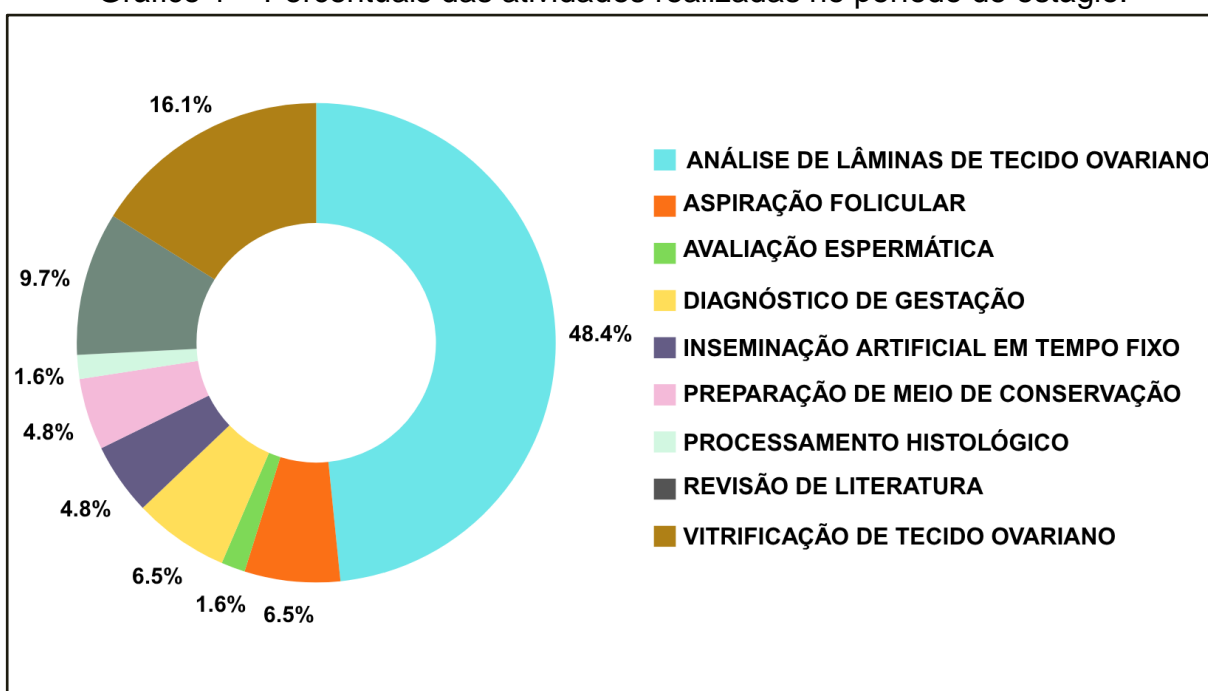
Quadro 2 – Atividades desenvolvidas na área da Reprodução durante o período de estágio.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	QUANTIDADE
Análise de lâminas de tecido ovariano	30
Aspiração Folicular	04
Avaliação Espermática	01
Diagnóstico de Gestação (acompanhamento á campo)	04
Inseminação Artificial em Tempo Fixo (acompanhamento á campo)	03
Preparação de Meio de Conservação	03
Processamento Histológico	01
Revisão de literatura	10
Vitrificação de Tecido Ovariano	10

Quadro 3 – Fazendas visitadas durante o período de estágio no estado do Pará.

FAZENDA	MUNICÍPIO	Nº DE VISITAS
Faz. Diamantina	Piçarra - PA	01
Faz. Santa Maria	Piçarra - PA	02
Faz. Trampolim	Piçarra - PA	01
Faz. Vitória	Piçarra - PA	01

Gráfico 1 – Percentuais das atividades realizadas no período de estágio.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

2.2.1 Criopreservação de Tecido Ovariano

O estágio oportunizou acompanhar as atividades desenvolvidas de um projeto de pesquisa de mestrado da orientada da supervisora e coordenadora do LARA. Foi possível acompanhar o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de tecido ovariano por vitrificação de ovário de cadela (FIGURA 3).

A perda ou redução da biodiversidade representa uma ameaça à estabilidade do ecossistema, de maneira especial em espécies em risco de extinção. Nesse contexto, a preservação da diversidade genética passou a ser uma estratégia essencial, que pode ser viabilizada através da criopreservação de tecidos gonadais (ALKALI et al., 2024).

Por essa razão, o cão doméstico tem sido amplamente utilizado como modelo experimental para estudos em reprodução, dada sua proximidade genética com caninos selvagens, desempenhando importante papel em pesquisas dedicadas à conservação de canídeos selvagens, como as conduzidas por instituições de referência em saúde e reprodução animal (CORNELLUNIVERSITY, 2024).

Entre as técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA), a fertilização *in vitro* (FIV), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), a criopreservação de gametas e tecidos gonadais torna-se uma alternativa promissora, com objetivo de superar os obstáculos da reprodução natural (STÁBILE et al., 2024).

A criopreservação de tecido ovariano associada ao cultivo *in vitro* (CIV) tem se tornado uma técnica inovadora, embora, ainda seja considerada experimental, apresenta um potencial extraordinário para a conservação da diversidade genética, com destaque para a criação de bancos de gametas destinados à preservação de espécies ameaçadas ou com interesse zootécnico relevante (ALKALI et al., 2024; MARTINS et al., 2018).

No trabalho de pesquisa acompanhado, foi executado o método de vitrificação. A seguir descrição das etapas dos procedimentos acompanhados durante o estágio.

Além de não formar cristais de gelo, a vitrificação apresenta outras vantagens, como baixo custo, a praticidade, não é necessário um freezer programável e rapidez, o processo completo pode ser realizado em minutos (VAN DEN HURK e SANTOS, 2009). A possibilidade de ser realizada em qualquer ambiente, inclusive em condições de campo, torna essa técnica promissora para programas de conservação de animais silvestres (COLOMBO et al., 2021). Portanto, o objetivo final da criopreservação ovariana é armazenar folículos competentes para o desenvolvimento.

2.2.2 Etapas da Vitrificação de Tecido Ovariano

Segundo Castro et al. (2011), vitrificação de tecido ovariano envolve etapas sequenciais, sendo elas:

- 1) Coleta do tecido ovariano e preparação dos fragmentos;
- 2) Exposição aos agentes crioprotetores (ACP), com o objetivo de permitir a difusão dessas substâncias nos compartimentos celulares;
- 3) Vitrificação propriamente dita, caracterizada pela queda abrupta de temperatura que evita a formação de cristais de gelo;
- 4) Armazenamento, que garante a conservação do material em temperaturas criogênicas por tempo indeterminado;
- 5) Aquecimento fase em que o material criopreservado é recuperado e ocorre a retomada das funções metabólicas celulares;
- 6) Remoção ou diluição dos agentes crioprotetores (ACPs), visando minimizar os efeitos tóxicos desses compostos, especialmente em condições de temperatura fisiológica.

