



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

LUCIA PRELLWITZ MURAD

Efeito da proteína anticongelante tipo I na
vitrificação de oócitos imaturos de gatas
domésticas

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense visando a obtenção do grau de
Mestre em Ciências e Biotecnologia

Orientadores: Joanna Maria Gonçalves Souza Fabjan
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
Ângelo José Burla Dias



Niterói
2022

LUCIA PRELLWITZ MURAD

**Efeito da proteína anticongelante tipo I na vitrificação de
oócitos imaturos de gatas domésticas**

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Reprodução Animal do Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense. Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências e Biotecnologia

**Orientadores: Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan
Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista
Ângelo José Burla Dias**

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

M972e Murad, Lucia Prellwitz
Efeito da proteína anticongelante tipo I na vitrificação
de oócitos imaturos de gatas domésticas / Lucia Prellwitz
Murad. - 2022.
58 f.

Orientador: Joana Maria Gonçalves de Souza Fabjan.
Coorientador: Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Instituto de Biologia, Niterói, 2022.

1. Criopreservação. 2. Biotecnologias reprodutivas. 3.
Felinos. 4. Produção intelectual. I. Fabjan, Joana Maria
Gonçalves de Souza, orientadora. II. Batista, Ribrio Ivan
Tavares Pereira, coorientador. III. Universidade Federal
Fluminense. Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

Bibliotecário responsável: Debora do Nascimento - CRB7/6368

LUCIA PRELLWITZ MURAD

**Efeito da proteína anticongelante tipo I na vitrificação de
oócitos imaturos de gatas domésticas**

Dissertação de Mestrado
submetida à Universidade
Federal Fluminense como
requisito parcial visando a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências e Biotecnologia

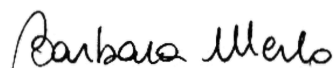
Banca Examinadora:



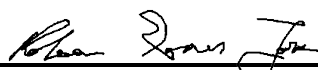
**Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan – Departamento de Patologia e
Clínica Veterinária – Universidade Federal Fluminense
(Orientadora/Presidente)**



**Alexsandra Fernandes Pereira – Departamento de Biociências –
Universidade Federal Rural do Semi-árido**



**Barbara Merlo – Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di
Bologna**



Robson Xavier Faria – Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tantas graças imerecidas, inclusive esta.

Ao meu marido José, cuja paciência supera os meus defeitos e generosidade transborda além de todas as minhas necessidades. Por todo carinho e parceria que foram fundamentais para chegar aonde estamos.

Ao meu pequeno Antônio, que tornou esta dissertação mais difícil, mas também mais frutuosa, e que preencheu todos os meus dias e noites de forma incomparável. Não sou a mesma, graças a Deus e ao Antônio.

Ao Lucas Correia, cujo nome merecia estar na capa desta dissertação. Por toda dedicação, por todo trabalho que assumiu como se fosse seu, por fazer tudo sempre alegre e sempre disposto aos maiores esforços. Foram incansáveis “obrigadas” e “de nada” trocados entre nós, mas não há obrigado que chegue a tudo que fez por este trabalho. Com a sua generosidade, a sua inteligência e sua dedicação, você certamente terá muito sucesso. À Gabriela, Thais, Nathalia e Mariana. Sem a grande generosidade de vocês, esta dissertação não existiria. Agradeço por todas as horas dedicadas, por toda mão de obra pesada que assumiram, por todo carinho e atenção com que sempre fizeram todos os favores que eu pedia à distância. Gostaria de poder estar presente no laboratório para retribuir ajudando nos seus trabalhos e aproveitando a alegria que é dividir a bancada com vocês. De todo coração, agradeço a vocês e a todos os estagiários e membros do laboratório que se prontificaram a ajudar tantas vezes.

À professora Joanna, que a todos dá uma chance, e não qualquer chance, mas uma chance de ouro. Quem a acompanha, não cessa de ganhar e aprender. Agradeço tudo que fez por mim nesses anos, toda compreensão que teve com a minha vida pessoal e todo o carinho que sempre demonstrou. É um grande exemplo de pesquisadora, e uma grande amiga. Ao professor Ribrio, meu coorientador, cuja genialidade excede muitas vezes nossa humilde compreensão. Muito obrigada por toda sua contribuição e ensinamentos. Agradeço ao professor Ângelo, que tão generosamente me acolheu durante meses em seu laboratório e ainda me adotou como coorientada, nunca impondo limites para me ajudar. Muito aprendi ao conviver com o senhor, e tenho grande admiração pela pessoa, pelo professor e pelo pesquisador que é.

A todos do GERAD pela parceria, amizade e carinho que sempre recebi.

Inclusive por todo carinho com o Antônio desde a barriga! É um grupo verdadeiramente especial.

À UFF, à CAPES e ao PPBI pelo apoio e conhecimento que recebi ao longo desses anos.

Ao Instituto Jorge Vaistman e ao CCPAD de Niterói pela doação dos ovários. Agradeço ao Dr. Marcio Coslovsky e à clínica Primordia pelo suporte material. À Graziela, Inês e Paloma pela ajuda e amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FELINOS SELVAGENS E DOMÉSTICOS	2
1.2 CONSERVAÇÃO ANIMAL	4
1.3 BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS	5
1.4 CRIOPRESERVAÇÃO	7
1.4.1 Crioprotetores	8
1.4.2 Métodos de criopreservação	9
1.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS	12
1.5.1 Danos estruturais provocados pela criopreservação	13
1.5.2 Indicadores de competência oocitária	15
1.5.3 Criopreservação de oócitos felinos	17
1.6 PROTEÍNAS ANTICONGELANTES	19
2. OBJETIVO GERAL	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.1.1 Qualidade morfológica após o aquecimento;	21
2.1.2 Integridade de actina após o aquecimento;	21
2.1.3 Atividade mitocondrial após o aquecimento;	21

2.1.4 Nível de EROs e GSH após o aquecimento;	21
2.1.5. Expressão de genes relacionados a competência oocitária e estresse celular após o aquecimento.	21
3. METODOLOGIA	22
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	22
3.2 RECUPERAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXOS <i>CUMULUS</i> -OÓCITOS	22
3.3 VITRIFICAÇÃO	23
3.4 AQUECIMENTO	23
3.5 QUALIDADE MORFOLÓGICA PÓS-AQUECIMENTO	24
3.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	24
3.6.1 Integridade de actina	24
3.6.2 Atividade mitocondrial	25
3.6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathiona (GSH)	25
3.7 EXPRESSÃO GÊNICA	26
3.7.1 Extração de RNA	26
3.7.2 Transcrição reversa	26
3.7.3 Amplificação	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
4.1 QUALIDADE MORFOLÓGICA PÓS-AQUECIMENTO	30
4.1.1 Integridade da actina	30
4.1.2 Atividade mitocondrial	31

4.1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathione (GSH)	32
4.2 EXPRESSÃO GÊNICA	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
6.1 CONCLUSÕES.....	43
6.2 PERSPECTIVAS	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7.1 OBRAS CITADAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACTB	<i>Beta-actin</i> (beta-actina)
AFP	<i>Antifreeze protein</i> (proteína anticongelante)
BSA	Soroalbumina bovina
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> (proteína morfogenética óssea)
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EG	Etilenoglicol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G0	Grupo 0 µg/mL
G0,5	Grupo 0,5 µg/mL
G1	Grupo 1 µg/mL
GDF	<i>Growth differentiation factor</i> (fator de crescimento e diferenciação)
GF	Grupo fresco
GSH	Glutathiona
h	Hora
HSP	<i>Heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
IBP	<i>Ice binding protein</i> (proteína ligadoras de gelo)
N ₂ L	Nitrogênio líquido
mm	Milímetro
M	Molar
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPS	<i>Open pulled straws</i> (palhetas esticadas e abertas)
pH	Potencial hidrogeniônico
PRDX	<i>Peroxiredoxin</i> (peroxiredoxina)
PBS	<i>Phospate-buffered saline</i> (solução salina tamponada fosfatada)
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
s	Segundos

SIRT	<i>Sirtuin</i> (sirtuina)
TCM-199	Meio de cultura de tecidos 199
VG	Vesícula germinativa
YWHAZ	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i> (proteína de ativação tirosina 3-monooxygenase 5-triptofano polipeptídeo zeta)
ZAR1	<i>Zygote arrest 1</i> (bloqueio zigótico 1)
ZP	Zona pelúcida

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Oócitos imaturos de gatas domésticas exibindo actina danificada (A, não corado) e padrão íntegro de actina (B, corado em azul) após incubação com <i>Alexa Fluor 350 Phalloidin</i>	25
Figura 2. Oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com ou sem AFP I, corados com <i>MitoTracker Green</i> para avaliação de nível de atividade mitocondrial.....	31
Figura 3: Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na intensidade de fluorescência/ μm^2 oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas corados com <i>MitoTracker Green</i> , indicando atividade mitocondrial.....	32
Figura 4. Oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com ou sem AFP I, corados com H2DCFDA (2',7'- 932 <i>dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>) e <i>CellTracker Blue</i> CMF2HC (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin) para mensuração de níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (verde) e glutathione (azul), respectivamente.....	33
Figura 5: Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na intensidade de fluorescência/ μm^2 oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas corados com H2DCFDA e <i>Cell Tracker Blue</i> CMF2HC, indicando níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathione (GSH), bem como a razão entre os dois valores.....	33
Figura 6: Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na expressão dos genes <i>HSP70</i> , <i>PRDX1</i> , <i>GDF9</i> , <i>ZAR1</i> , <i>BMP15</i> , <i>SIRT1</i> e <i>SIRT3</i> de oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de complexos-cumulus oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com e sem AFP I de cada grupo experimental utilizados em cada análise.....	22
---	----

Tabela 2. Sequências, tamanhos e referências dos <i>primers</i> utilizados para realização do PCR em tempo real dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos frescos e vitrificados com e sem AFP I de gatas domésticas.....	28
Tabela 3. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na qualidade morfológica de complexos <i>cumulus</i> -oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.....	30
Tabela 4. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na integridade de actina de oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.....	31

RESUMO

A criopreservação de gametas é essencial para utilização em biotecnologias reprodutivas, especialmente no contexto da conservação animal. Para minimizar os danos da criopreservação e melhorar a sobrevivência das células, crioprotetores como a proteína anticongelante (*antifreeze proteins*, AFP) devem ser utilizados. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito de diferentes concentrações de AFP I na solução de vitrificação de complexos-*cumulus*-oócitos (COCs) imaturos de gatas domésticas. Foram vitrificados 171 oócitos em solução de vitrificação contendo 15% etilenoglicol, 15% dimetilsulfóxido, 0,5 M sacarose e 20% soro fetal bovino, distribuídos aleatoriamente em três grupos: na presença de 0,0 (controle, G0, n=47), 0,5 (0,15 μ M, G0,5, n=50) e 1,0 (3 μ M, G1, n=50) μ g/mL de AFP I. No momento do aquecimento foram obtidos 61 oócitos frescos, para constituir um controle fresco (GF). Os oócitos foram então avaliados conforme sua qualidade morfológica e utilizados a fresco ou fixados para as análises de microscopia de fluorescência, ou congelados a seco para biologia molecular. Após 2:30 h do aquecimento, os grupos vitrificados com AFP (G0,5 e G1) apresentaram taxas de qualidade morfológica similares ao controle fresco (90%, 84,4% e 91,3%, respectivamente). O G0,5 e o G1 também apresentaram taxas de integridade de actina significativamente melhores (63,3% e 91,67%, respectivamente) do que o não suplementado (G0, 41,67%). Em comparação com GF, o grupo G1 apresentou menor alteração na expressão global dos genes avaliados (*GDF9*, *BMP15*, *PRDX1*, *SIRT1*), somente apresentando diminuição do *ZAR1* e *HSP70* e aumento da *SIRT3*. Os grupos G0 e G0,5 apresentaram expressão significativamente diminuída de todos os genes em relação ao GF, com exceção da *SIRT1* e 3 que não apresentaram diferença ($P>0,05$). No entanto, resultado oposto foi observado para atividade mitocondrial, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutatona (GSH). Para estas variáveis, os grupos G0 e G0,5 foram similares aos GF ($P>0,05$), enquanto o G1 teve menor atividade mitocondrial e maior níveis de EROS, quando comparados com os demais grupos (G0; G0,5 e GF). Em conclusão, a suplementação de AFP I (1,0 μ g/mL) na solução de vitrificação promoveu efeitos benéficos na morfologia, integridade de actina e padrão de expressão gênica nos COCs felinos, melhorando a vitrificação de oócitos, apesar de ter diminuído o metabolismo celular posterior, apresentando menores taxas de atividade mitocondrial.

Palavras-chave: criopreservação; biotecnologias reprodutivas; felinos.

ABSTRACT

Gamete cryopreservation is essential for reproductive biotechnologies, especially in the context of animal conservation. To minimize damage from cryopreservation and improve cell survival, cryoprotectants such as antifreeze proteins (AFP) can be employed. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of different concentrations of AFP I in the vitrification solution of immature cumulus-oocyte complexes (COCs) from domestic cats. Oocytes (n=171) were vitrified in a vitrification solution containing 15% ethylene glycol, 15% dimethyl sulfoxide, 0.5 M sucrose and 20% fetal bovine serum, randomly divided into three groups: in the presence of 0.0 (control, G0, n=47), 0.5 (0.15 μ M, G0.5, n=50) and 1.0 (3 μ M, G1, n=50) μ g/mL of type I AFP. At the time of warming, 61 fresh oocytes were obtained to constitute a fresh control (GF). The oocytes were then evaluated according to their morphological quality and used fresh or fixed for fluorescence microscopy analyses, or dry frozen for molecular biology. After 2:30 h of warming, the groups vitrified with AFP (G0.5 and G1) presented morphological quality rates similar to the fresh control (90%, 84.4% and 91.3%, respectively). Groups G0.5 and G1 also had significantly better rates of actin integrity (63.3% and 91.67%, respectively) than the non-supplemented group (G0, 41.67%). In comparison with GF, G1 showed a smaller change in the global expression of the evaluated genes (GDF9, BMP15, PRDX1, SIRT1), only showing a decrease in ZAR1 and HSP70 and an increase in SIRT3. Groups G0 and G0.5 showed significantly decreased expression of all genes in relation to GF, except for SIRT1 and 3, which showed no difference ($P>0.05$). However, an opposite result was observed for mitochondrial activity, reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH) levels. For these variables, groups G0 and G0.5 were similar to GF ($P>0.05$), while G1 had lower mitochondrial activity and higher levels of ROS when compared to the other groups (G0; G0.5 and GF). In conclusion, AFP I supplementation (1.0 μ g/mL) in the vitrification solution promoted beneficial effects on morphology, actin integrity and gene expression pattern in feline COCs, improving oocyte vitrification, despite having decreased posterior cell metabolism with lower rates of mitochondrial activity.

Keywords: *cryopreservation; reproductive biotechnologies; feline.*

1. INTRODUÇÃO

No contexto contemporâneo de extensos prejuízos humanos ao ecossistema, a atenção à conservação animal torna-se essencial. A conservação é uma forma de preservação de patrimônio genético e cultural. À medida que o homem gera dano ao seu ambiente, tem como dever buscar reparar e proteger aquilo de que ele mesmo usufrui. No Reino Animal, a família Felidae está presente em quase todo território mundial, e está em estado crítico de risco de extinção (IUCN, 2022).

As biotecnologias reprodutivas têm sido uma ferramenta útil para a conservação animal, devido à sua capacidade de preservar material genético utilizando métodos de criopreservação e facilitar a reprodução e multiplicação do número de espécimes, utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo*. A criopreservação permite o armazenamento seguro de tecidos e células reprodutivas em temperaturas extremamente baixas, garantindo sua disponibilidade para utilização póstera, por exemplo, na reprodução assistida a campo, como na inseminação artificial ou transferência de embrião; e na reprodução em nível laboratorial, como na produção *in vitro* de embriões (PIVE) e na clonagem.

No entanto, a criopreservação gera uma grave redução na qualidade dos tecidos e células, devido ao estresse causado principalmente pela formação de cristais de gelo, pelas baixas temperaturas e pelo estresse osmótico durante a desidratação e uso de crioprotetores (MAZUR, 2004; RAJAN E MATSUMURA, 2018). A vitrificação é uma das técnicas de criopreservação mais utilizadas atualmente devido à sua praticidade e eficiência, tendo em vista que evita a formação de cristais de gelo e é de fácil execução, apresentando bons resultados com tecidos, células e embriões (MASRAT-UN-NISA *et al.*, 2022). O gameta feminino, no entanto, é uma célula complexa de ser criopreservada, por ser uma célula única, de estrutura delicada e possuir zona pelúcida (ZP) e células do *cumulus* ao seu redor, dificultando a passagem dos crioprotetores.