As imagens a seguir (figuras 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11) mostram o protocolo de vitrificação de tecido ovariano em superfície sólida, com participação da estagiária no Laboratório de Reprodução da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT).

2.2.3 Coleta de Tecido Ovariano

A coleta dos ovários é a etapa inicial dos protocolos de criopreservação de tecido ovariano e deve ser realizada com máxima cautela, a fim de preservar a integridade morfofuncional do material biológico. Assim sendo, os ovários podem ser obtidos a partir de fêmeas submetidas à ovario-histerectomia eletiva.

No Laboratório de Reprodução da UFNT, os ovários utilizados eram obtidos na Clínica Veterinária da própria instituição, posteriormente, eram lavados com solução fisiológica de NaCl a 0,9% (Figura 4A) até que não restassem vestígios de sangue. Em seguida, com o auxílio de bisturi e placa de Petri, realizava-se a dissecação do ovário, removendo completamente a bolsa ovariana e tecido conjuntivo.



Figura 4 – Lavagem do tecido ovariano com solução fisiológica a 0,9% (A) e Corte frontal do ovário (B). Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

Após isso, uma incisão frontal (Figura 4B) era realizada no ovário removiam-se possíveis corpos lúteos (Figura 5A), uma vez que sua presença pode dificultar a avaliação microscópica do tecido ovariano pós vitrificação. O tecido resultante era então fragmentado em três porções de espessura uniforme (Figura 5B), com aproximadamente 3mm. Um fragmento foi destinado ao grupo controle, sem qualquer tratamento, no qual ficou armazenado em formol a 10%, um para o teste de exposição, submetido apenas aos crioprotetores, sem congelamento e um para o processo de vitrificação completo (Figura 6).

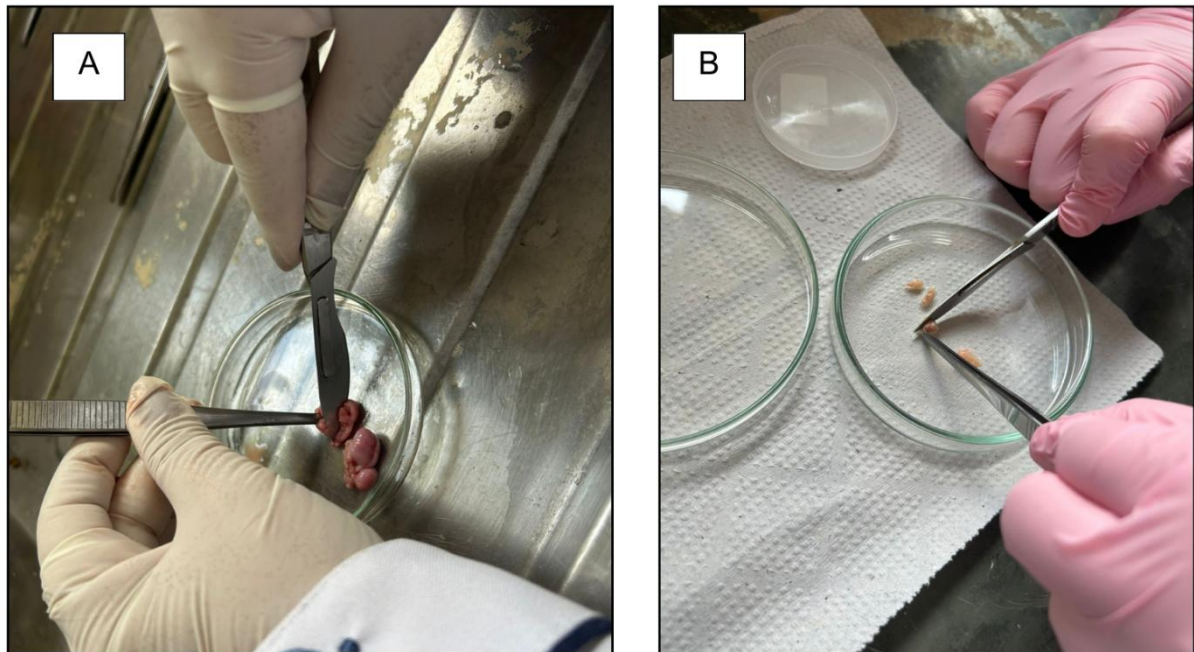


Figura 5 – Remoção do corpo lúteo (A) e Fragmentação do tecido (B).
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

O teste de exposição permite avaliar os efeitos tóxicos dos crioprotectores sobre a viabilidade dos folículos antes da criopreservação propriamente dita, este mesmo procedimento foi adotado por (BRITO et al. 2016) e (RODRIGUES et al. 2020).

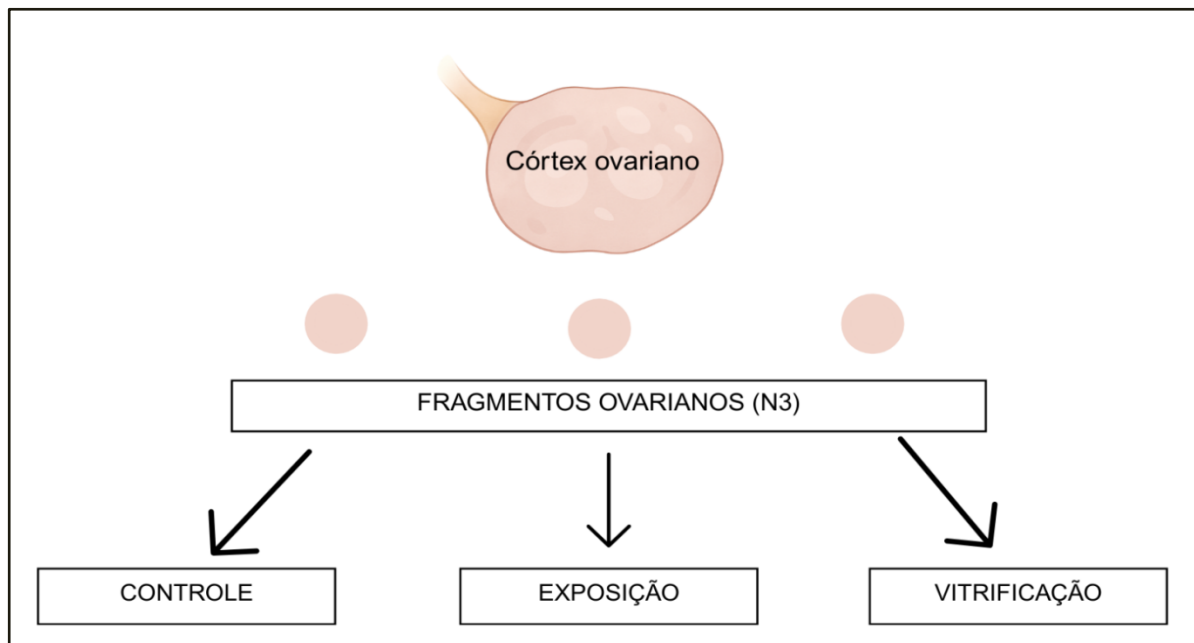


Figura 6 – Grupos experimentais.

2.2.4 Exposição aos Crioprotetores

Os agentes crioprotetores (ACPs) são compostos orgânicos que atuam protegendo a célula durante o armazenamento em temperaturas criogênicas, impedindo a formação de cristais de gelo dentro da célula e diminuindo os danos causados pela perda de água. Dessa maneira, de acordo com local que atuam esses agentes podem ser divididos em intracelulares e extracelulares (HAN et al., 2009).

Os crioprotetores intracelulares possuem baixo peso molecular, caracterizados por sua capacidade de atravessar a membrana plasmática e atuar no meio intracelular (RALL; REID; POLGE, 1984). Entre os principais representantes dessa classe, destacam-se o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o propanodiol (CASTRO et al., 2011).

Em contraste, os crioprotetores extracelulares, também conhecidos como não penetrantes (NPCPAs), permanecem fora da célula devido à sua alta massa molecular, e atuam formando uma barreira protetora que minimiza os efeitos da desidratação induzida pelo congelamento, prevenindo danos criogênicos como a lise hiperosmótica (KUSUMA et al., 2018). Dissacarídeo como a sacarose é amplamente utilizada como crioprotetor natural, sendo eficaz na estabilização celular durante a criopreservação (MOTTA et al., 2014).

Contudo, algumas desvantagens relacionadas à ação dos crioprotetores têm sido relatadas, como seu potencial tóxico em altas concentrações, o que limita as doses que podem ser utilizadas (VAN DEN HURK; SANTOS, 2009). Os metabólitos resultantes da degradação dos agentes crioprotetores pelas células podem ser tóxicos, constituindo um fator limitante para o sucesso de sua aplicação (CASTRO et al., 2011).

Nas rotinas de vitrificação, realizadas no Laboratório de Reprodução, foi preparada uma solução contendo crioprotetores, composta por dimetilsulfóxido (DMSO), propanodiol e sacarose. A concentração dos crioprotetores dimetilsulfóxido, propanodiol e etilenoglicol utilizada foi de 2,5 M, enquanto a sacarose foi utilizada na concentração de 0,3 M, objetivava-se analisar a morfologia e a viabilidade dos folículos pré-antrais após vitrificação e reaquecimento do tecido na solução.

Quadro 4 – Crioprotetores utilizados no processo de vitrificação, suas classificações e concentrações molares.

CRIOPROTETOR	CLASSIFICAÇÃO	MOLARIDADE
Dimetilsulfóxido	Intracelular - baixo peso molecular	2,5M
Propilenoglicol	Intracelular - baixo peso molecular	2,5M
Sacarose	Extracelular - alto peso molecular	0,3M



Figura 7 – Fragmentos ovarianos imersos na solução de criopreservação.
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

2.2.5 Vitrificação Propriamente Dita

As amostras foram então colocadas individualmente sobre uma superfície sólida de metal flutuando em nitrogênio líquido (LN_2), armazenado em uma caixa de isopor, realizando o processo de vitrificação. Depois, os fragmentos vitrificados foram transferidos com uma pinça resfriada para armazenamento em macrotubos contendo 1,8mL da solução de vitrificação (Figura 8).

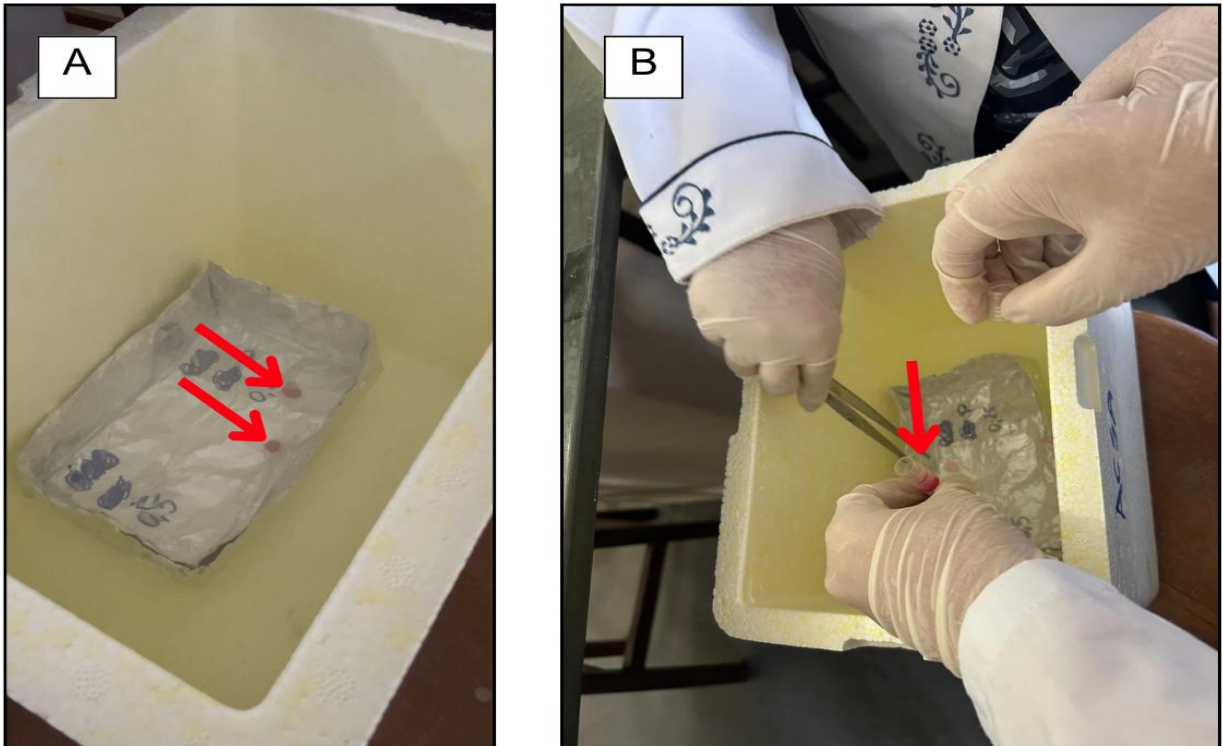


Figura 8 – Vitrificação dos fragmentos (A) e armazenamento do tecido ovariano em macrotubos (B).
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

2.2.6 Armazenamento

Os tecidos vitrificados foram mantidos em macrotubos, submersos em nitrogênio líquido (-196 °C), por período de 7 dias (Figura 9).