A vitrificação tem como uma de suas consequências os danos às organelas. As mitocôndrias, responsáveis pela respiração celular, quando têm sua função inadequada, geram excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são acumuladas devido à ineficiência do sistema natural de defesa antioxidante em conseguirem combater as quantidades supra fisiológicas de EROs (TATONE *et*

al., 2010). Como consequência do estresse oxidativo, osmótico e térmico, ocorre uma diminuição dos fatores participantes do complexo desenvolvimento e maturação oocitária (AZARI *et al.*, 2016; SANFINS *et al.*, 2018). Além disso, o citoesqueleto é sensível às alterações de temperatura, pressão osmótica e pH, podendo ocorrer despolimerização da actina e tubulina, comprometendo a capacidade de distribuir adequadamente os cromossomos nas divisões meióticas (WU *et al.*, 2006).

Nesse sentido, o uso de substâncias que possam amenizar os danos inerentes ao processo, como por exemplo, as proteínas anticongelantes (*anti-freeze proteins*, AFPs), encontradas em seres que vivem em temperaturas glaciais, torna-se interessante. Elas possuem a propriedade de se ligar a cristais de gelo, promovem histerese térmica, inibem a recristalização e estabilizam as membranas biológicas (O'NEIL *et al.*, 1998; BAR-DOLEV *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2017; GRUNENBERG *et al.*, 2021). Ressalta-se que já foram demonstrados benefícios na utilização de AFPs na vitrificação de oócitos murinos e bovinos (JO *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2016).

Em gatas domésticas, a vitrificação de oócitos ainda resulta em taxas de maturação e desenvolvimento embrionário insatisfatórias, e não há um método ideal definido (COLOMBO E LUVONI, 2020). A vitrificação eficaz de oócitos de gatas, portanto, é um objetivo a ser alcançado visando a conservação das espécies felinas ameaçadas. Tendo em vista as vantagens promovidas pelo uso da AFP na vitrificação de oócitos de outras espécies e suas propriedades benéficas, acredita-se que o uso de AFPs na vitrificação de oócitos felinos pode aumentar a viabilidade destes gametas, diminuindo os prejuízos decorrentes do método. Portanto, o objetivo deste estudo é determinar o efeito de diferentes concentrações de AFP I na solução de vitrificação de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) imaturos de gatas domésticas.

1.1 FELINOS SELVAGENS E DOMÉSTICOS

Os felinos estão distribuídos por todos os continentes terrestres, com exceção da Antártica e da Oceania, habitando diferentes biomas, altitudes e climas. Essa extensa distribuição se reflete na diversidade de características morfológicas e comportamentais observadas nas espécies da mesma família.

Apesar da grande variedade de tamanhos (de pequenos gatos de 3 kg até grandes gatos de quase 300 kg) e de características físicas, todos são facilmente identificáveis como pertencentes à família Felidae. São ágeis, possuem excelente olfato, audição e visão e apresentam garras retráteis e feições características. É a segunda maior família de carnívoros, com atualmente oito linhagens e 41 espécies catalogadas, e tradicionalmente dividida em dois grupos (subfamílias): os grandes gatos (Pantherinae) e os pequenos gatos (Felinae) (KITCHENER *et al.*, 2017). Os grandes gatos possuem a estrutura da laringe diferenciada, o que os faz rugir e não ronronar como os pequenos gatos e os guepardos (HAST, 1989). Dentro da subfamília Pantherinae estão as diferentes espécies de grandes gatos mais conhecidos como tigres (*Panthera tigris*), onças (*Panthera onca*) e leões (*Panthera leo*). Já a subfamília Felinae possui sete linhagens diferentes, incluindo, entre outros, gêneros como do caracal (gênero *Caracal*), jaguatiricas (gênero *Leopardus*), lince (gênero *Lynx*), pumas (gênero *Puma*) e o próprio gato doméstico (gênero *Felis*).

Os gatos domésticos são descendentes próximos de outros felinos selvagens, tendo vestígios genéticos de pelo menos cinco espécies selvagens diferentes (DRISCOLL *et al.*, 2007). A sua domesticação começou no Oriente, na antiguidade, quando os gatos selvagens se aproximaram das produções agrícolas humanas para se alimentar das pragas e roedores, garantindo alimentação durante o ano inteiro (HU *et al.*, 2013). Ao contrário de outras espécies domésticas, a domesticação não foi um fruto de seleção artificial de características desejáveis, e sim um processo de seleção natural, e é considerada uma domesticação incompleta, já que por mais que os gatos tolerem a convivência humana, ainda há muitos que não dependem completamente do homem para se alimentar e sobreviver (DRISCOLL *et al.*, 2009). Atualmente, o gato é um dos animais de companhia mais frequentes nos centros urbanos, cativando a afeição de muitos humanos devido às suas características dóceis e ao mesmo tempo independentes, coabitando bem com o homem moderno. Similarmente, os gatos selvagens historicamente atraem o interesse humano, fazendo parte dos predadores mais conhecidos e admirados na natureza.

Os felinos, de modo geral, são considerados animais hipercarnívoros, por terem uma dieta quase exclusivamente carnívora e requerem maior porcentagem de proteína na dieta do que qualquer outro mamífero (MONTAGUE *et al.*, 2014).

Portanto, ocupando na maioria das vezes o lugar de predadores, garantem o controle populacional de espécies inferiores. Por estarem no topo da pirâmide alimentar, naturalmente existem em menor número de indivíduos nas diversas comunidades. No entanto, isso significa que são poucos animais necessários para influenciar o ecossistema inteiro e por isso possuem fundamental importância para equilíbrio estrutural de ecossistemas (GITTLEMAN E GOMPPER, 2005). Por isso, as ameaças aos felinos e demais carnívoros afetam a comunidade de maneira significativa.

Os animais selvagens de forma geral estão passando por um profundo processo de desgaste, e na família Felidae ao menos 18 espécies estão classificadas como vulneráveis ou em perigo de extinção (IUCN, 2022). As causas desse cenário preocupante estão relacionadas principalmente à degradação dos *habitats* naturais e às caças ilegais. Além disso, as ações antrópicas como desmatamento e construção de rodovias fragmentam as populações animais, o que diminui consideravelmente a troca dos alelos gênicos entre as populações e consequentemente a biodiversidade e a capacidade de adaptação e resistência das espécies (WILSON *et al.*, 2016). Tendo em vista este cenário, estratégias eficientes de conservação, bem como a criação de bancos de germoplasma e ferramentas biotecnológicas, são requisitos obrigatórios para implementar uma ação apropriada para a conservação da biodiversidade animal.

1.2 CONSERVAÇÃO ANIMAL

As estratégias de conservação animal podem ser realizadas *in situ*, ou seja, mantendo os animais em seu *habitat* natural, ou *ex situ*, isto é, fora do lugar de origem, como, por exemplo, em zoológicos. O método ideal de conservação é *in situ*, pois garante a proteção dos *habitats* de forma integrada e completa. No entanto, no contexto contemporâneo, é pouco prudente contar apenas com a conservação *in situ*, e muito se tem procurado fazer a conservação *ex situ* ser capaz de verdadeiras contribuições à conservação animal (KLEINMAN-RUIZ *et al.*, 2019).

A conservação *ex situ* emergiu como uma estratégia-chave para o planejamento da conservação da biodiversidade a longo prazo. A convenção sobre a diversidade biológica sugere a implementação da conservação *ex situ* de

forma complementar à conservação *in situ* nos programas de preservação (CBD, 1992). Neste sentido, a conservação *ex situ* contribui, não somente para educação da população sobre a biodiversidade e conservação, mas também permite a preservação do potencial genético e o estudo e conhecimento dos animais para embasar estratégias ativas de conservação *in situ*, bem como eventual reintrodução de animais na natureza (ABELL *et al.*, 2013).

Atualmente, uma das práticas mais eficientes da conservação é a criopreservação de sêmen, oócitos, embriões e tecidos (PIZZI *et al.*, 2013). Quando associadas às biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a PIVE e a transferência nuclear de células somáticas, desempenham um importante papel, não só na multiplicação dos animais, mas também na recuperação de espécies extintas. Dentre outras vantagens das biotecnologias reprodutivas, uma das mais interessantes é o fato destas permitirem aliar a conservação *ex situ* com a *in situ*, sem ser necessário transportar animais por longas distâncias (SWANSON *et al.*, 2006).

O primeiro passo para o sucesso das biotecnologias é conhecer a diversidade fisiológica das espécies. Nesse cenário, estudos experimentais são necessários antes de aplicar ativamente estas biotecnologias em cada espécie, especialmente naquelas ameaçadas e em perigo de extinção. Devido ao baixo número de animais selvagens disponíveis para estudos e rotinas experimentais, torna-se necessário utilizar um modelo animal mais acessível para fundamentar as bases das biotecnologias reprodutivas antes de colocá-las em prática. Por isso, a maioria dos avanços na reprodução de felinos é conquistada nos gatos domésticos, antes de serem aplicadas nos selvagens (JEWGENOW E ZAHMEL, 2020). Nesse sentido, o gato doméstico tem sido bastante explorado nas biotecnologias reprodutivas em função, ainda, de sua abundância populacional.

1.3 BIOTECNOLOGIAS REPRODUTIVAS

Dentre as biotecnologias reprodutivas mais utilizadas está a PIVE, ferramenta versátil e base para diversas outras tecnologias. A PIVE pode ser definida como um conjunto de procedimentos laboratoriais que mimetizam os eventos finais da foliculogênese e o desenvolvimento pré-implantacional em mamíferos. Em um ciclo folicular ovariano normal, são recrutados diversos

folículos que iniciam o seu crescimento e desenvolvimento, dos quais poucos chegam a ser ovulados, devido a mecanismos inibitórios e seletivos naturais. No entanto, com o uso da PIVE, o potencial ovariano é aumentado, visto que são obtidos oócitos de folículos que talvez não chegassem à etapa final da seleção folicular, mas que num sistema *in vitro* conseguem alcançar um determinado potencial e gerar embriões. Além disso, a PIVE é a base para diversas outras biotecnologias como a clonagem e a produção de animais transgênicos, bem como permite a realização de experimentos fundamentais para melhor compreensão do universo reprodutivo. A PIVE também possibilita a reprodução de animais pré-púberes ou senis, bem como animais mortos e com seus gametas ou tecidos gonadais criopreservados. Ela engloba quatro etapas cruciais: a recuperação e seleção de COCs, maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos imaturos, preparo do sêmen e fecundação *in vitro* (FIV) e o desenvolvimento *in vitro* dos presumíveis zigotos até o estágio de mórula ou blastocisto, quando normalmente são transferidos a uma receptora ou criopreservados (SIRARD E COENEN, 2006). Os COCs usados na PIVE podem ser obtidos a partir de animais vivos (por meio de cirurgias laparoscópicas) ou do ovário de animais que recém vieram a óbito ou foram castrados (NEGLIA *et al.*, 2003).

No laboratório, os COCs removidos do ambiente ovariano são selecionados morfológicamente, sendo considerados COCs de boa qualidade de grau I e II, isto é, com citoplasma escuro, homogêneo e com cinco (grau I) ou menos (grau II) camadas compactas de células do *cumulus* (WOOD E WILDT, 1997). Em seguida, são cultivados em meio de cultivo apropriado, em temperatura e atmosfera ideais para promover a etapa de MIV, procurando mimetizar o ambiente *in vivo*. A maturação oocitária pode ser dividida em a) maturação nuclear que é a retomada da meiose, interrompida em prófase I, até a etapa de metáfase II (MII), culminando na extrusão do primeiro corpúsculo polar; b) maturação citoplasmática na qual ocorre redistribuição das organelas, reorganização e movimentação do citoesqueleto; e c) maturação molecular, que é a produção de transcritos e proteínas que serão armazenados no citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2009). A MIV é uma etapa crucial da PIVE, pois o oócito é a peça-chave para o sucesso da mesma. O processo de maturação oocitária, além de preparar o oócito para a fertilização, é essencial para o desenvolvimento do futuro embrião, pois o material genético zigótico permanece quiescente durante o

início da vida embrionária, sem expressão gênica, e quem sustenta o início do desenvolvimento são os transcritos e proteínas de origem materna até a ativação do genoma embrionário (FERREIRA *et al.*, 2009).

Para a FIV, o oócito maturado é submetido ao cocultivo com espermatozoides previamente capacitados ou à injeção intracitoplasmática de espermatozoide, seguida de ativação oocitária. Após a FIV, os presumíveis zigotos são cultivados, período no qual sofrem clivagens sucessivas, até se tornarem mórulas e blastocistos. Estes podem ser empregados em diversas outras biotecnologias, serem transferidos a receptoras capazes de gestar este embrião até seu completo desenvolvimento ou serem criopreservados.

1.4 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação é a preservação de material biológico em temperaturas muito baixas. Quando devidamente armazenadas em nitrogênio líquido (N₂L) (-196 °C) ocorre a suspensão temporária de todas as atividades biológicas de células ou tecidos, sem comprometimento da viabilidade e competências fisiológicas para uso futuro (LEUNG, 1991; LEIBO E SONGSASSEN, 2002). Nessa temperatura, a viabilidade celular só é afetada pela radiação, que em nível normal levará aproximadamente 2.000 anos para se tornar nocivo para as células armazenadas (GLENISTER *et al.*, 1984). A criopreservação tem contribuído significativamente para otimização de biotécnicas reprodutivas. Com os bancos de germoplasma (gametas, embriões e células somáticas) à disposição, a rotina experimental e a execução de biotecnologias reprodutivas se tornam mais fáceis. Além disso, permite a conservação de material genético de animais em vias de extinção e evita o transporte de animais por longas distâncias, diminuindo os danos e perdas de animais no transporte, ao possibilitar o transporte de gametas, embriões ou tecidos para locais diversos, inclusive aumentando a diversidade genética (COMIZZOLI, 2018).

Porém, a criopreservação apresenta desvantagem de ainda causar uma considerável redução na qualidade dos tecidos e células, principalmente pela formação de cristais de gelo, choque pela exposição das células às baixas temperaturas e aos crioprotetores, além do estresse osmótico. Segundo Mazur (1963), para evitar a morte celular durante a criopreservação por cristalização é

necessário que as células se desidratem durante o resfriamento, para prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares, que causam danos mecânicos letais às células. Além disso, a recristalização, que ocorre durante o descongelamento e aquecimento das amostras criopreservadas também podem contribuir com a formação de cristais de gelo (SEKI E MAZUR, 2008).

1.4.1 Crioprotetores

No intuito de impedir estes processos nocivos e minimizar as crioinjúrias, são utilizados crioprotetores durante a criopreservação. Os crioprotetores são compostos que, quando adicionados aos meios de criopreservação, protegem as células e tecidos de crioinjúrias e aumentam as taxas de viabilidade pós-descongelamento (RAJAN E MATSUMURA, 2018). Estes são classificados com base na capacidade de penetração na célula em penetrantes e não-penetrantes. No entanto, são compostos que possuem citotoxicidade, especialmente em altas concentrações. Durante o equilíbrio com os crioprotetores, a célula sofre grandes variações de volume celular devido ao grande fluxo osmótico intra e extracelular e este “encolhimento”, bem como o aumento de volume quando a célula retorna a condições isotônicas, pode levar a rupturas e outros danos celulares especialmente na membrana plasmática. Por isso, a exposição da amostra aos crioprotetores costuma ser feita gradualmente, em concentrações progressivas e com o mínimo necessário de concentração e tempo de exposição.

Dentre os crioprotetores penetrantes mais utilizados estão o etilenoglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, butanodiol e propanodiol. Estes atravessam as membranas celulares e possuem propriedades coligativas e ligantes com a água, reduzindo o seu ponto crioscópico intracelular (HOLT, 2000), e prevenindo assim a formação de gelo e dando mais tempo para ocorrer a desidratação da célula antes da cristalização (SHAW E JONES, 2003). Além disso, estabilizam proteínas intracelulares e diminuem o impacto de eletrólitos intra e extracelulares (IUSSIG *et al.*, 2019).