A criopreservação é uma técnica utilizada para armazenar material biológico por tempo indefinido em temperaturas extremamente baixas, permitindo que, após o descongelamento, o desenvolvimento celular continue normalmente (CASTRO et al., 2011).

Essa temperatura, chamada de criogênica, é alcançada com o uso de nitrogênio líquido (-196 °C) ou seu vapor, e tem a capacidade de suspender todas as atividades químicas e biológicas das células. Teoricamente, isso permite a preservação celular por tempo ilimitado. No entanto, para garantir a viabilidade do material, é indispensável o uso de agentes crioprotetores (ACPs) cuja concentração varia conforme o método adotado. (CASTRO et al., 2011).

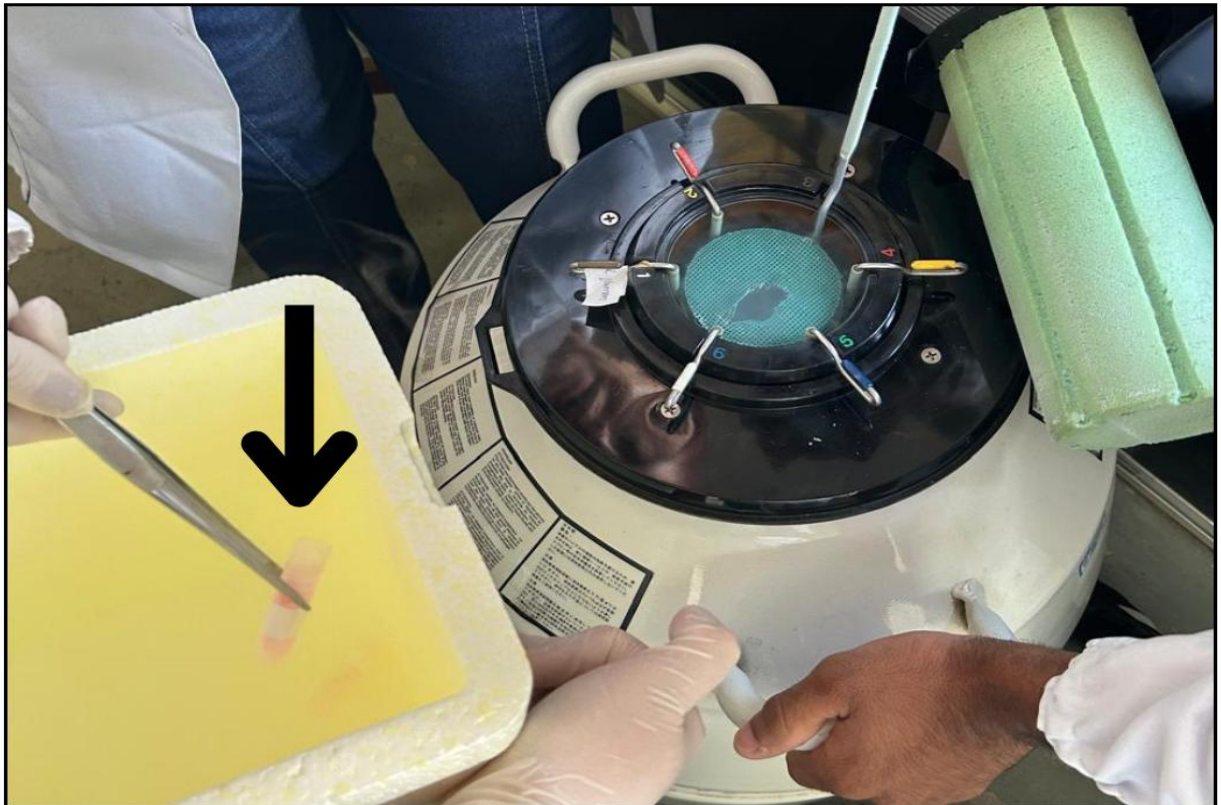


Figura 9 – Armazenamento em nitrogênio líquido
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

2.2.7 Aquecimento e Remoção do Crioprotetores

Após uma semana de estocagem, todos os fragmentos foram retirados do nitrogênio (LN_2) mantidos à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ C$) durante 1 min, e depois imerso em banho-maria a $37^\circ C$, até que a amostra esteja completamente descongelada ($\sim 1-2$ min). O crioprotetor foi removido dos fragmentos de córtex do ovário em três lavagens utilizando-se as soluções de vitrificação nas concentrações de 2,5M, 1,25M e por último Meio Essencial Mínimo puro (MEM), cada fragmento ficava por um período de 5 minutos em cada solução.

A remoção do crioprotetor é uma etapa crucial no processo de vitrificação, pois segundo Van den Hurk e Santos (2009) um bom crioprotetor não deve apenas proteger as células eficientemente durante a criopreservação, mas sua remoção das células também não deve prejudicar a viabilidade folicular e a capacidade de desenvolvimento.

Para descongelar os fragmentos ovarianos, estes são inicialmente deixados à temperatura ambiente por cerca de 1 minuto e, posteriormente, transferidos para um banho-maria a $37^\circ C$ até que estejam completamente descongelados. Após esse processo, realiza-se a retirada do crioprotetor, cada fragmento é lavado

individualmente em MEM, passando por três etapas de lavagem, com intervalos de 5 minutos entre elas (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2015).



Figura 10 – Reaquecimento de fragmentos ovarianos em banho-maria.
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

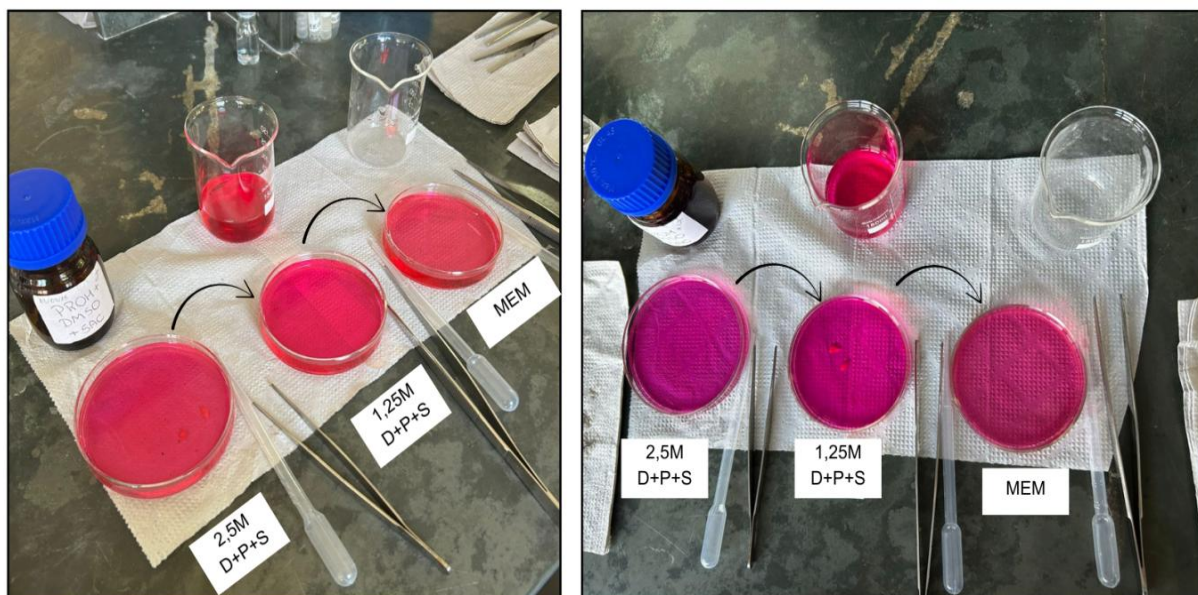


Figura 11 – Remoção dos crioprotetores em escala decrescente de concentração.
D (Dimetilsofóxido), P (Propanodiol), E (Etilenoglicol), S (Sacarose), MEM (Meio Essencial Mínimo).
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

Por fim, a Figura 12 apresenta o diagrama geral do processo de vitrificação, abrangendo todas as etapas, desde a coleta do tecido até a remoção dos crioprotetores.

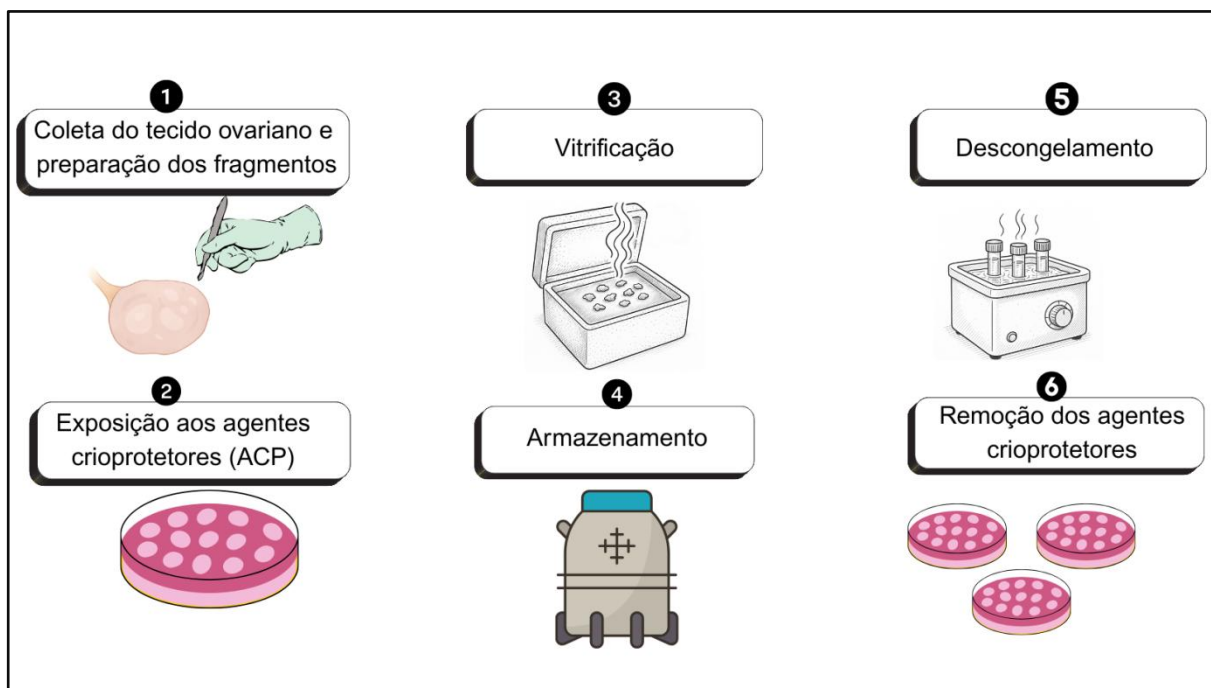


Figura 12 – Diagrama geral do processo de vitrificação.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025.

2.3 Análise histológica

Após o reaquecimento, os tecidos foram fixados e analisados por meio de histologia básica, na qual buscava-se avaliar a morfologia e a viabilidade dos folículos pré-antrais após vitrificação do tecido ovariano de cadelas e gatas.

Estudos histológicos podem ser utilizados para identificar sinais de atresia folicular, como a picnose nuclear, dano citoplasmático, descolamento de células da granulosa do oócito e alterações membrana basal. No entanto, a análise morfológica por si só é insuficiente para avaliar o processo de congelamento e descongelamento (Santos et al., 2006).

A técnica de histologia convencional, por ser acessível e de simples execução, é amplamente utilizada na avaliação da morfologia folicular. Trata-se de um método quantitativo que possibilita a análise de um grande número de folículos. No entanto, essa abordagem só permite a identificar os estágios mais avançados de atresia, caracterizados por alterações como picnose nuclear, lesões citoplasmáticas, desorganização das células da granulosa e comprometimento da membrana basal (FAUSTINO et al., 2011).

Neste sentido, a priori foi realizada apenas uma análise qualitativa dos folículos pré-antrais por meio da histologia clássica, visando à observação da integridade morfológica das estruturas foliculares após o processo de vitrificação. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e avaliadas em microscópio óptico, permitindo a identificação de possíveis alterações celulares, como retração do oócito, desorganização das células da granulosa ou sinais de degeneração. Essa abordagem inicial teve como objetivo fornecer subsídios para futuras análises quantitativas e imunohistoquímicas, a fim de aprofundar a compreensão dos efeitos da criopreservação na viabilidade folicular.

A classificação morfológica dos folículos pré-antrais em normais e degenerados foram determinados segundo Gonçalves, Figueiredo e Freitas (2002), no qual degenerados apresentam contornos irregulares, oócitos e células da granulosa de cor enegrecida, podendo estar descoladas da membrana basal, condensação da cromatina e retração do citoplasma do oócito. Por outro lado, os folículos normais, apresentam cromatina descondensada, citoplasma do oócito homogêneo e aderidos ao tecido conjuntivo ovariano.