Os crioprotetores não-penetrantes, no geral menos citotóxicos, são moléculas maiores como os açúcares (sacarose, lactose, trealose, manitol), albumina e polímeros de alto peso molecular. Atuam por mecanismo osmótico, controlando o processo de desidratação e reidratação e evitando a formação de

grandes cristais de gelo no interior das células (NIEMANN, 1991). Os crioprotetores aumentam a viscosidade do meio, facilitando a entrada no estado vítreo bem como estabilizando a membrana plasmática também por ligações de hidrogênio (YONG *et al.*, 2020) e criando um gradiente osmótico para induzir a entrada e saída de água na célula (IUSSIG *et al.*, 2019). Além do papel no equilíbrio osmótico, os crioprotetores não-penetrantes também possibilitam a diminuição da quantidade de crioprotetores penetrantes, que normalmente são mais tóxicos se comparados com os não-penetrantes. Assim, a associação dos dois tipos de crioprotetores permite menor citotoxicidade da solução de criopreservação (CHANG E ZAO, 2021).

1.4.2 Métodos de criopreservação

Um dos principais métodos de criopreservação é a congelação lenta (ou convencional), que envolve taxas de resfriamento graduais, em torno de 0,5 °C/min, a depender do tamanho e permeabilidade celular. Para garantir essa curva gradual e controlada, o método requer o uso de aparelhos de resfriamento e um período relativamente longo entre a exposição das células aos crioprotetores e o armazenamento da amostra no N₂L (cerca de 2 h). Apesar de requerer concentrações relativamente baixas de crioprotetores, este método está fortemente associado à formação de cristais de gelo durante o congelamento.

Normalmente, a exposição das células a uma solução contendo crioprotetores causa a difusão inicial de água do interior da célula para o meio extracelular até o equilíbrio das pressões osmóticas intra e extracelular. Concomitantemente a essa difusão, também ocorre a difusão dos crioprotetores que se encontram em maior concentração no meio extracelular para o meio intracelular (PEGG, 2007). Assim, o sucesso do congelamento de qualquer célula depende do controle do processo de desidratação e da formação de cristais de gelo. Esses aspectos são controlados pela taxa de resfriamento que varia de acordo com o tipo e tamanho da célula, espécie e a permeabilidade da membrana (DENNISON *et al.*, 2000; MAZUR, 2004; PEGG, 2015).

Para superar essas limitações associadas aos efeitos da solução e formação de cristais de gelo durante a congelação lenta, o método de vitrificação tem sido amplamente utilizado para criopreservação de células e tecidos (PEGG, 2015). A

vitrificação utiliza alta concentração de crioprotetores e queda brusca/rápida na temperatura ($> 25000^{\circ}\text{C/min}$), para preservar as amostras. Desta forma, o líquido presente na célula ou tecido é convertido em um sólido amorfo semelhante a vidro (vítreo), sem a cristalização, prevenindo, assim, as células dos efeitos deletérios dos cristais de gelo. Isso é possível utilizando alta concentração de crioprotetores, curva de resfriamento ultra-rápida, e baixo volume de solução (ARAV E NATAN, 2019). Porém, a adoção de altas concentrações de crioprotetores pode causar lesões de toxicidade nas células (SARAGUSTY E ARAV, 2011).

Por ser mais simples, rápida e não precisar de equipamentos, a vitrificação é considerada mais acessível e de fácil execução a campo, o que é a realidade muitas vezes da conservação animal (SANTOS *et al.*, 2010). Normalmente, a vitrificação envolve uma primeira etapa de exposição da amostra à solução de equilíbrio, contendo crioprotetores, e posterior exposição à solução de vitrificação, contendo maior concentração de crioprotetores. Dentro de pouco tempo (até 1 min) de exposição a solução de vitrificação, a amostra deve ser transferida para um dispositivo de vitrificação em pequeno volume (até 1 μL) e mergulhado em N_2L (DE MUNCK E VAJTA, 2017). O aquecimento de amostras vitrificadas é feito de maneira rápida, submergindo o dispositivo em solução de aquecimento contendo crioprotetores não-penetrantes, para evitar o choque osmótico e a recristalização. Posteriormente, a amostra é lavada em concentrações decrescentes de crioprotetores não-penetrantes no intuito de remover os crioprotetores da vitrificação.

Na vitrificação, quanto menor a concentração de crioprotetores, maior deve ser a taxa de resfriamento (e vice-versa) (VAJTA *et al.*, 2015). Como os crioprotetores podem ser tóxicos em altas concentrações, o ideal é utilizar as mais baixas concentrações possíveis e promover taxa de resfriamento mais rápida. Nesse sentido, os dispositivos de vitrificação foram desenvolvidos à medida que o método foi se consolidando para facilitar as propriedades necessárias para uma vitrificação eficiente, isto é, servir de suporte físico às amostras biológicas enquanto permitem pouco volume e uma taxa de resfriamento ultra-rápida. Diversos dispositivos de vitrificação podem ser utilizados, existindo os abertos e os fechados. Os abertos possibilitam obter taxas de resfriamento aceleradas, porém têm a desvantagem de as amostras entrarem em contato direto com o N_2L , o que pode teoricamente transmitir patógenos. Os fechados, ao evitar o contato

com o N₂L, têm a desvantagem de diminuir a taxa de resfriamento, por diminuir a condutividade de calor entre agente resfriante (N₂L) e amostra, potencialmente prejudicando os resultados do método (VAJTA *et al.*, 2015). Dentre os dispositivos abertos estão as OPS (*open pulled straws*), os *loops* (Cryoloop), as fitas de polietileno (Cryotop e Cryoleaf) e as ponteiras (Miniflex). Atualmente, o dispositivo mais utilizado é o Cryotop, que é uma fita de 0,1 mm ligada a um cabo de plástico e pode ser protegida por um tubo de plástico que cobre a parte da fita para evitar danos mecânicos durante o armazenamento. Além de ser um dispositivo aberto, permite a utilização de volumes mínimos e está associado a boa eficiência e excelentes resultados na vitrificação de oócitos (ANTINORI *et al.*, 2007; MORATÓ *et al.*, 2008) e embriões (LIN *et al.*, 2010).

A criopreservação de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* é uma realidade na clínica humana, feita rotineiramente e com sucesso (RIENZI *et al.*, 2018), bem como em camundongos, especialmente na pesquisa experimental (TAKETSURU *et al.*, 2021). Em espécies animais de interesse pecuário como bovinos, suínos e ovinos também está bem estabelecida (ALMINANA E CUELLO, 2018). Em felinos, a criopreservação de embriões ainda obtém taxas menos eficientes que outras espécies, contudo, ambos os métodos de congelamento lento e vitrificação foram demonstradas ser aplicáveis aos embriões felinos (MOKROUSOVA *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a criopreservação de gametas é mais importante porque permite o armazenamento destas células em momentos diferentes, mesmo na ausência da possibilidade imediata de sua utilização, garantindo uma reserva de patrimônio genético disponível para uso posterior em condições favoráveis. A criopreservação de espermatozoides é feita principalmente com o método de congelamento lento, com resultados satisfatórios em bovinos (UGUR *et al.*, 2019) e humanos (TAO *et al.*, 2020), enquanto em outras espécies ainda precisam evoluir, como em felinos domésticos (LUVONI, 2006). Com relação ao gameta feminino, a vitrificação é o método de escolha para criopreservação de oócitos humanos (RIENZI *et al.*, 2017). Em bovinos e outros mamíferos, ambos os métodos apresentam suas limitações e vantagens, e a escolha ainda depende de outros fatores (MOGAS, 2019). Na maioria das espécies, no entanto, o método de vitrificação de oócitos ainda é um desafio. Diversas razões justificam os resultados pouco eficientes.

1.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE OÓCITOS

A vitrificação pode ser realizada em oócitos imaturos (recuperados diretamente dos folículos ovarianos) ou após a maturação, normalmente *in vitro*. O material genético no estado de vesícula germinativa (VG), em oócitos imaturos, é mais resistente ao processo de criopreservação, quando comparado ao material genético de oócitos no estágio de placa metafásica (LUVONI, 2012; LEE E COMIZZOLI, 2019). Como desvantagem, apresenta a maior dependência de células de *cumulus* para suas competências fisiológicas (KOPEIKA *et al.*, 2015). Além disso, no contexto da conservação animal, a vitrificação de oócitos imaturos pode ser realizada diretamente a campo, sem necessidade de um laboratório equipado para realização de MIV prévia.

Comparativamente aos espermatozoides e outros tipos celulares, os oócitos são mais sensíveis ao resfriamento e a lesões criogênicas. As razões para tais vulnerabilidades são principalmente seu grande tamanho, alto teor de água e lipídios, o que os tornam os sistemas biológicos mais desafiadores para serem congelados com sucesso. Oócitos têm baixa razão área:volume em comparação com os espermatozoides (0,05 e 4,3, respectivamente; GILMORE *et al.*, 1997) e possuem grande quantidade de água, necessitando assim de maior tempo para atingir o equilíbrio osmótico com os crioprotetores (FULLER E PAYNTER, 2004). Além disso, possuem as células do *cumulus* ao redor, que dificultam a troca de crioprotetores e água entre oócito e meio extracelular. Diferentemente de espermatozoides e outros tipos celulares que apenas têm a membrana plasmática circundando a célula, oócitos e embriões são circundados pela ZP, camada proteica que circunda a membrana plasmática, bem como apresentam uma estrutura intracelular delicada, com citoesqueleto sensível as baixas temperaturas. Além disso, a grande concentração lipídica na maioria das espécies animais, como a felina, também tem sido relacionada a uma possível maior dificuldade de criopreservação devido a alterações físicas sofridas pelos lipídios em temperaturas abaixo de zero e à formação de radicais livres (SEIDEL, 2006; PEREIRA E MARQUES, 2008), bem como afetando a dinâmica da desidratação celular (VISITIN *et al.*, 2002)

Uma das principais consequências dos danos observados em oócitos vitrificados é a diminuição da sua qualidade morfológica. Quando analisados sob

estereomicroscópio, oócitos vitrificados-aquecidos são muitas vezes heterogêneos, com extensa vacuolização, disformes e por vezes até com rupturas na ZP. Porém, mesmo em oócitos considerados viáveis em estereomicroscópio, ocorrem danos estruturais imperceptíveis, como, por exemplo, no citoesqueleto, na membrana plasmática e em junções intercelulares.

1.5.1 Danos estruturais provocados pela criopreservação

Os principais responsáveis pelos danos às células durante a criopreservação pelo congelamento lento são os cristais de gelo, que geram lesões criogênicas em estruturas celulares sensíveis. No caso da vitrificação, essas lesões estão mais relacionadas à recristalização e à alta concentração de crioprotetores, cuja toxicidade também pode afetar o funcionamento adequado de organelas e de processos fisiológicos celulares. A desidratação e o estresse osmótico do processo, da mesma maneira podem romper e lesar estruturas como a membrana plasmática e a ZP. As alterações de temperatura e pH podem desnaturar proteínas que são fundamentais para o bom funcionamento celular e ativar cascatas de estresse e até morte celular. Outro ponto é a própria diminuição da temperatura que pode levar a injúrias causadas pelas baixas temperaturas em estruturas sensíveis, como a membrana plasmática e o citoesqueleto (IUSSIG *et al.*, 2019). Esta sensibilidade da membrana tem sido associada à sua composição lipídica (ARAV E ZVI, 2008). Durante o resfriamento, a membrana fosfolipídica passa por uma fase de transição lipídica na qual os ácidos graxos se alteram entre o estado líquido e sólido, visto que nem todos têm a mesma temperatura de transição, interferindo com a função da membrana, levando a vazamento de íons e morte celular (SHAW E JONES, 2003; ARAV E ZVI, 2008).

O citoesqueleto, composto de microfilamentos, formados por polímeros de actina, de microtúbulos de alfa e beta tubulina e de filamentos intermediários, é uma das estruturas sensíveis às lesões criogênicas. O fuso meiótico de oócitos maturados, composto por microtúbulos, é sensível ao resfriamento, às alterações de pH, à pressão osmótica, ao estresse oxidativo, portanto a vitrificação pode gerar despolimerização da tubulina (AMBROSINI *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2006). Este dano pode gerar anormalidades cromossômicas, devido ao comprometimento da capacidade de extrusão do segundo corpúsculo polar ou

distribuição desigual de cromossomos, levando a casos de aneuploidias. Ao vitrificar oócitos imaturos, evitam-se os danos que seriam causados ao fuso meiótico sensível em estágio de MII. Porém, mesmo a vitrificação de oócitos em estado de VG pode causar danos a progressão meiótica que ainda não ocorreu e que também dependerá do citoesqueleto para formação do fuso, extrusão do corpúsculo polar e movimentação de organelas durante a maturação (WU *et al.*, 2006; LOPEZ *et al.*, 2021).

Assim como o citoesqueleto, a própria membrana plasmática é sensível a alterações de pH e osmolaridade. A vitrificação pode resultar em rupturas de membrana, bem como de ZP. Além disso, em algumas espécies, observa-se após a vitrificação o endurecimento precoce da ZP (MAVRIDES E MORROLL, 2005) e a modificação de sua configuração de carboidratos e estrutura proteica (RUSCIANO *et al.*, 2017). A vitrificação e a exposição aos crioprotetores pode induzir à exocitose prematura de grânulos corticais, que induzem ao endurecimento da ZP, evento fisiológico que ocorre após a fecundação para evitar a entrada de mais de um espermatozoide por oócito. Quando ocorre prematuramente, afeta a capacidade do oócito de ser fertilizado posteriormente, prejudicando as taxas de fertilização e clivagem na produção de embriões com oócitos vitrificados. No entanto, isso não tem sido observado na criopreservação de oócitos felinos, tendo em vista que a taxa de fertilização de oócitos vitrificados se mostrou semelhante a não vitrificados (COLOMBO *et al.*, 2020). Além disso, a vitrificação afeta as células do *cumulus*, provocando lise e danos, bem como interrompendo ligações entre oócito e *cumulus* (DIEZ *et al.*, 2005; BOGLIOLO *et al.*, 2007; LUCIANO *et al.*, 2009), o que ocorre normalmente durante a maturação, porém quando ocorre prematuramente em oócitos imaturos bloqueia a comunicação essencial para a retomada da meiose.

Dentre as organelas mais afetadas pelos danos da vitrificação estão as mitocôndrias, a grande provedora de energia celular, alteradas em distribuição, grau de agregação e atividade (YAN *et al.*, 2010; SOWINSKA *et al.*, 2017). O aumento do metabolismo oxidativo devido à disfunção mitocondrial gera aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (EROS), diminuem a quantidade de ATP celular e consomem glutathione (GSH) e enzimas antioxidantes. EROs são formados durante a respiração celular normal e são importantes para o funcionamento celular, tendo papel sinalizador em diversas cascatas. Porém,

quando há perda da homeostase do estado redox, isto é, desequilíbrio entre os níveis de EROS e as defesas antioxidantes das células, há estresse oxidativo (SOMFAI *et al.*, 2007). O estresse oxidativo pode causar a desnaturação de proteínas e lipídios celulares, bem como afetar o DNA celular, levando à necrose, apoptose e morte celular (TATONE *et al.*, 2010). Sendo assim, o uso de antioxidantes durante a vitrificação mostrou resultados favoráveis em várias espécies (SPRICIGO *et al.*, 2017; XIANG *et al.*, 2021; ZHUAN *et al.*, 2022).

1.5.2 Indicadores de competência oocitária

Além dos danos estruturais, a fragmentação de DNA e a ativação de cascatas apoptóticas fazem com que a vitrificação também possa resultar muitas vezes em morte celular (LIANG *et al.*, 2016; COLOMBO *et al.*, 2020). Por meio de certos marcadores celulares, é possível inferir o status do oócito em relação à sua capacidade de lidar com o estresse e se desenvolver adequadamente. Uma das maneiras de verificar esses marcadores é por meio da análise da expressão gênica por meio de PCR quantitativo (qPCR), que pode refletir a competência do oócito frente ao estresse e em relação ao seu potencial de desenvolvimento após a vitrificação (BARBERET *et al.*, 2020).