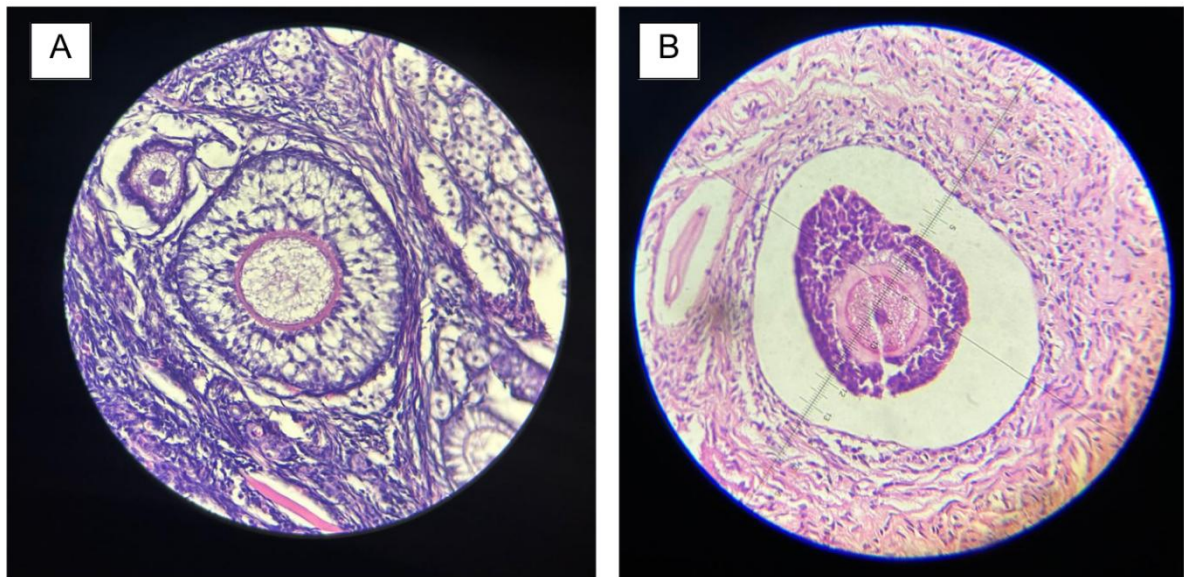


Figura 13 – Classificação folicular normal (A) e degenerado (B).
 Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

O que se observou é que, nas lâminas de grupo controle, a maioria dos folículos se apresentava morfologicamente normais (Figura 13). À medida que, lâminas dos grupos expostos e vitrificados foram analisadas, notou-se um aumento significativo do número de degenerados nos folículos vitrificados, quando comparados ao grupo controle (Figura 14, Figura 15, Figura 16).

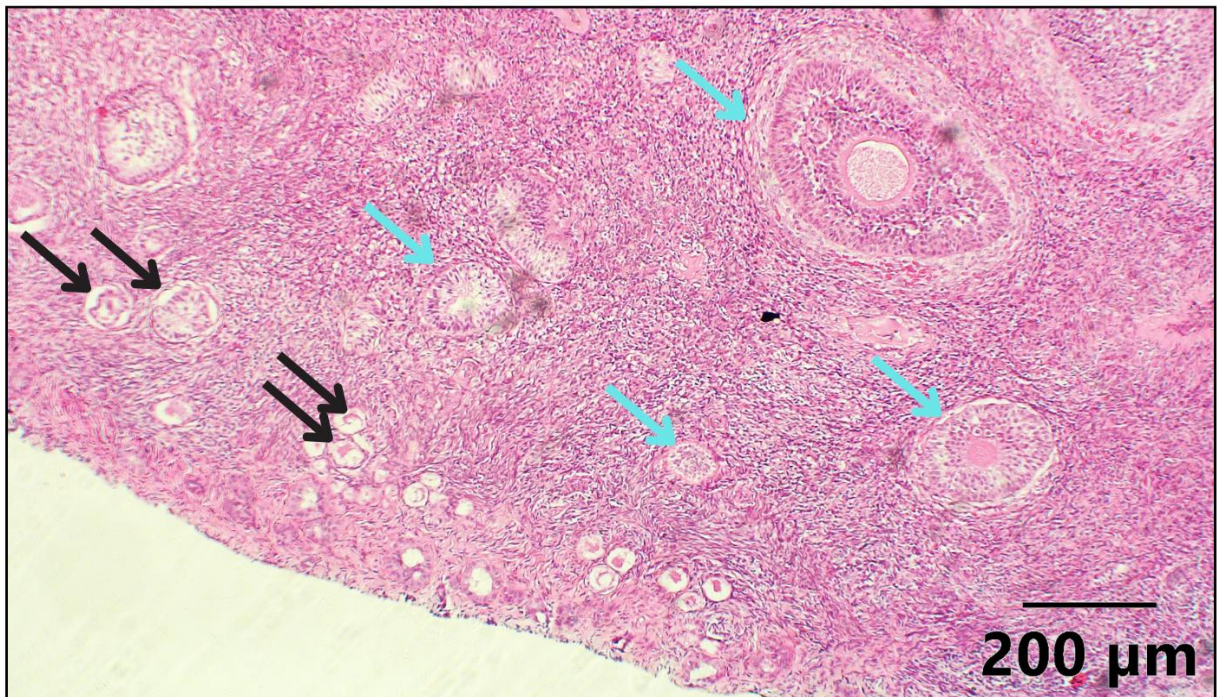


Figura 14 – Corte histológico de ovário de cadela do grupo controle corado com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 10x. Observam-se folículos ovarianos primários e secundários, predominando estruturas morfologicamente preservadas (seta azul). No entanto, quatro folículos primordiais (setas pretas) apresentam sinais de degeneração, caracterizados por descolamento do folículo ovariano do tecido conjuntivo. Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

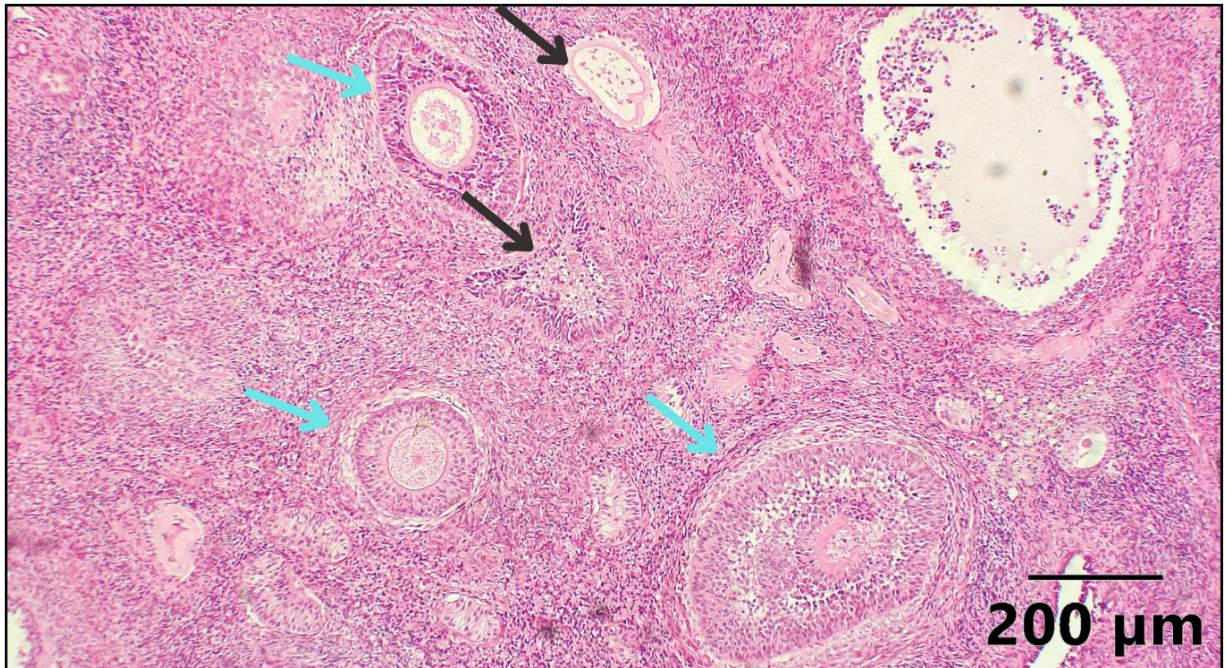


Figura 15 – Corte histológico de ovário de cadela grupo exposição corado com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 10x. Observam-se folículos ovarianos primários e secundários, predominando estruturas morfológicamente preservadas (seta azul) e em processo de degeneração (seta preta).
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

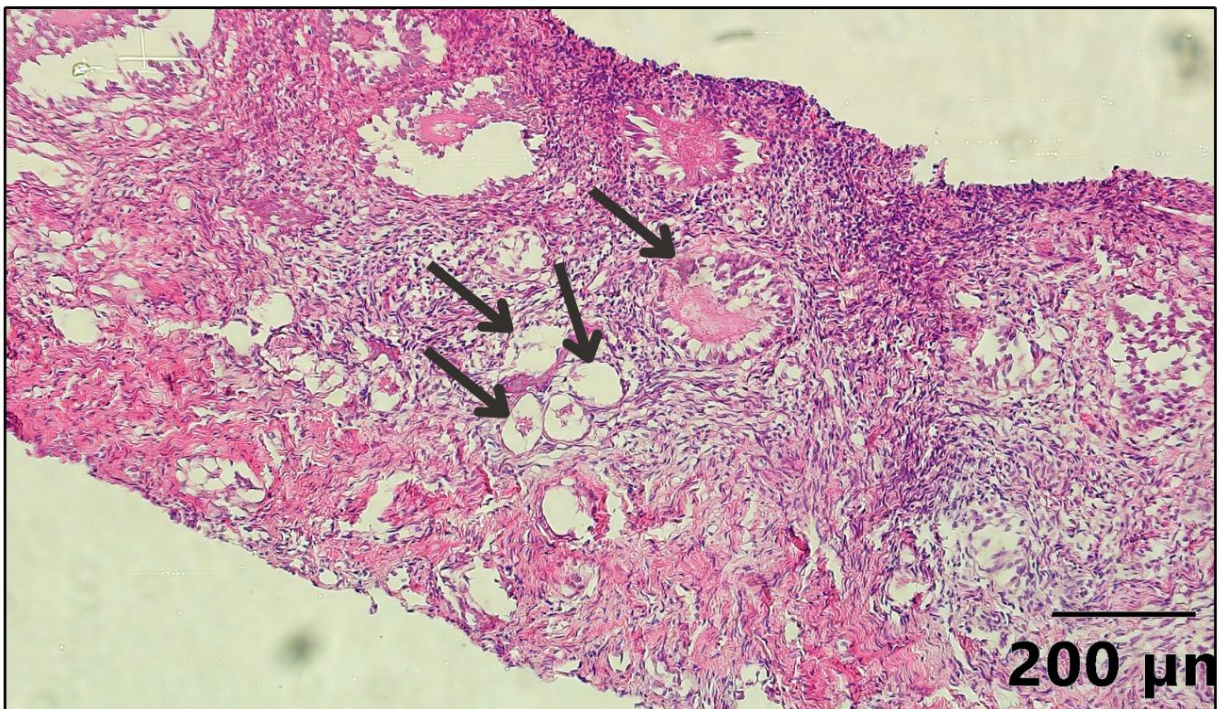


Figura 16 – Corte histológico de ovário de cadela grupo vitrificado corado com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 10x. Observam-se folículos ovarianos pré-antrais degenerados, com perda do oócito e invasão de tecido fibroso (seta preta).
Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