As células possuem sistemas antioxidantes capazes de combater o excesso de EROS, principalmente pela GSH e enzimas como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Dentre essas, as peroxiredoxinas (PRDX) exercem um papel significativo na defesa antioxidante, regulação metabólica e diferenciação celular, bem como foram demonstradas serem importantes para a maturação de oócitos de camundongos (HOFMANN *et al.*, 2002; JEON *et al.*, 2017). A vitrificação, ao alterar o *status* metabólico e oxidativo da célula, pode influenciar os níveis de PRDX1, como num estudo em embriões em que a vitrificação diminuiu a expressão gênica de PRDX1 em comparação com embriões frescos (SARAIVA *et al.*, 2018). Similarmente, as chaperonas *heat shock proteins* (HSPs) são importantes sinalizadoras de estresse celular, principalmente térmico. Elas atuam em diversos tipos celulares, prevenindo a desnaturação das proteínas (CHRISTIANS *et al.*, 2003). Na criopreservação, devido à grande flutuação térmica, o Hsp 70 kilodalton (HSP70) aumenta em grupos de oócitos vitrificados em comparação com frescos (SHAHEDI *et al.*,

2017).

As sirtuinas (SIRT) são uma família de proteínas nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD⁺)-dependentes com ação de desacetilase. Elas funcionam como um sensor do estado metabólico e oxidativo da célula (MICHAN E SINCLAIR, 2007). Utilizando proteínas como substrato, fazem modificações pós-traducionais e alteram sua função de acordo com o estado da célula, ativando cascatas de sinalização. O resveratrol, um poderoso antioxidante encontrado em diversos alimentos, especialmente em uvas, conhecidamente ativa, a SIRT1 e melhora a função mitocondrial. Também possuem papel na foliculogênese e na remodelação da cromatina durante todo o processo de maturação nuclear (TATONE *et al.*, 2018). A SIRT1 está relacionada a foliculogênese e à resposta transcricional ao estresse oxidativo. É uma desacetilase majoritariamente nuclear, e a sua inibição em camundongos gerou aumento de EROs, alteração do padrão da cromatina e da meiose (DI-EMIDIO *et al.*, 2014). A SIRT3 é uma desacetilase mitocondrial, atuando em enzimas mitocondriais para diminuir os danos à mesma e consequentemente os níveis de EROS, e parece ter papel importante na fertilização e desenvolvimento embrionário (TATONE *et al.*, 2015).

O desenvolvimento folicular e oocitário é um processo complexo, que depende da comunicação de diversos sinais e fatores entre o oócito e as células somáticas. A família do fator de crescimento transformador beta (do inglês *transformation growth factor beta*, TGF β) está intimamente relacionada a esse processo. Nessa família estão presentes o próprio TGF β , inibinas, ativinas, hormônio anti-mulleriano, fatores de crescimento e diferenciação (do inglês *growth differentiation factors*, GDF) e proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês *bone morphogenetic proteins*, BMPs). Dentre esses, se destacam o GDF9 e o BMP15. Ambos são ligados a proliferação celular, expressão de hormônios esteroides, expansão celular, maturação nuclear e citoplasmática, de maneira espécie-específica. São indicadores de qualidade do oócito e de competência para o desenvolvimento (SANFINS *et al.*, 2018). Em oócitos bovinos vitrificados, GDF9 e BMP15 diminuíram sua expressão em relação aos frescos (AZARI *et al.*, 2016).

O ZAR1 (do inglês *zygote arrest 1*) é um gene expresso em oócitos e é um fator materno importante para o embrião durante a transição materno-zigótica (WU *et al.*, 2003). No entanto, foi identificado que a ausência de ZAR1/2 também

afeta a competência oocitária à maturação, tendo função também no próprio oócito (RONG *et al.*, 2019). A vitrificação de oócitos murinos aumentou a expressão de ZAR1 (JO *et al.*, 2011). O uso de antioxidantes como a astaxantina restaurou a expressão de BMP15, ZAR1 e GDF9 em oócitos frescos e vitrificados de suínos (XIANG *et al.*, 2021). Em gatos, o GDF9 foi identificado em folículos primordiais e antrais, porém seu receptor foi encontrado apenas em folículos em desenvolvimento inicial, sugerindo um papel importante nesta etapa (BRISTOL E WOODRUFF, 2003). Porém, em outro estudo, sua influência na ativação folicular inicial foi insignificante (FUJIHARA *et al.*, 2014) e seu papel em folículos de estágio avançado e na maturação oocitária de felinos ainda não foi bem definido.

1.5.3 Criopreservação de oócitos felinos

Curiosamente, Luciano *et al.* (2009) verificaram maiores danos oocitários após vitrificação de oócitos felinos imaturos do que no congelamento lento, no que diz respeito a manutenção da viabilidade de junções *gap* entre oócito e *cumulus* e a taxas de maturação oocitária. Este estudo utilizou o método de OPS para a vitrificação, que já foi amplamente demonstrado na literatura ser inferior aos métodos mais modernos como o Cryotop (LIU *et al.*, 2008; MORATÓ *et al.*, 2008) e utilizou altas concentrações de crioprotetores. Como a vitrificação tem a grande vantagem de ser mais facilmente aplicável no contexto da conservação animal, pesquisadores têm focado na otimização da vitrificação de oócitos felinos, ainda deficiente, para permitir maiores possibilidades de sucesso (COLOMBO E LUVONI, 2020). Além disso, a vitrificação de oócitos em outras espécies resulta em melhores taxas do que o congelamento lento, tendo substituído o congelamento lento nos programas de reprodução assistida em humanos (RIENZI *et al.*, 2017) e em animais, como bovinos e camundongos (HOCHI *et al.*, 2021; YAGOUB *et al.*, 2022).

Mikolajewska *et al.* (2012) demonstraram que o estado meiótico antes da vitrificação não afetou a taxa de sobrevivência pós-aquecimento, nem a estabilidade dos microtúbulos e microfilamentos. No entanto, um estudo recente demonstrou que, apesar do estado meiótico antes da vitrificação não ter afetado as taxas de fertilização e de mórula, os oócitos imaturos vitrificados tiveram significativo prejuízo nos parâmetros necessários para injeção intracitoplasmática

de espermatozoide em comparação com os vitrificados maturados e os frescos (SOWINSKA *et al.*, 2020). O estudo não especificou quais parâmetros foram considerados, mas os parâmetros que podem contraindicar a realização da injeção são localização e formato alterados do fuso meiótico ou estado meiótico fora de MII; a morfologia, cor e granulação do citoplasma; tamanho e grânulos no espaço perivitelínico e defeitos na ZP, como rupturas e deformações (LASIENE *et al.*, 2011). Portanto, tendo em vista que é necessária uma estrutura laboratorial mínima para realizar a MIV, ou ser necessária estimulação hormonal nos animais para maturação *in vivo*, existe maior disponibilidade de oócitos imaturos (estado de VG) do que maturados (estado de MII), especialmente no contexto da conservação animal. Portanto, em felinos, torna-se imprescindível focar em minimizar os danos decorrentes da vitrificação de oócitos imaturos.

Já se obteve prenhez a partir de oócitos felinos imaturos vitrificados (THARASANIT *et al.*, 2011) e mesmo nascimento de filhotes a partir de oócitos maturados vitrificados (POPE *et al.*, 2012; GALIGUIS *et al.*, 2014). No entanto, a vitrificação de oócitos de gatas apresentam resultados extremamente baixos de maturação e desenvolvimento embrionário, por isso não há um padrão metodológico utilizado no ambiente da pesquisa (LUVONI E COLOMBO, 2020). Ainda há um longo caminho a ser percorrido para otimizar a vitrificação de oócitos felinos. Neste intuito, algumas estratégias para melhorar as taxas têm sido propostas como a utilização de diferentes protocolos (APPARICIO *et al.*, 2012; FERNANDEZ-GONZALES E JEWGENOW, 2016), técnicas prévias à vitrificação como a polarização mecânica de lipídios (GALIGUIS *et al.*, 2014) e a compactação prévia da VG (COMIZZOLI *et al.*, 2009), bem como o uso de novos dispositivos de vitrificação (NOWAK *et al.*, 2020). Outra estratégia tem sido a utilização de substâncias antes, durante ou após a vitrificação, com potencial de melhorar a capacidade de desenvolvimento do oócito, como a utilização de vesículas extracelulares foliculares (FERRAZ *et al.*, 2020), uso de inibidores de cascatas de apoptose (ARAYATHAM *et al.*, 2017; COLOMBO *et al.*, 2020) e adição de um peptídeo sintético visando o bloqueio de canais entre oócito e *cumulus* que podem ser abertos em situações de estresse como a vitrificação (SNOECK *et al.*, 2018). Uma alternativa para melhorar a criorresistência de oócitos felinos pode ser a utilização de proteínas anticongelantes (*antifreeze proteins*, AFPs).

1.6 PROTEÍNAS ANTICONGELANTES

As AFPs são encontradas em peixes, insetos, bactérias e outros seres que vivem em temperaturas glaciais. Existem quatro grupos principais de AFP: AFGP (glicoproteína), AFP I, AFP II e AFP III, que diferem por sua sequência de aminoácidos e estrutura proteica, o que faz com que cada tipo apresente domínios e afinidades específicas (JIA E DAVIES, 2002).

As AFPs foram descobertas na década de 60 e atraíram o interesse da comunidade científica por suas propriedades particulares. Elas possuem a propriedade de se ligar a cristais de gelo, fazendo parte de um grupo de proteínas chamadas *ice binding proteins* (IBPs). Com isto, são capazes de inibir seu crescimento e alterar sua morfologia (BAR-DOLEV *et al.*, 2012). Esta capacidade de se ligar aos cristais promove histerese térmica, isto é, cria um intervalo entre o ponto de fusão e de congelamento, diminuindo conseqüentemente a formação e o crescimento de cristais (KIM *et al.*, 2017). As AFPs também inibem a recristalização, que é a coalescência de pequenos cristais formando grandes cristais de gelo, que podem causar danos mecânicos, fenômeno muito comum durante o aquecimento (GRUNEBERG *et al.*, 2021). Além disso, interagem com membranas biológicas promovendo sua estabilização (O'NEIL *et al.*, 1998). O efeito da AFP está relacionado ao tipo e à concentração de AFP utilizada, sendo que em concentrações altas elas podem ser danosas, possivelmente por alterar a forma dos cristais de gelo (RAHMAN *et al.*, 2019). Essas propriedades despertaram o interesse de pesquisadores que, a partir de sua identificação e isolamento, passaram a aplicar essas propriedades em diversas funções, inclusive na criopreservação de células e tecidos, sendo utilizadas com sucesso na criopreservação de espermatozoides (CORREIA *et al.*, 2020) e embriões (IDETA *et al.*, 2015) de diferentes espécies. Em oócitos, especificamente vitrificados, já foi utilizada em suínos, murinos e bovinos (ARAV *et al.*, 1993; CHAVES *et al.*, 2014; WEN *et al.*, 2014). Além disso, tem sido explorado seu uso na indústria alimentícia, na aviação, nas estradas, entre outras diversas possibilidades de aproveitamento de suas propriedades.

Existem três grupos de IBPs: as proteínas nucleadoras de gelo (*ice-nucleating proteins*), as proteínas anticongelantes (AFPs) e as proteínas inibidoras da recristalização (*ice recrystallization inhibition proteins*). As duas

primeiras atuam em mecanismos opostos, já que as primeiras controlam diretamente a formação dos cristais e as segundas diminuem o ponto de congelamento do meio para evitar os mesmos. Já o terceiro grupo se diferenciam das AFPs por não possuírem atividade de histerese térmica significativa, mas ter capacidade de inibir a recristalização (GHARIB *et al.*, 2022).

O efeito benéfico da AFP na vitrificação está associado principalmente às propriedades como estabilização de membranas, proteção contra crioinjúrias e inibição da recristalização (WEN *et al.*, 2014). Em suínos, a adição de AFP teve efeito positivo na taxa de sobrevivência de oócitos vitrificados, o que foi relacionado à sua capacidade de estabilizar e proteger a membrana celular (ARAV *et al.*, 1993). Jo *et al.* (2012) verificaram que o uso de AFP III na vitrificação de oócitos murinos imaturos teve efeito positivo na formação do fuso e na integridade da membrana celular. Em outro estudo em murinos, a adição de crioprotetores foi feita em temperatura ambiente ou 2 a 4 °C e demonstrou que a exposição aos crioprotetores em temperaturas baixas melhorou a viabilidade pós vitrificação (O'NEIL *et al.*, 1998). O uso de AFP na vitrificação de oócitos modulou a expressão de genes, mantendo níveis semelhantes aos frescos principalmente de transcritos relacionados à montagem e manutenção do fuso meiótico, estrutura da ZP e alguns genes maternos, inclusive ZAR1 (JO *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2014). Wen *et al.* (2014) também demonstraram que a utilização de AFP na vitrificação de oócitos murinos promoveu a estabilização de microfilamentos, bem como a sobrevivência, fertilização e desenvolvimento embrionário. Em oócitos bovinos o uso da AFP resultou em diminuição de fatores apoptóticos, proteção ao citoesqueleto, distribuição normal de mitocôndrias e diminuiu a concentração de EROs (LIANG *et al.*, 2016). Na espécie felina, inibidores da recristalização derivados de gluconamida foram utilizados para criopreservação de tecidos gonadais e de oócitos (ROWLISON *et al.*, 2022), porém sem vantagens claras na sua utilização. O uso de AFPs não foi relatado na espécie felina até então.

Tendo em vista as vantagens promovidas pelo uso da AFP na vitrificação de oócitos de outras espécies, acredita-se que o uso de AFPs na vitrificação de oócitos felinos poderia ser vantajoso, diminuindo os danos estruturais decorrentes do método e assim, aumentando a viabilidade destes gametas.

2. OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito de diferentes concentrações de AFP I na vitrificação de COCs imaturos de gatas domésticas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de AFP I na solução de vitrificação de COCs imaturos de gatas domésticas na(o):

- 2.1.1** Qualidade morfológica após o aquecimento;
- 2.1.2** Integridade de actina após o aquecimento;
- 2.1.3** Atividade mitocondrial após o aquecimento;
- 2.1.4** Nível de EROs e GSH após o aquecimento;
- 2.1.5** Expressão de genes relacionados a competência oocitária e estresse celular após o aquecimento.

3. METODOLOGIA

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados COCs em três sessões provenientes de cerca de 18 ovários de gatas obtidos em campanhas de ovariosalpingohisterectomia. Foram distribuídos aleatoriamente 171 COCs grau I e II em três grupos e submetidos à vitrificação com 0 μ M (controle, G0), 0,15 μ M, (G0,5) ou 3,0 μ M (G1) de AFP I. No experimento I, foram vitrificados 45 COCs (n=15/grupo) e após aquecimento foram destinados a análises biomoleculares, junto com COCs frescos (GF). No experimento II, foram vitrificados 30 COCs por grupo e pós-aquecimento foram destinados às análises de atividade mitocondrial, níveis de EROs e GSH e integridade de actina. As mesmas análises foram realizadas em COCs frescos (n=61). O número de COCs utilizado para cada análise realizada está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Número de complexos-cumulus oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com e sem AFP I de cada grupo experimental utilizado em cada análise.

	Morfologia				Expressão gênica	Total
	Integridade de actina	Atividade mitocondrial	EROS/ GSH**	Total		
GF*	10	11	11	46	15	61
G0*	12	10	10	41	15	56
G0,5*	11	10	12	40	15	55
G1*	12	11	12	45	15	60

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 μ g/mL; G0,5: 0,5 μ g/mL; e G1: 1,0 μ g/mL de AFP I

** EROs: espécies reativas de oxigênio. GSH: glutathiona

3.2 RECUPERAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS

Ovários foram obtidos em diferentes campanhas de ovariosalpingohisterectomia eletiva e foram mantidos em solução salina a 4 °C durante o transporte por no máximo 4 h até a recuperação dos COCs

(WLODARCZYK *et al.*, 2009). Os ovários foram obtidos apenas de gatas após a puberdade (acima de oito meses), não-prenhes e saudáveis. Após chegada ao laboratório, os ovários foram lavados em solução salina e fatiados com auxílio de lâmina de bisturi, lavados novamente com solução tampão (*phosphate-buffered saline*, PBS) com 0,1% álcool polivinílico e 100 µg/mL de solução antibiótica/antimicótica, e o conteúdo recuperado em uma placa de Petri de 60 mm. Este conteúdo foi observado sob estereomicroscópio para localização e seleção dos COCs. Os COCs só foram utilizados nos experimentos quando apresentaram citoplasma escuro, homogêneo e no mínimo duas camadas de células do *cumulus*, classificados como grau I e II (WOOD E WILDT, 1997).

3.3 VITRIFICAÇÃO

Os COCs foram vitrificados pelo método Cryotop (Kitazato, Japão) segundo Colombo e Luvoni (2020). Grupos de dois oócitos foram equilibrados por 15 min numa solução de equilíbrio de TCM-199 contendo 7,5% EG e 7,5% DMSO com 20% de soro fetal bovino, contendo ou não AFP I (dependendo do grupo experimental). Depois foram transferidos para a solução de vitrificação, composta de TCM-199 contendo 15% EG, 15% DMSO e 0,5 M sacarose com 20% de soro fetal bovino, contendo ou não AFP I, e colocados sobre a fita do Cryotop num volume de 0,3 µL. Dentro de 90 s na solução de vitrificação, a fita foi imersa em N₂L.

3.4 AQUECIMENTO

Após no mínimo sete dias de armazenamento em N₂L, o dispositivo foi imerso na solução de aquecimento (TCM-199 contendo 1 M sacarose com 20% SFB), a 37 °C por 1 min. Os oócitos vitrificados foram recuperados deste meio e transferidos para uma solução de TCM-199 contendo 0,5 M de sacarose, com 20% de soro fetal bovino, a 37 °C por 3 min, e depois por 5 min na solução sem sacarose. Após este período, foram lavados na mesma solução final e incubados, na mesma solução a 38 °C, por 2:30 h, antes das posteriores análises. Os COCs frescos (não vitrificados) também foram incubados no mesmo processo.

3.5 QUALIDADE MORFOLÓGICA PÓS-AQUECIMENTO

Após o período de incubação, os COCs de cada grupo foram analisados morfolologicamente sob estereomicroscópio e classificados em graus (WOOD e WILDT, 1997). Os COCs apresentando citoplasma escuro, homogêneo e com camadas compactas de células do *cumulus* foram considerados como COCs de boa qualidade, considerados grau I e II. Os COCs com morfologia irregular, ruptura de ZP, sinais de degeneração citoplasmática e nas células do *cumulus* foram considerados anormais e foram descartados (APPARICCIO *et al.*, 2012). Todos os COCs aparentemente viáveis foram utilizados a fresco ou fixados para as análises de microscopia de fluorescência, ou congelados a seco para biologia molecular.

3.6 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Após o aquecimento, os COCs foram lavados em PBS com 0,1% de soroalbumina bovina (BSA), desnudos com auxílio de hialuronidase e incubados com as respectivas sondas de cada análise. As análises foram feitas sob microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci, Nikon 912 Corporation, Tokyo, JP). Imagens foram capturadas para posterior análise de intensidade de fluorescência pelo software *ZEN 3.6 Blue Edition 32* (ZEISS Microscopy, Alemanha). As imagens foram convertidas para escala de cinza e tiveram a intensidade ajustada subtraindo a média da intensidade, do fundo do resultado final. Cada oócito foi medido (área em μm^2) e teve sua média da intensidade calculada (*arbitrary units*, A.U.), obtendo a intensidade por área (A.U./ μm^2) (PASCHOAL *et al.*, 2017).

3.6.1 Integridade de actina

Os oócitos foram fixados em PBS com 0,1% BSA, 0,5% Triton X 100 e 2% de paraformaldeído por 30 min, a 38,5° C. Transcorrido este tempo, foram lavados e incubados com PBS com 0,1% BSA contendo *Alexa Fluor 350 Phalloidin* (Invitrogen, Waltham, MA, USA) por 20 min, a 38,5° C. Em seguida, foram colocados em lâmina coberta com lamínula e avaliados. Os oócitos foram classificados como intactos quando corados em azul (Figura 1) e danificados

quando não estavam corados (actina desfosforilada), sendo contabilizada a porcentagem de oócitos íntegros por grupo (LEAL *et al.*, 2020).

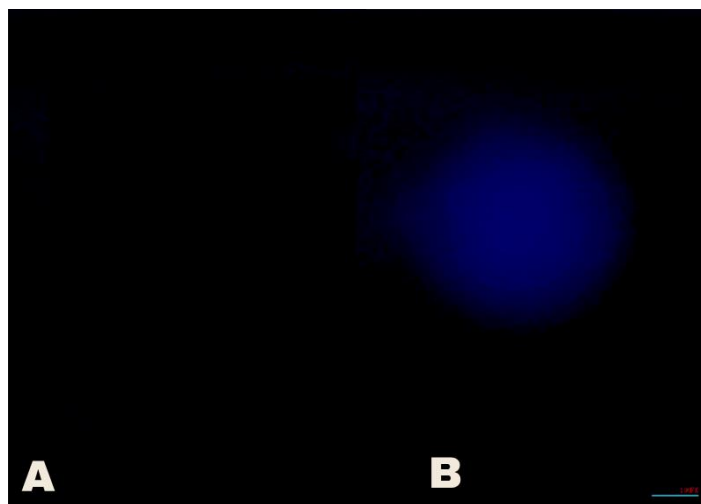


Figura 1. Oócitos imaturos de gatas domésticas exibindo actina danificada (A, não corado) e padrão íntegro de actina (B, corado em azul) após incubação com *Alexa Fluor 350 Phalloidin*.

*Objetiva de 10x.

3.6.2 Atividade mitocondrial

A análise da atividade mitocondrial foi adaptada de Gutnisky *et al.* (2020). Após o aquecimento, os oócitos foram incubados a 38,5 °C, por 30 min, com 0,5 nM de *MitoTracker Green FM* (Invitrogen, Waltham, MA, USA), em PBS com 0,1% BSA. Transcorrido este tempo, foram lavados e colocados entre lâmina e lamínula e avaliados no microscópio de epifluorescência conforme descrito anteriormente.

3.6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathiona (GSH)

Oócitos foram incubados em uma gota de 100 µL de PBS com 0,1% BSA contendo 10 µM de H2DCFDA (2',7'- 932 *dichlorodihydrofluorescein diacetate*; Invitrogen, Waltham, MA, USA) para detecção de EROs (verde), e 10 µM de *CellTracker Blue CMF2HC* (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin; Invitrogen, Waltham, MA, USA) para detecção de GSH (azul), por 30 min, a 38,5 °C, segundo Piras *et al.* (2018). Transcorrido o tempo, os oócitos foram lavados e colocados entre lâmina e lamínula para avaliação no microscópio de epifluorescência conforme descrito anteriormente (Figura 3).

3.7 EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes *HSP70*, *PRDX1*, *GDF9*, *ZAR1*, *BMP15*, *SIRT1* e *SIRT3* foi avaliada por meio de PCR quantitativa (qPCR) associada à transcrição reversa (BATISTA *et al.*, 2014).

3.7.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de três *pools* de cinco COCs de cada grupo, usando o kit *RneasyMicro* Kit (Qiagen, Valencia, USA), conforme instruções do fabricante. A quantificação do RNA extraído em cada *pool* foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop Lite, ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

3.7.2 Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada utilizando a transcriptase reversa *SuperScript IV* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ao RNA obtido foram adicionados *primers* oligo-dT₂₀, mistura de dNTP e água *Rnase-free*. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 min, seguido de 4 °C por 3 min e da adição da transcriptase reversa, *RNaseOUT*, *DTT* e tampão *SuperScript IV RT*. A transcrição reversa ocorreu em temperatura de 50 °C durante 10 min e posteriormente a 80 °C, por 10 min para inativação das enzimas. Em seguida, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 1 min, e armazenadas a -20 °C até a amplificação.

3.7.3 Amplificação

As amostras de cDNA foram submetidas à amplificação por qPCR. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. Estes foram adicionados nas amostras de cDNA junto com *FastStart Universal SYBR Green PCR Master Mix* e água *nuclease-free*. Controles negativos foram obtidos sem adição do cDNA.

A reação ocorreu no equipamento QuantStudio 3 (Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), a 50 °C, durante 2 min, 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s e 60 °C durante 30 s. Durante a extensão foram obtidos níveis de fluorescência e a

reação teve sua especificidade conferida por meio da curva de *melting*. A eficiência dos primers foi conferida pelo software LinRegPCR (RUIJTER E RAMAKERS *et al.*, 2003). A eficiência dos primers foi: 1,99 para *YWHAZ* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*); 1,98 para *ACTB* (*beta-actin*); 1,96 para *HSP70* (*70 kilodalton heat shock protein*); 1,97 para *PRDX1* (*peroxiredoxin-1*); 1,97 para *GDF9* (*growth differentiation factor 9*); 1,98 para *ZAR1* (*zygote arrest 1*); 1,97 para *BMP15* (*bone morphogenetic protein 15*); 1,99 para *SIRT1* (*sirtuin 1*); e 2,00 para *SIRT3* (*sirtuin 3*). Os valores de CT foram comparados pelo software REST 2008 (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001), após a normalização com os valores médios dos genes de referência (*YWHAZ* e *ACTB*).

Tabela 2. Sequências, tamanhos e referências dos *primers* utilizados para realização do PCR em tempo real dos complexos *cumulus*-oócitos frescos e vitrificados com e sem AFP I de gatas domésticas.

Genes	Sequências de primers (5'-3')	Tamanho do produto (bp)	Referências
YWHAZ	F: GAAGAGTCCTACAAAGACAG CACGC R: AATTTTCCCCTCCTTCTCCTGC	115	Filliers <i>et al.</i> , 2012
ACTB	F: GCCAACCGTGAGAAGATGACT R: CCCAGAGTCCATGACAATACCAG	128	Ishikawa <i>et al.</i> , 2013
HSP70	F: GGCATCGATGTCTGAAGGTCA R: ATCCAGGTGTACGAGGGTGA	129	XM_019830386.3
PRDX1	F: CCCACGGAGATCATTGCTT R: AATGGTACGCTTGGGGTCTG	181	XM_003990035.5
GDF9	F: AGTTCAGATTGCAGCGGGTG R: GATGTGAAGAGCCGAGCAGT	264	NM_001165900.1
ZAR1	F: CATCCGATGGGAAAGTGCCT R: GCTGTCACAGGATAGGCGTT	241	XM_023252238.2
BMP15	F: GACAGCCCTCTAATGCCCTC R: CCAATGGTGCGGTTCTCTCT	187	NM_001165898.1
SIRT1	F: CGCCTTGCAATAGACTTCCC R: TGAATTTGTGACAGAGAGATGGTTG	145	Ishikawa <i>et al.</i> , 2013
SIRT3	F: TGCTTCTGCGGCTCTACAC R: TGTCTCCCCAAAGAACACGA	229	Ishikawa <i>et al.</i> , 2013

*F: forward; R: reverse; YWHAZ: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta; ACTB: beta-actin; HSP70: 70 kilodalton heat shock protein; PRDX1: peroxiredoxin-1; GDF9: growth differentiation factor 9; ZAR1: zygote arrest 1; BMP15, bone morphogenetic protein 15; SIRT1: sirtuin 1; SIRT3: sirtuin 3.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de homoscedasticidade de Levene. Os dados não paramétricos (atividade mitocondrial, níveis de EROse GSH) foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis seguido de Dunn. Outras variáveis não paramétricas (integridade de actina, qualidade morfológica) foram avaliadas pelo teste Exato de Fisher ou qui quadrado, dependendo do tipo de variável. O *software* utilizado foi SPSS 25 Statistics Base (IBM), com intervalo de confiança de 95% e valor de $P < 0,05$ como significativo.

4. RESULTADOS

4.1 QUALIDADE MORFOLÓGICA PÓS-AQUECIMENTO

Os resultados da qualidade morfológica pós-aquecimento dos COCs vitrificados estão descritos na Tabela 3. Os grupos vitrificados apresentaram menor qualidade dos COCs grau I e II do que o GF imediatamente após o aquecimento ($P<0,05$), sem diferença significativa entre os grupos vitrificados. No entanto, após 2:30 h de cultivo *in vitro*, os COCs dos grupos vitrificados com AFP apresentaram taxas similares ao controle fresco. O grupo vitrificado sem AFP teve porcentagem de COCs grau I e II significativamente inferior aos demais grupos ($P<0,05$).

Tabela 3. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na qualidade morfológica de complexos *cumulus*-oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.

	0 h	2:30 h
GF	100,0% (46/46) ^a	91,3% (42/46) ^a
G0	63,4% (26/41) ^b	56,1% (23/41) ^b
G0,5	77,5% (31/40) ^b	90,0% (36/40) ^a
G1	66,7% (30/45) ^b	84,4% (38/45) ^a

Avaliações foram realizadas logo após o aquecimento (0 h) e após duas horas e meia (2:30 h). Letras diferentes significam diferença estatística entre as linhas ($P<0,05$).

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 µg/mL; G0,5: 0,5 µg/mL e G1: 1,0 µg/mL de AFP I

4.1.1 Integridade da actina

Os resultados da análise de integridade de actina estão representados na Tabela 4. O G1 apresentou mais oócitos com filamentos de actina íntegros, do que o grupo vitrificado sem adição de AFP ($P<0,05$).

Tabela 4. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na integridade de actina de oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.

	Íntegros	Lesados	Total	%
GF	10	0	10	100 ^a
G0	5	7	12	41,67 ^b
G0,5	7	4	11	63,63 ^{ab}
G1	11	1	12	91,67 ^a

Teste Exato de Fisher. Letras diferentes significam diferença estatística entre as linhas (P<0,05).

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 µg/mL; G0,5: 0,5 µg/mL; e G1: 1,0 µg/mL de AFP I

4.1.2 Atividade mitocondrial

Não houve diferença estatística entre a atividade mitocondrial dos grupos GF, G0 e G0,5. Já o G1 teve atividade mitocondrial significativamente menor que os grupos GF e G0 (P<0,05). Os resultados da análise de atividade mitocondrial estão ilustrados nas Figuras 2 e 3.

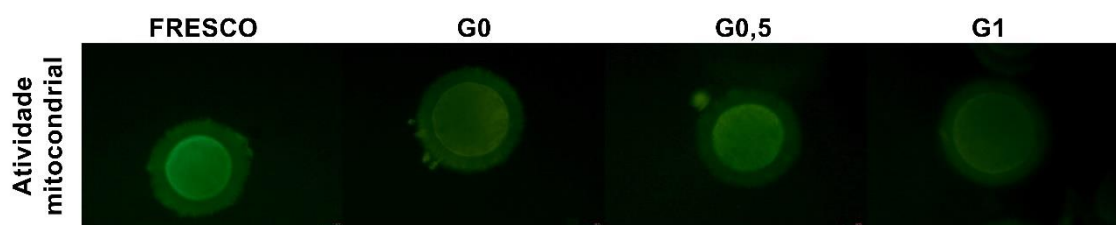


Figura 2. Oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com ou sem AFP I, corados com *MitoTracker Green* para avaliação de nível de atividade mitocondrial.

* Grupos experimentais: G0: 0,0 µg/mL; G0,5: 0,5 µg/mL; e G1: 1,0 µg/mL de AFP

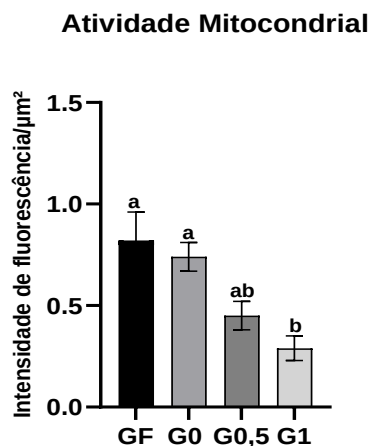


Figura 3. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na intensidade de fluorescência/μm² oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas corados com *MitoTracker Green*, indicando atividade mitocondrial.

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 μg/mL; G0,5: 0,5 μg/mL; e G1: 1,0 μg/mL de AFP

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (P<0,05).

4.1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathiona (GSH)

Os grupos GF, G0 e G0,5 apresentaram níveis de EROs similares, enquanto G1 teve níveis significativamente superiores que os demais grupos (P<0,05). Em relação aos níveis de GSH, todos os grupos apresentaram menores níveis em relação ao GF (P<0,05). A razão EROs/GSH do GF foi significativamente diferente do G0,5 e G1. O G0 não diferiu do GF nem dos outros grupos vitrificados (P<0,05). Os resultados das análises de EROs e GSH estão ilustrados nas Figuras 4 e 5.