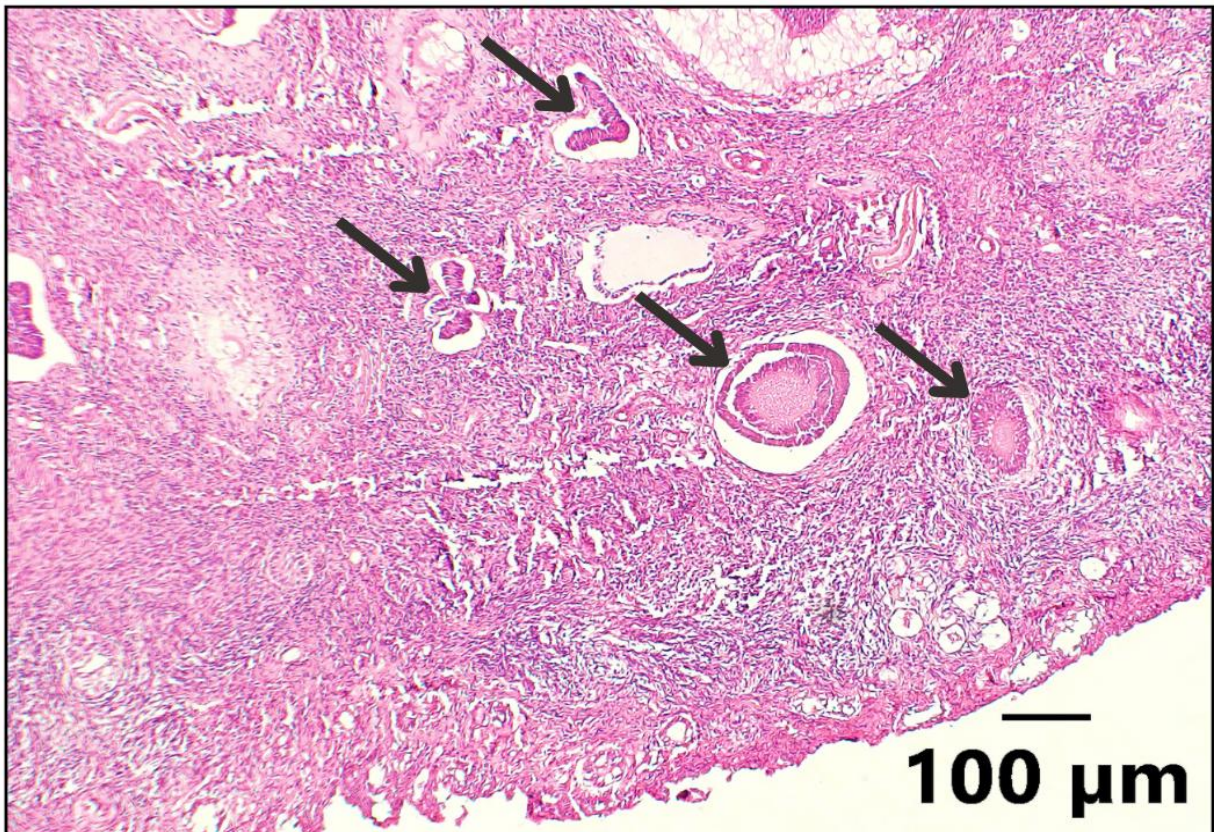


Figura 17 – Corte histológico de ovário de cadela grupo vitrificado corado com hematoxilina e eosina (HE), aumento de 10x. Observam-se folículos ovarianos pré-antrais predominando estruturas morfológicamente degeneradas, com principal característica descolamento do tecido conjuntivo (seta preta). Fonte: Arquivo pessoal, 2025.

Dentre as principais características indicativas de degeneração, destacou-se descolamento da membrana basal, granulosa enegrecida, retração nuclear. Estes achados sugerem que o protocolo de vitrificação pode ter induzido a danos estruturais que comprometeram a viabilidade folicular. Neste sentido, uma das principais sugestões para tal alteração seria a baixa concentração de crioprotetor utilizada 2,5M sendo um valor mais utilizado em processo de congelamento lento (LIMA, 2006).

Segundo Van den Hurk e Santos (2009), as amostras de tecido ovariano vitrificado são expostas a concentrações relativamente altas de crioprotetores variando de 4 a 6M. A baixa concentração de crioprotetor utilizada pode não ter sido suficiente para evitar a formação de cristal de gelo o que teria levado a ruptura das membranas.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de estágio no Laboratório de Reprodução – LARA, todos os objetivos e perspectivas foram plenamente atingidos, aprimorando conhecimentos e contribuindo muito para minha formação profissional. A vivência prática no laboratório proporcionou uma compreensão mais profunda sobre criopreservação e sua importância na área da reprodução animal, além de desenvolver habilidades técnicas, senso de responsabilidade e trabalho em equipe.

Durante o estágio pôde-se explorar conhecimento teóricos e práticos adquiridos durante a formação na área da reprodução, tendo em vista que é uma área crescente e de grande importância para o mercado de trabalho. Além de aprimorar habilidades técnicas, interpessoais e senso crítico para atuação com mais segurança na esfera profissional.

O estágio Curricular Supervisionado Obrigatório constitui-se uma importante etapa na formação acadêmica de um médico veterinário, é nesta fase da graduação que os conhecimentos adquiridos ao longo curso são aplicados na prática, permitindo o desenvolvimento de habilidades inerentes ao exercício da profissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKALI, I. M. et al. **Vitrification of feline ovarian tissue: comparison of protocols based on equilibration time and temperature.** *Theriogenology*, [S. l.], 2024.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.XX>. Acesso em: 20 maio 2025.

BRITO, Danielle Cristina Calado de. **Vitrificação de tecido ovariano de gata doméstica (*Felis catus*): um modelo para a preservação da fertilidade em felinos silvestres.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2016.

COLOMBO, Martina et al. **Ovary cold storage and shipment affect oocyte yield and cleavage rate of cat immature vitrified oocytes.** *Cryobiology*, [S.l.], v. 98, p. 181–186, 2021. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224021000302>. Acesso em: 28 maio 2025.

CORNELL UNIVERSITY. **Reproductive Biology** – Lisa Yang Center for Wildlife Health, 2024. Disponível em: <https://wildlife.cornell.edu/our-work/frontiers-conservation-tech/reproductive-biology>. Acesso em: 05 abr. 2025.

FAUSTINO, L. R. et al. **Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 35, n. 1, p. 3–15, jan./mar. 2011. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acesso em: 28 maio 2025.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotechnologia da Reprodução Animal.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2015.

HAN, Xu et al. **Measurement of the apparent diffusivity of ethylene glycol in mouse ovaries through rapid MRI and theoretical investigation of cryoprotectant perfusion procedures.** *Cryobiology*, [S.l.], v. 58, p. 298–302, 2009. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001122400900042X>. Acesso em: 28 maio 2025

KUSUMA, Gina D. et al. **To protect and to preserve: novel preservation strategies for extracellular vesicles.** *Frontiers in Pharmacology*, [S.l.], v. 9, art. 1199, 29 out.

2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01199. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01199/full>. Acesso em: 28 maio 2025.

LIMA, Ana Kelen Felipe. **Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

MARTINS, C. F. et al. **Vitrificação de oócitos e tecido ovariano: fundamentos e aplicações**. Archives of Veterinary Science, v. 23, n. 2, p. 45–54, 2018.

MOTTA, Juliana Pessanha Rodrigues et al. **Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood**. *Cryobiology*, [S.l.], v. 68, p. 343–348, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224014001036>. Acesso em: 28 maio 2025.

RALL, W. F.; REID, D. S.; POLGE, C. **Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods**. *Cryobiology*, [S.l.], v. 21, p. 106–121, 1984.

RODRIGUES, Samara Dias Cardoso. **Efeito do resveratrol associado à sacarose na vitrificação de tecido ovariano bovino**. 2020. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) – Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Araguaína, Araguaína, 2020.

SANTOS, R. R. et al. **Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol**. *Cell and Tissue Research*, v. 325, p. 523–531, 2006. DOI: 10.1007/s00441-006-0193-5.

STÁBILE, Nicole A. Luizari et al. **Cryopreservation of canine ovarian tissue by slow freezing and vitrification: Evaluation of follicular morphology and apoptosis rate**. *Theriogenology*, [S.l.], v. 230, p. 8–14, 2024. Disponível em: [https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(24\)00127-1/fulltext](https://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(24)00127-1/fulltext). Acesso em: 28 maio 2025.

VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. **Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants**. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 1, p. 72–95, jan./mar. 2009.

VIEIRA CASTRO, Simone et al. **Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos.** Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 39, n. 2, p. 1–17, 2011. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289022024002>. Acesso em: 18 maio 2025.