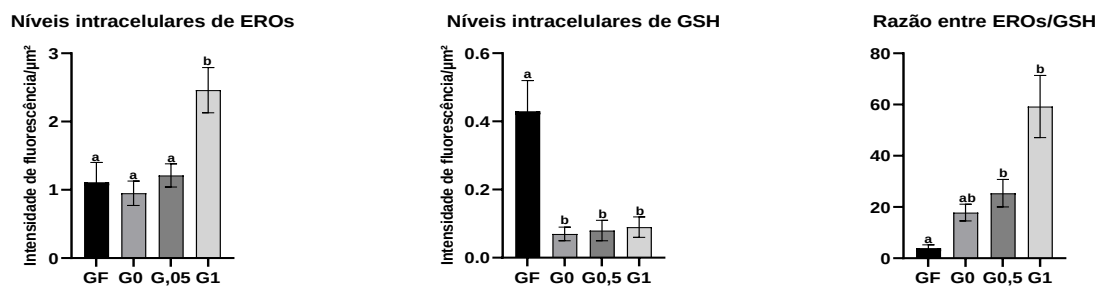


Figura 4. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na intensidade de fluorescência/μm² oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas corados com H2DCFDA e *Cell Tracker Blue* CMF2HC, indicando níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathiona (GSH), bem como a razão entre os dois valores.

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 μg/mL; G0,5: 0,5 μg/mL; e G1: 1,0 μg/mL de AFP I

**Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (P<0,05).

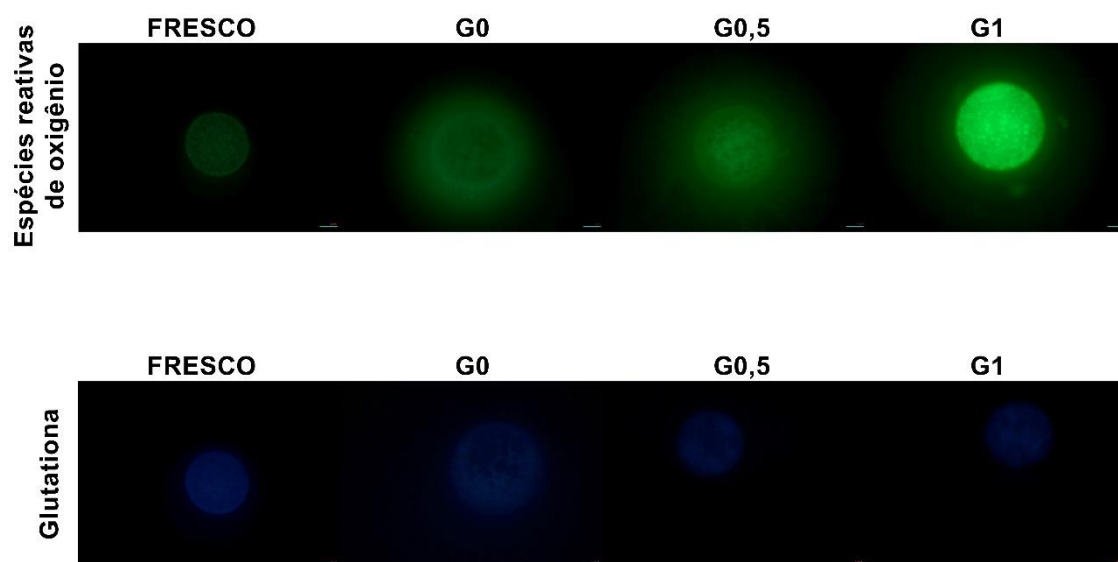


Figura 5. Oócitos imaturos de gatas domésticas frescos e vitrificados com ou sem AFP I, corados com H2DCFDA (2',7'- 932 *dichlorodihydrofluorescein diacetate*) e *CellTracker Blue* CMF2HC (4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin) para mensuração de níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (verde) e glutathiona (azul), respectivamente.

* Grupos experimentais: G0: 0,0 μg/mL; G0,5: 0,5 μg/mL; e G1: 1,0 μg/mL de AFP I

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA

O resultado da análise da expressão gênica nos grupos avaliados está ilustrado na Figura 6. No G0 e no G0,5, todos os genes estavam *down*-regulados em relação ao GF, com exceção dos genes *SIRT1* e *SIRT3* no G0 e *SIRT3* no G0,5, que não apresentaram diferença estatística. Já o G1, não teve diferença estatística nos níveis de expressão gênica em relação ao GF, com exceção dos genes *HSP70* e *ZAR1* que estavam *down*-regulados e da *SIRT3* que estava *up*-regulada.

O G0 não teve diferença estatística em nenhum gene em relação ao G0,5, e em relação ao G1 estava *down*-regulado nos genes *GDF9*, *ZAR1* e *BMP15*. O G0,5 também esteve *down*-regulado em relação ao G1 nos genes *PRDX1*, *GDF9*, *ZAR1*, *BMP15*, *SIRT1* e *SIRT3*, somente não apresentando diferença no gene *HSP70*.

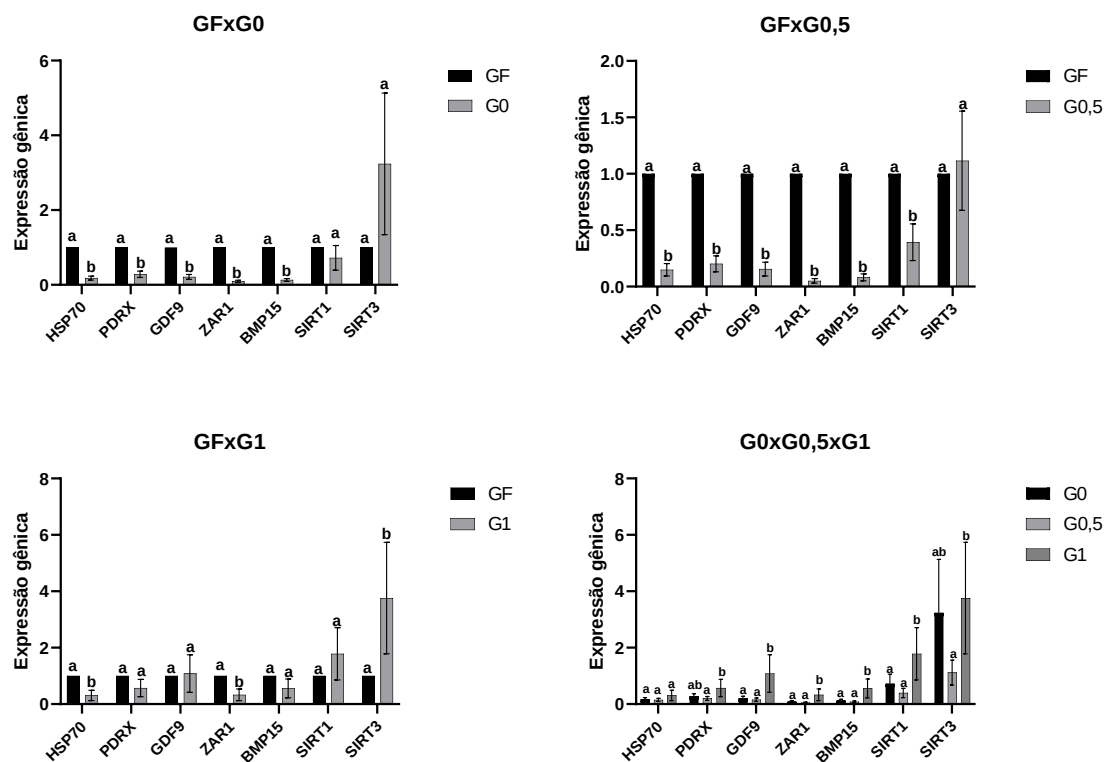


Figura 6. Efeito da concentração de AFP na solução de vitrificação na expressão dos genes *HSP70*, *PRDX1*, *GDF9*, *ZAR1*, *BMP15*, *SIRT1* e *SIRT3* de oócitos imaturos vitrificados de gatas domésticas.

*Grupos experimentais: GF: controle fresco; G0: 0,0 µg/mL; G0,5: 0,5 µg/mL; e G1: 1,0 µg/mL de AFP I

**Expressão dos genes avaliados foi normalizada com genes de referência *YWHAZ* e *ACTB*. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos (P<0,05).

****YWHAZ*: tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta; *ACTB*: beta-actin; *HSP70*: 70 kilodalton heat shock protein; *PRDX1*: peroxiredoxin-1; *GDF9*: growth differentiation factor 9; *ZAR1*: zygote arrest 1; *BMP15*: bone morphogenetic protein 15; *SIRT1*: sirtuin 1; *SIRT3*: sirtuin 3.

5. DISCUSSÃO

Nesta dissertação, COCs imaturos de gatas domésticas foram submetidos a vitrificação utilizando diferentes concentrações de AFP I. De forma geral, observou-se que após 2:30 h do aquecimento, os COCs vitrificados com AFP apresentaram qualidade morfológica similar ao controle fresco e significativamente superior ao grupo sem AFP, bem como maior número de oócitos com filamentos de actina íntegros do que o grupo vitrificado na ausência de AFP. Além disso, o G1 manteve seu perfil de expressão similar em relação ao GF, com exceção dos genes *HSP70* e *ZAR1* (diminuídos) e da *SIRT3* (aumentada). No entanto, os grupos GF, G0 e G0,5 apresentaram níveis de atividade mitocondrial, EROS e GSH intracelulares similares, enquanto G1 teve maior nível de EROS, bem como menores níveis de GSH e de atividade mitocondrial do que os demais grupos. Três conclusões podem ser tomadas a partir desses resultados. Primeiramente, a concentração de 1 µg/mL na solução de vitrificação de COCs imaturos de gata domésticas melhora os aspectos morfológicos e estruturais após o aquecimento. Em segundo lugar, preserva a expressão global de genes em comparação com os frescos. E por último, afeta o metabolismo oxidativo celular no momento e condições da avaliação deste estudo.

Oócitos vitrificados frequentemente apresentam lesões aparentes como ruptura de ZP, membrana plasmática ou degeneração citoplasmática. A avaliação morfológica dos COCs é uma maneira empírica de avaliar o efeito da vitrificação na ausência da possibilidade de uso de corantes vitais (APARICCIO *et al.*, 2012). Neste estudo, COCs imaturos de gatas domésticas vitrificados utilizando AFP I apresentaram boa qualidade morfológica 2:30 h após o aquecimento. O número de COCs dos grupos suplementados com AFP foram significativamente maiores do que do grupo não suplementado, e similares ao grupo controle fresco. O aumento da viabilidade de oócitos e embriões vitrificados com suplementação de AFP já foi bem caracterizado em outras espécies (LEE *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2020). Provavelmente, a propriedade da AFP de se ligar a membranas celulares, promovendo sua estabilização durante a exposição a baixas temperaturas favoreceu a melhor qualidade morfológica aparente nos grupos vitrificados (TOMCZAK *et al.*, 2002; JO *et al.*, 2011).

A suplementação de AFP I promoveu um efeito importante na manutenção da integridade dos microfilamentos de actina dos oócitos. Os oócitos tratados com AFP apresentaram resultados semelhantes a oócitos frescos, enquanto apenas 41% dos oócitos vitrificados sem AFP se mantiveram íntegros. Luciano *et al.* (2009) demonstraram que a vitrificação de oócitos imaturos de gatas domésticas afeta a taxa de integridade de actina, tendo observado taxas similares aos apresentados no G0 de oócitos com padrão anormal de actina (cerca de 60%). Já nos grupos vitrificados com AFP, a taxa de oócitos com actina íntegra aumentou conforme a concentração de AFP utilizada. O papel protetor da AFP já foi demonstrado na preservação do citoesqueleto durante a criopreservação de oócitos. Liang *et al.* (2016) demonstraram um efeito protetor da AFGP na integridade da actina, bem como na organização do fuso meiótico e alinhamento dos cromossomos de oócitos bovinos maturados vitrificados com AFGP. O mesmo foi observado em oócitos maturados de camundongos vitrificados com AFP III (WEN *et al.*, 2014). Em ambos os estudos, o uso de AFPs também contribuiu com taxas melhores de desenvolvimento embrionário em comparação com os grupos vitrificados sem AFPs, demonstrando que o papel protetor do citoesqueleto (tanto actina quanto tubulina) é fundamental para divisões celulares adequadas e um bom desenvolvimento embrionário posterior.

A avaliação global da diminuição ou aumento da expressão dos genes pode indicar em oócitos vitrificados a diferença na qualidade entre os grupos, pela melhor ou pior capacidade de se manter no nível ideal (GF) ou de suportar o estresse. A vitrificação afetou significativamente a expressão global dos genes avaliados. O grupo vitrificado sem a presença (G0) e com 0,5 µg/mL de AFP (G0,5) tiveram sua expressão global diminuída em relação ao GF. No entanto, a utilização de AFP I na concentração de 1 µg/mL foi suficiente para manter a expressão global dos genes do grupo mais similar ao de COCs frescos, não apresentando diferenças significativas na expressão dos genes avaliados. Isso pode ser interpretado como um efeito benéfico da utilização da AFP, que permitiu a manutenção dos transcritos dos COCs vitrificados em níveis semelhantes aos frescos, possivelmente mantendo a capacidade oocitária de lidar com o estresse da vitrificação e progredir. Outros estudos com AFPs na vitrificação de oócitos demonstraram a maior semelhança entre os grupos vitrificados com AFP com os grupos frescos do que os grupos não tratados na expressão de genes (JO *et al.*,

2011; JO *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2014). Por outro lado, na ausência de AFP ou na concentração de 0,5 µg/mL, a vitrificação pode ter induzido a degradação de transcritos oocitários. Entre os grupos G0 e G0,5 a expressão dos genes se manteve similar, logo, o uso de AFP I nessa concentração provavelmente não exerceu efeito significativo na expressão de genes.

Os genes avaliados relativos à competência oocitária (*GDF9*, *BMP15*, *ZAR1*) estavam diminuídos nos grupos G0 e G0,5 comparativamente ao GF. Isso pode revelar uma menor qualidade desse oócito e probabilidades menores de atingir uma adequada maturação, ser fertilizado e promover o desenvolvimento embrionário. Os níveis de expressão gênica similares ao GF podem ser um indicativo da qualidade oocitária e do maior potencial de desenvolvimento do G1. O *PRDX1*, gene relacionado ao estresse oxidativo, não apresentou diferença significativa nos grupos com relação ao fresco, porém o *HSP70* estava *down-regulado* no G1 em relação ao GF. Os genes *SIRT1* e *SIRT3* se mantiveram similares nos grupos G0 e G0,5 em relação ao GF, enquanto no G1 em relação ao fresco estavam *up-reguladas*. As *SIRT3* são indicativas de estresse oxidativo originário nas mitocôndrias, ou seja, de disfunção mitocondrial. O grupo G1 apresentou taxas de atividade mitocondrial inferiores a todos os outros grupos e aumento da expressão do gene dessa proteína, podendo indicar que a disfunção mitocondrial e o aumento de EROs, foram percebidos pela *SIRT3*, que é um “sensor” de estresse oxidativo. Os grupos G0 e G0,5 tiveram taxas de atividade mitocondrial similares com o GF, o que condiz com sua expressão similar de *SIRT1* e *SIRT3*.

Os danos mitocondriais muitas vezes são danos subletais, em que não necessariamente resultam em morte celular, mas que prejudicam a fertilização e outras etapas do desenvolvimento embrionário (GUALTIERI *et al.*, 2021). Em oócitos felinos, os estudos encontrados na literatura focaram principalmente na distribuição das mitocôndrias antes e após maturação e vitrificação (GONZALES *et al.*, 2012; SOWINSKA *et al.*, 2017). Sowinska *et al.* (2017) concluíram que a vitrificação não teve influência na distribuição das mitocôndrias, porém aumentou o grau de agregação e diminuiu a intensidade de fluorescência, podendo significar diminuição na atividade mitocondrial após a vitrificação. A vitrificação, de modo geral, afeta a distribuição, o potencial de membrana, funcionamento de enzimas, níveis de ATP intracelulares e atividade mitocondrial de oócitos de diversas

espécies, normalmente para níveis inferiores aos grupos frescos (DAI *et al.*, 2015; AMOUSHABI *et al.*, 2017; SUCCU *et al.*, 2017; XIANG *et al.*, 2021). O uso de diferentes tipos de AFP na vitrificação de oócitos murinos maturados não resultou em diferença estatística na atividade mitocondrial com os grupos não suplementados (LEE *et al.*, 2015). Já em oócitos bovinos maturados vitrificados, o uso de AFGP não provocou diferença na quantidade de ATP intracelular, apenas melhora na distribuição de mitocôndrias e no potencial de membrana em relação aos grupos não tratados (LIANG *et al.*, 2016). Neste estudo, esperava-se que a concentração de 1 µg/mL de AFP I pudesse manter a atividade mitocondrial semelhante à de oócitos frescos devido às suas propriedades protetoras. No entanto, nessa concentração, houve uma diminuição da atividade mitocondrial, que permaneceu normal nos grupos não tratados. Não é possível afirmar se esta aparente diminuição do metabolismo oxidativo é um efeito da adição de AFP na solução de vitrificação. Surge a hipótese de que a AFP, por algum mecanismo não estudado, exerça efeito na diminuição do metabolismo celular, no intuito de promover sobrevivência em baixas temperaturas e a recuperação das lesões criogênicas. Esta hipótese poderia ser confirmada com outros estudos para atestar a recuperação do metabolismo celular dos grupos vitrificados com AFP em comparação com outros grupos não tratados. No entanto, caso não tenha sido um efeito direto da AFP, este resultado aparentemente controverso pode ter sido influenciado por outros fatores.

Existem diferentes sondas para avaliação de mitocôndrias e essas se ligam a diferentes substratos nas células. O *MitoTracker Green*, apesar de excelente para estudo de morfologia e localização de mitocôndrias, deve ser usado com cautela para avaliação de função mitocondrial, tendo em vista que não é tão sensível a alterações no potencial de membrana mitocondrial e situações de estresse oxidativo (PENDERGRASS *et al.*, 2004). Esta pode ser uma possível explicação para o resultado encontrado de atividade mitocondrial. Além disso, na literatura, essa análise é realizada em diferentes momentos após o aquecimento. Manipalviratn *et al.* (2011) demonstraram que após incubação por 180 min, os níveis intracelulares de ATP atingiram níveis mais altos do que logo após o aquecimento em oócitos vitrificados humanos, demonstrando que pode haver uma retomada da atividade mitocondrial após algumas horas do aquecimento. Um estudo em oócitos ovinos demonstrou que apesar de logo após o aquecimento

apresentarem menores níveis de ATP e de atividade mitocondrial, após 4 h houve uma restauração da função mitocondrial com consequente aumento de ATP (SUCCU *et al.*, 2017). Por outro lado, os oócitos do grupo controle, com 4 h de incubação, passaram por um processo de envelhecimento e deterioração das funções mitocondriais. Portanto, estudos têm demonstrado a importância de promover um período de recuperação ideal aos oócitos vitrificados logo após o aquecimento. Mais estudos são necessários para determinar um período ideal, que não chegue a envelhecer os oócitos e resulte em diminuição das funções celulares, mas que permita uma adequada recuperação após o estresse da vitrificação. Possivelmente, neste estudo, o período de 2:30 h de incubação após aquecimento não foi suficiente para recuperação das atividades metabólicas dos oócitos. Talvez, com maior tempo de incubação, poderia ser observado inversão nos valores observados e uma atividade mitocondrial crescente do G1. Os oócitos G0 e G0,5 apesar da aparente atividade mitocondrial semelhante ao de oócitos frescos, não tiveram citoesqueleto e expressão de genes preservado, o que torna sua qualidade duvidosa. Portanto, talvez com maior período de incubação, eles tenderiam a envelhecer e não suportar as próximas etapas do desenvolvimento. Essa hipótese só poderá ser confirmada com novos estudos, com maiores períodos de incubação após aquecimento e confirmando a competência dos oócitos no que diz respeito a retomada da meiose, fertilização e desenvolvimento embrionário. No caso do G1, apesar de baixos níveis de atividade mitocondrial no momento da avaliação, as avaliações anteriores demonstram que é um oócito mais semelhante ao fresco no aspecto estrutural e transcricional. Seu metabolismo, no entanto, parece estar alterado e isso requer novas investigações para averiguar como isso afetaria o posterior desenvolvimento do oócito.

O G1, com menor atividade mitocondrial, apresentou aumento de EROs e diminuição de GSH. Os EROs podem ser formados na vitrificação devido à exposição aos crioprotetores que promovem influxo de cálcio e devido a disfunções mitocondriais. Consequentemente, o excesso de EROs também pode causar danos as mitocôndrias (especialmente na cadeia transportadora de elétrons e no DNA mitocondrial), causando alteração na função mitocondrial (AMOUSHABI *et al.*, 2017; GUALTIERI *et al.*, 2021). Tendo em vista que a produção excessiva de EROs e diminuição dos níveis de GSH majoritariamente decorrem da disfunção da atividade mitocondrial, este resultado está de acordo

com os resultados da análise anterior. Opostamente ao observado neste estudo, o efeito de AFPs de diferentes origens na vitrificação de oócitos nos níveis de EROs foi avaliado em estudos em bovinos e murinos, e demonstraram a capacidade das AFPs que diminuir os níveis de EROs (LEE *et al.*, 2015; LIANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2020). No G1, os níveis de EROs estavam aparentemente acima do normal (GF), mas isso não exerceu efeito aparente nos aspectos moleculares e estruturais observados nas outras análises, provavelmente não comprometendo a viabilidade do oócito. Uma possibilidade para o aumento do nível de EROs no G1 é o que se chama atualmente de “*eustress*”, em oposição a “*distress*”. Apesar dos efeitos deletérios associados aos EROs, esses possuem papel significativo nas cascatas de sinalização celular. Em certas condições metabólicas, as células podem aumentar os níveis de EROs para estimular o metabolismo, sem atingir o limiar deletério que pode causar danos ultraestruturais (TATONE *et al.*, 2010; GUALTIERI *et al.*, 2021). Além disso, era esperado que a vitrificação por si só afetasse negativamente as concentrações de EROs e GSH intracelulares dos grupos G0 e G0,5. No entanto, os níveis de EROs e GSH entre os grupos GF, G0 e G0,5 não apresentaram diferença estatística. Neste estudo, pode-se supor que um dos fatores a influenciar seja a qualidade do protocolo utilizado que garantiu boa qualidade do processo de criopreservação de modo a preservar a atividade mitocondrial e níveis de EROs e GSH nos oócitos vitrificados. Este protocolo permite a viabilidade de cerca de 90% dos COCs aquecidos, verificado com uso de corantes vitais (COLOMBO E LUVONI, 2020). A grande vantagem deste protocolo é o volume mínimo, garantindo bons resultados, e a simplicidade da execução e dos meios utilizados, permitindo sua aplicação em laboratórios simples. Este protocolo aliado ao efeito protetor da AFP na concentração de 1 µg/mL pode ser uma combinação útil para melhorar a vitrificação de oócitos imaturos de gatas domésticas.

Na literatura, não há um consenso sobre o tipo e a concentração de AFP ideal para criopreservação de oócitos. Apesar do tipo III ser o mais testado, a AFP I tem demonstrado ter efeitos benéficos superiores na criopreservação de sêmen e embriões (CORREIA *et al.*, 2021). Altas concentrações de AFP podem ser tóxicas, e para obter a propriedade de inibição da recristalização não é necessário utilizar concentrações altas (RAHMAN *et al.*, 2019). As concentrações utilizadas de 0,15 µM (0,5 µg/mL) em G0,5 e 3 µM (1 µg/mL) em G1 estão dentro da faixa

do peso molecular ideal para inibição da recristalização (RAHMAN *et al.*, 2019). Tendo em vista que o método de *Cryotop* demanda volume mínimo de solução de vitrificação e a taxa de resfriamento é ultrarrápida, baixas concentrações de AFP já poderiam exercer o efeito desejado. O'Neil *et al.* (1998) verificaram que a exposição de oócitos murinos a 1 µg/mL de AFGP antes da vitrificação possibilitou taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário semelhantes às de oócitos frescos. Devido à particular sensibilidade do oócito optou-se por utilizar neste estudo a menor concentração possível.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais do presente estudo, a suplementação de AFP I na concentração de 1 µg/mL na solução de vitrificação melhora os aspectos morfológicos, estruturais (integridade de actina) e moleculares (padrão de expressão gênica) de oócitos imaturos de gatas domésticas após a criopreservação.

6.2 PERSPECTIVAS

Novos estudos avaliando o efeito da adição da AFP I na vitrificação de oócitos imaturos de gatas domésticas poderão analisar os efeitos metabólicos com maior período de incubação pós aquecimento. Possivelmente o uso de novas maneiras de avaliação de atividade mitocondrial e a avaliação completa de competência oocitária (com retomada da meiose, fertilização e desenvolvimento embrionário) podem trazer novas informações sobre o efeito da AFP I na vitrificação de oócitos imaturos de gatas domésticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1 OBRAS CITADAS

Abell J, Kokés R, Youldon D. A framework for the ex situ reintroduction of the African lion (*Panthera leo*). *Open Science Repository Natural Resources and Conservation*. 2013; e70081986.

Alminana C, Cuello C. What is new in the cryopreservation of embryos? *Animal Reproduction*. 2018;12(3), 418-427.

Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, Caserta D, Cosmi E, Marcib R, Moscarini M. Oocytes cryopreservation: state of art. *Reproductive toxicology*. 2006; 22(2), 250-262.

Amoushahi M, Salehnia M, Mowla SJ. Vitrification of mouse MII oocyte decreases the mitochondrial DNA copy number, TFAM gene expression and mitochondrial enzyme activity. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2017; 18(4):343.

Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reproductive Biomedicine Online*. 2007; 14(1):72-9.

Apparicio M, Ruggeri E, Luvoni GC. Vitrification of immature feline oocytes with a commercial kit for bovine embryo vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013; 48(2):240-4.

Arav A, Natan Y. The near future of vitrification of oocytes and embryos: looking into past experience and planning into the future. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2019; 46(3), 182-187.

Arav A, Rubinsky B, Fletcher G, Seren E. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Molecular reproduction & development*. 1993; 36(4), 488-493.

Arav A, Zvi R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? *Molecular and cellular endocrinology*. 2008; 282(1-2), 150-152

Arayatham S, Tiptanavattana 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*. 2017; 63(5):511-517.

Azari M, Kafi M, Ebrahimi B, Fatehi R, Jamalzadeh M. Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. *Veterinary research communications*. 2017;41(1):49-56.

Barberet J, Barry F, Choux C, Guilleman M, Karoui S, Simonot R, Bruno C, Fauque P. What impact does oocyte vitrification have on epigenetics and gene expression? *Clinical Epigenetics*. 2020; 12(1):121.

Bar-Dolev M, Celik Y, Wettlaufer JS, Davies PL, Braslavsky I. New insights into ice growth and melting modifications by antifreeze proteins. *Journal of the Royal Society Interface*. 2012; 9(77), 3249-3259.

Batista RI, Raposo NR, Campos-Junior PH, Pereira MM, Camargo LS, Carvalho BC, Gama MA, Viana JH. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred bovine embryos. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2014;5(1):1-8.

Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Paua S, Ledda S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*. 2007; 68(8), 1138-1149.

Bristol SK, Woodruff TK. Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor β superfamily ligands in the feline ovary. *Biology of reproduction*. 2004; 70(3):846-59.

CBD (Convention on biological diversity). Nações Unidas, 1992. Disponível em: <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>. Acesso em: 25 de março de 2021.

Chang T, Zhao G. Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Advanced Science (Weinh)*. 2021;8(6):2002425.

Chaves DF, Campelo IS, Silva MM, Bhat MH, Teixeira DI, Melo LM, Souza-Fabjan JMG, Mermillod P, Freitas VJ. The use of antifreeze protein type_III for vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. *Cryobiology*. 2016; 73(3), 324-328.

Christians ES, Zhou Q, Renard J, Benjamin IJ. Heat shock proteins in mammalian development. *In Seminars in cell & developmental biology*. 2003; 14:5, 283-290.

Colombo M, Luvoni GC. Minimum Volume Vitrification of Immature Feline Oocytes. *JOVE*. 2020 Jun 24;(160).

Colombo M, Zahmel J, Jänsch S, Jewgenow K, Luvoni GC. Inhibition of Apoptotic Pathways Improves DNA Integrity but Not Developmental Competence of Domestic Cat Immature Vitrified Oocytes. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020; 7:588334.

Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthi BS. *In vitro* compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009; 44 Suppl 2:269-74.

Comizzoli, P. Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Animal Reproduction*. 2018; 14(1), 30-33.

Correia LF, Alves BR, Batista RI, Mermillod P, Souza-Fabjan JM. Antifreeze proteins for low-temperature preservation in reproductive medicine: A systematic review over the last three decades. *Theriogenology*. 2021;176:94-103.

Correia LFL, Espírito-Santo CG, Braga RF, Carvalho-de-Paula CJ, da Silva AA, Brandão FZ, Freitas VJF, Ungerfeld R, Souza-Fabjan JM. Addition of antifreeze protein type I or III to extenders for ram sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2021; 98, 194-200.

Dai J, Wu C, Muneri CW, Niu Y, Zhang S, Rui R, Zhang D. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*. 2015; 71(2):291-8.

De Munck N, Vajta G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology*. 2017; 78:119-127.

Dennison RS, Michelet S, Godke RA. *Principles of cryopreservation*. In Tierch TR, Mazik PM (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic species*. Califórnia (EUA): World Aquaculture Society, 2000; 59–74.

Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro AM, Vento M, Di Pietro C, Amicarelli F, Tatone C. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*. 2014; 29(9):2006-17.

Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo CO, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, de la Varga S, Fernández A, Facal N, Carbajo M. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology*. 2005;15;64(2):317-33.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Roca AL, Hupe K, Johnson WE, Geffen

E, Harley EH, Delibes M, Pontier D, Kitchener AC, Yamaguchi N, O'Brien SJ, Macdonald DW. The Near Eastern origin of cat domestication. *Science*. 2007; 317(5837):519-23.

Driscoll CA, Macdonald DW, O'Brien SJ. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(Supplement 1), 9971-9978.

Fernandez-Gonzalez L, Jewgenow K. Cryopreservation of feline oocytes by vitrification using commercial kits and slush nitrogen technique. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 52, 230-234.

Ferraz MDAMM, Fujihara M, Nagashima JB, Noonan MJ, Inoue-Murayama M, Songsasen N. Follicular extracellular vesicles enhance meiotic resumption of domestic cat vitrified oocytes. *Scientific reports*. 2020; 10(1), 1-14.

Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836-48.

Fujihara M, Comizzoli P, Keefer CL, Wildt DE, Songsasen N. Epidermal growth factor (EGF) sustains in vitro primordial follicle viability by enhancing stromal cell proliferation via MAPK and PI3K pathways in the prepubertal, but not adult, cat ovary. *Biology of reproduction*. 2014; 90(4):86-1.

Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004; 9(6): 680- 691.

Galiguis J, Gómez MC, Leibo SP, Pope CE. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized *in vitro* matured oocytes. *Cryobiology*. 2014; 68(3):459-66.

Gharib G, Saeidiharzand S, Sadaghiani AK, Koşar A. Antifreeze Proteins: A Tale of Evolution From Origin to Energy Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:770588

Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Critser JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction*. 1997; 12(1): 112-118.

Gittleman JL, Gompper ME. Plight of predators: the importance of carnivores for understanding patterns of biodiversity and extinction risk. *Ecology of predator–*

prey interactions. 2005; 370-388.

Glenister PH, Whittingham DG, Lyon MF. Further studies on the effect of radiation during the storage of frozen 8-cell mouse embryos at- 196° C. *Reproduction*. 1984; 70(1), 229-234.

González R, Gómez MC, Pope CE, Brandt YC. Characterization of mitochondrial and actin patterns in cat oocytes and blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47:118-20.

Gruneberg AK, Graham LA, Eves R, Agrawal P, Oleschuk RD, Davies PL. Ice recrystallization inhibition activity varies with ice-binding protein type and does not correlate with thermal hysteresis. *Cryobiology*. 2021; 99, 28-39.

Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Di Nardo M, Adiga SK, Talevi R. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. *Antioxidants*. 2021; 10(3):337.

Gutnisky C, Morado S, Gadze T, Donato A, Alvarez G, Dalvit G, Cetica P. Morphological, biochemical and functional studies to evaluate bovine oocyte vitrification. *Theriogenology*. 2020; 143:18-26.

Hast, MH. The larynx of roaring and non-roaring cats. *Journal of Anatomy*. 1989; 163: 117.

Hochi S. Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes. *Animal Science Journal*. 2022; 93(1):e13683.

Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biological Chemistry*. 2002; 383, 3-4,347-364

Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53(1), 47-58.

Hu Y, Hu S, Wang W, Wu X, Marshall FB, Chen X, Hou L, Wang C. Earliest evidence for commensal processes of cat domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(1), 116-120.

Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Nakamura Y, Hayama K, Shirasawa A, Sakaguchi K, Tominaga N, Nishimiya Y, Tsuda S. Prolonging hypothermic storage (4 C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. *Journal of Reproduction and Development*. 2015; 61(1):1-6.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). The IUCN Red List of Threatened Species, 2022. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em

02 de novembro de 2022.

Iussig B, Maggiulli R, Fabozzi G, Bertelle S, Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. A brief history of oocyte cryopreservation: arguments and facts. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2019; 98(5), 550-558.

Jeon HJ, Park YS, Cho DH, Kim JS, Kim E, Chae HZ, Chun SY, Oh JS. Peroxiredoxins are required for spindle assembly, chromosome organization, and polarization in mouse oocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017; 489(2):193-9.

Jewgenow K, Zahmel J. Preservation of female genetic resources in feline species. *Theriogenology*. 2020; 156:124-129.

Jia Z, Davies PL. Antifreeze proteins: an unusual receptor–ligand interaction. *Trends in biochemical sciences*. 2002; 27(2), 101-106.

Jo JW, Jee BC, Lee JR, Suh CS. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence. *Fertility and sterility*. 2011; 96(5):1239-45.

Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH. The beneficial effects of antifreeze proteins in the vitrification of immature mouse oocytes. *PloS one*. 2012;7(5):e37043.

Kim HJ, Lee JH, Hur YB, Lee CW, Park SH, Koo BW. Marine antifreeze proteins: structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. *Marine drugs*. 2017; 15(2), 27.

Kitchener AC, Breitenmoser-Würsten C, Eizirik E, Gentry A, Werdelin L, Wilting A, Yamaguchi N, Abramov AV, Christiansen P, Driscoll C, Duckworth JW, Johnson WE, Luo SJ, Meijaard E, O'Donoghue P, Sanderson J, Seymour K, Bruford M, Groves C, Hoffmann M, Nowell K, Timmons Z, Tobe S. A revised taxonomy of the Felidae : The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN Cat Specialist Group. *Cat News*. 2017;11, 88.

Kleinman-Ruiz D, Soriano L, Casas-Marce M, Szychta C, Sánchez I, Fernández J, Godoy JA. Genetic evaluation of the Iberian lynx ex situ conservation programme. *Heredity*. 2019; 123(5), 647-661.

Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*. 2015; 21(2):209-27.

Lasiene K, Lasys V, Glinskyte S, Valanciute A, Vitkus A. Relevance and

methodology for the morphological analysis of oocyte quality in IVF and ICSI. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. 2011; 2(1):1-3.

Leal GR, Graciosa MA, Monteiro CA, Pasolini R, dos Reis Camargo AJ, Oliveira CS, de Paula Vasconcelos CO, Nogueira LA, Ferreira AM, Serapião RV. The SPOM-adapted IVM system improves in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 2020; 158:277-82.

Lee HH, Lee HJ, Kim HJ, Lee JH, Ko Y, Kim SM, Lee JR, Suh CS, Kim SH. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. *Human Reproduction*. 2015;30(9):2110-9.

Lee PC, Comizzoli P. Desiccation and supra-zero temperature storage of cat germinal vesicles lead to less structural damage and similar epigenetic alterations compared to cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*. 2019; 86(12):1822-1831.

Leibo SP, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*. 2002; 57(1), 303-326.

Leung LKP. Principles of biological cryopreservation. *Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa*. 1991; 231-244.

Liang S, Yuan B, Kwon JW, Ahn M, Cui XS, Bang JK, Kim NH. Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2016; 86(2), 485-494.

Lin TK, Su JT, Lee FK, Lin YR, Lo HC. Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: survival and outcomes. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2010; 49(3):272-8.

Liu Y, Du Y, Lin L, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, Bolund L, Yang H, Vajta G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. *Cryo Letters*. 2008; 29(4):315-20.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402-8.

López A, Ducolomb Y, Casas E, Retana-Márquez S, Betancourt M, Casillas F. Effects of porcine immature oocyte Vitrification on actin microfilament distribution and chromatin integrity during early embryo development in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9:636765.

Luciano AM, Chigioni S, Lodde V, Franciosi F, Luvoni GC, Modena SC. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology*. 2009; 59(1):90-5.

Luvoni GC. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology*. 2006; 66(1):101-11.

Luvoni GC. Cryosurvival of ex situ and in situ feline oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012; 47 Suppl 6:266-8.

Luvoni GC, Colombo M. Cold case: Small animal gametes cryobanking. *Theriogenology*. 2020; 150:445-51.

Masrat-Un-Nisa, Malik AA, Sofi KA , Khatun A, Yousuf N. Recent Advancements in Vitrification Cryodevices for Gamete and Gonadal Tissue. *Cryoletters*. 2022; 43.3: 129-139.

Manipalviratn S, Tong ZB, Stegmann B, Widra E, Carter J, DeCherney A. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertility and sterility*. 2011; 95(5):1839-41. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal*. 2007; 404(1):1-3.

Mavrides A, Morroll D. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2005; 10;118(1):66-70.

Mazur P. Kinetics of Water Loss From Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *The Journal of General Physiology*. 1963; 47(2):347-69.

Mazur P. *Principles of Cryobiology*. In Fuller BJ, Lane N, Benson EE (Eds.), Life in the Frozen State. 1. ed. Flórida (EUA):CRC Press, 2004. 64 p.

Mikołajewska N, Müller K, Niżański W, Jewgenow K. Vitrification of domestic cat oocytes--effect on viability and integrity of subcellular structures. *Reproduction in Domestic Animal*. 2012; 47 Suppl 6:295-9.

Mogas T. Update on the vitrification of bovine oocytes and *in vitro*-produced embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019; 31(1), 105-117.

Mokrousova VI, Okotrub KA, Brusentsev EY, Kizilova EA, Surovtsev NV, Amstislavsky SY. Effects of slow freezing and vitrification on embryo development in domestic cat. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020; 55(10):1328-1336.

Montague MJ, Li G, Gandolfi B, Khan R, Aken BL, Searle SM, Minx P, Hillier LW, Koboldt DC, Davis BW, Driscoll CA, Barr CS, Blackistone K, Quilez J, Lorente-Galdos B, Marques-Bonet T, Alkan C, ThomasGWC, Hahn MW, Menotti-Raymond M, O'Brien SJ, Wilson RK, Lyons LA, Murphy WJ, Warren WC. Comparative analysis of the domestic cat genome reveals genetic signatures underlying feline biology and domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(48), 17230-17235.

Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*. 2008; 57(2):137-41.

Neglia G, Gasparrini B, di Brienza VC, Di Palo R, Campanile G, Presicce GA, Zicarelli L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 2003; 59(5-6):1123-30.

Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*. 1991; 35(1), 109-124.

Nohales-Córcoles M, Sevillano-Almerich G, Di Emidio G, Tatone C, Cobo AC, Dumollard R, De Los Santos Molina MJ. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Human reproduction*. 2016; 31(8):1850-8.

Nowak A, Kochan J, Świętek E, Kij B, Prochowska S, Witarski W, Bugno-Poniewierska M, Niżański W. Survivability and developmental competences of domestic cat (*Felis catus*) oocytes after Cryotech method vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020; 55(8), 992-997.

O'neil L, Paynter SJ, Fuller BJ, Shaw RW, DeVries AL. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me₂SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature. *Cryobiology*. 1998;37(1):59-66.

Paschoal DM, Sudano MJ, Schwarz KR, Maziero RR, Guastali MD, Crocomo LF, Magalhães LC, Martins Jr A, Leal CL, da Cruz Landim-Alvarenga F. Cell apoptosis and lipid content of in vitro–produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology*. 2017; 87:108-14.

Pegg DE. *Principles of cryopreservation. Cryopreservation and freeze-drying*

protocols. New York, NY: Springer, 2007. p 39-57.

Pegg DE. *Principles of cryopreservation*. In Cryopreservation and freeze-drying protocols. New York, NY: Springer, 2015. p 3-19.

Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2004; 61(2):162-9.

Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*. 2008; 9(4), 267-277.

Piras AR, Burrai GP, Ariu F, Falchi L, Zedda MT, Pau S, Gadau SD, Antuofermo E, Bebbere D, Ledda S, Bogliolo L. Structure of preantral follicles, oxidative status and developmental competence of in vitro matured oocytes after ovary storage at 4 °C in the domestic cat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16(1):1-4.

Pizzi F, Caroli AM, Landini M, Galluccio N, Mezzelani A, Milanesi L. Conservation of endangered animals: From biotechnologies to digital preservation. *Natural Science*. 2013; 5(8): 903–913

Pope CE, Gómez MC, Kagawa N, Kuwayama M, Leibo SP, Dresser BL. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Theriogenology*. 2012; 77(3):531-8.

Rajan R, Matsumura K. Development and application of cryoprotectants. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation*. 2018; 339-354.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human Reproduction Update*. 2017; 23(2):139-155.

Rienzi LF, Iussig B, Dovere L, Fabozzi G, Cimadomo D, Ubaldi FM. Perspectives in Gamete and Embryo Cryopreservation. *In Seminars in reproductive medicine*. 2018; 36:05, 253-264.

Rong Y, Ji SY, Zhu YZ, Wu YW, Shen L, Fan HY. ZAR1 and ZAR2 are required for oocyte meiotic maturation by regulating the maternal transcriptome

and mRNA translational activation. *Nucleic acids research*. 2019; 47(21):11387-402.

Rowlison T, Nagashima J, Acker JP, Ben R, Daly J, Hagedorn M, Comizzoli P. First Report of Successful Laser Warming for Frozen Gonadal Tissues and Oocytes in the Domestic Cat Model. *Biopreservation and Biobanking*. 2022; 0:0.

Ruijter JM, Ramakers C. LinRegPCR: Analysis of real-time quantitative PCR data. User Manual provided with software. 2003.

Rusciano G, De Canditiis C, Zito G, Rubessa M, Roca MS, Carotenuto R, Sasso A, Gasparrini B. Raman-microscopy investigation of vitrification-induced structural damages in mature bovine oocytes. *PLoS One*. 2017; 22;12(5):e0177677.

Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(10):1741-50.

Santos RR, Amorim C, Cecconi S, Fassbender M, Imhof M, Lornage J, Paris M, Schoenfeldt V, Martinez-Madrid B. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science*. 2010; 122(3-4):151-63.

Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011; 141(1):1-19.

Saraiva HF, Batista RI, Alfradique VA, Pinto PH, Ribeiro LS, Oliveira CS, Souza-Fabjan JM, Camargo LS, Fonseca JF, Brandao FZ. L-carnitine supplementation during vitrification or warming of in vivo-produced ovine embryos does not affect embryonic survival rates, but alters CrAT and PRDX1 expression. *Theriogenology*. 2018; 105:150-7.

Seidel Jr GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65(1):228-35..

Seki S, Mazur P. Kinetics and activation energy of recrystallization of intracellular ice in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling. *Cryobiology*. 2008; 56(3):171-80.

Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*. 2003; 9(6), 583-605.

Sirard MA, Coenen K. *In vitro* maturation and embryo production in cattle. In nuclear transfer protocols. *Humana Press*. 2006; 35-42.

Shahedi A, Hosseini A, Ali Khalili M, Yeganeh F. Vitriification affects nuclear maturation and gene expression of immature human oocytes. *Research in Molecular Medicine*. 2017; 5(1):27-33.

Snoeck F, Szymanska KJ, Sarrazin S, Ortiz-Escribano N, Leybaert L, Van Soom A. Blocking connexin channels during vitrification of immature cat oocytes improves maturation capacity after warming. *Theriogenology*. 2018; 122, 144-149.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*. 2007; 55(2):115-26.

Sowińska N, Müller K, Nizański W, Jewgenow K. Mitochondrial characteristics in oocytes of the domestic cat (*Felis catus*) after *in vitro* maturation and vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 52(5):806-13.

Sowińska N, Zahmel J, Nizański W, Hribal R, Fernandez-Gonzalez L, Jewgenow K. Meiotic status does not affect the vitrification effectiveness of domestic cat oocytes. *Animals*. 2020; 10(8):1371.

Sprícigo JF, Morató R, Arcarons N, Yeste M, Dode MA, López-Bejar M, Mogas T. Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes. *Theriogenology*. 2017; 89:47-57.

Swanson WF. Application of assisted reproduction for population management in felids: the potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*. 2006; 66(1):49-58.

Succu S, Gadau SD, Serra E, Zinellu A, Carru C, Porcu C, Naitana S, Berlinguer F, Leoni GG. A recovery time after warming restores mitochondrial function and improves developmental competence of vitrified ovine oocytes. *Theriogenology*. 2018; 110:18-26.

Sun WS, Jang H, Kwon HJ, Kim KY, Ahn SB, Hwang S, Lee SG, Lee JH, Hwang IS, Lee JW. The protective effect of *Leucosporidium*-derived ice-binding protein (LeIBP) on bovine oocytes and embryos during vitrification.

Theriogenology. 2020;151:137-43.

Taketsuru H, Tsukada YI, Kaneko T. Survivability and subsequent development of vitrified early-stage mouse embryos after warming at different temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022;591:50-3.

Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille MC. Human sperm vitrification: the state of the art. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020;18(1):17.

Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological endocrinology*. 2010;1;26(8):563-7.

Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, Di Carlo M, Santini S, D'Alessandro AM, Falone S, Amicarelli F. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015; 2015, 11.

Tatone C, Di Emidio G, Barbonetti A, Carta G, Luciano AM, Falone S, Amicarelli F. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Human reproduction update*. 2018; 24(3):267-89.

Tharasanit T, Manee-In S, Buarpung S, Chatdarong K, Lohachit C, Techakumphu M. Successful pregnancy following transfer of feline embryos derived from vitrified immature cat oocytes using 'stepwise' cryoprotectant exposure technique. *Theriogenology*. 2011; 76(8):1442-9.

Tomczak MM, Hinch DK, Estrada SD, Wolters WF, Crowe LM, Feeney RE, Tablin F, Crowe JH. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophysical journal*. 2002; 82(2):874-81.

Ugur MR, Saber Abdelrahman A, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019; 6:268.

Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reproductive Biomedicine Online*. 2015; 30(4):325-33.

Visintin JA, Martins JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicácio AC, Assumpção ME. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*. 2002; 57(1):345-59.

Wen Y, Zhao S, Chao L, Yu H, Song C, Shen Y, Chen H, Deng X. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. *Cryobiology*. 2014; 69(3), 394-401.

Wilson MC, Chen XY, Corlett RT, Didham RK, Ding P, Holt RD, Holyoak M, Hu G, Hughes AC, Jiang L, Laurance WF, Liu J, Pimm SL, Robinson SK, Russo SW, Si X, Wilcove DS, Wu J, Yu M. Habitat fragmentation and biodiversity conservation: key findings and future challenges. *Landscape Ecology*. 2016; 31:219–227.

Włodarczyk R, Bukowska D, Jackowska M, Mucha S, Jaskowski JM. In vitro maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. *Veterinárni medicína*. 2009; 54(10):491-7.

Wood TC, Wildt DE. Effect of the quality of the cumulus–oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts *in vitro*. *Reproduction*. 1997; 110(2), 355-360.

Wu X, Viveiros MM, Eppig JJ, Bai Y, Fitzpatrick SL, Matzuk MM. Zygote arrest 1 (Zar1) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature genetics*. 2003; 33(2):187-91.

Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2006;73(11):1454-62.

Xiang DC, Jia BY, Fu XW, Guo JX, Hong QH, Quan GB, Wu GQ. Role of astaxanthin as an efficient antioxidant on the in vitro maturation and vitrification of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2021; 167:13-23.

Yagoub SH, Lim M, Tan TC, Chow DJ, Dholakia K, Gibson BC, Thompson JG, Dunning KR. Vitrification within a nanoliter volume: oocyte and embryo cryopreservation within a 3D photopolymerized device. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2022; 39(9):1997-2014.

Yan CL, Fu XW, Zhou GB, Zhao XM, Suo L, Zhu SE. Mitochondrial behaviors in the vitrified mouse oocyte and its parthenogenetic embryo: effect of Taxol pretreatment and relationship to competence. *Fertility and Sterility*. 2010; 93(3):959-66.

Yong KW, Laouar L, Elliott JA, Jomha NM. Review of non-permeating

cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues. *Cryobiology*. 2020; 96, 1-11.

Zhuan Q, Li J, Du X, Zhang L, Meng L, Luo Y, Zhou D, Liu H, Wan P, Hou Y, Fu X. Antioxidant procyanidin B2 protects oocytes against cryoinjuries via mitochondria regulated cortical tension. *Journal of animal science and biotechnology*. 2022; 13(1):1-22.