



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SERTÃO
PARAIBANO - CAMPUS SOUSA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Lara de Alencar Bezerra

AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS ESTROMAIS EM FRAGMENTOS DE
TECIDO OVARIANO VITRIFICADO EQUINO

SOUSA – PB

2026

Lara de Alencar Bezerra

Avaliação da densidade de células estromais em fragmentos de tecido ovariano
vitrificado equino

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte das exigências
para a conclusão do Curso de graduação de
Bacharelado em Medicina Veterinária do
Instituto Federal do Sertão Paraibano,
Campus Sousa.

Orientador: Professor Dr. Francisco Léo Nascimento Aguiar

Coorientador: Professor Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Vasti Julieta Diniz Gomes Pina – Bibliotecária CRB 15/969

B574a Bezerra, Lara de Alencar.
Avaliação da densidade de células estromais em fragmentos de tecido ovariano vitrificado equino / Lara de Alencar Bezerra. - Sousa, PB, 2026.
33 p.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Bacharelado em Medicina Veterinária) - IFPB, 2026.
Orientador: Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento Aguiar.
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal.

1. Banco de germoplasma. 2. Folículos pré-antrais. 3. Microambiente ovariano. 4. Processamento histológico.
I. Título.

IFPB Sousa /

CDU



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
CAMPUS SOUSA

CURSO SUPERIOR DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE CÉLULAS ESTROMAIS EM FRAGMENTOS DE TECIDO OVARIANO EQUINO VITRIFICADO

Autor: Lara de Alencar Bezerra

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Campus Sousa como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado pela Comissão Examinadora em: 29/ julho /2026.

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCISCO LEO NASCIMENTO DE AGUIAR
Data: 18/08/2026 10:44:01-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professor Doutor Francisco Léo Nascimento de Aguiar
IFPB – Campus Sousa
Professor Orientador

Documento assinado digitalmente
gov.br ROSEANE DE ARAUJO PORTELA
Data: 18/08/2026 15:35:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professora Dra Roseane de Araújo Portela
IFPB – Campus Sousa
Examinadora 1

Documento assinado digitalmente
gov.br GUSTAVO DESIRE ANTUNES GASTAL
Data: 18/08/2026 15:56:39-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Professor Doutor Gustavo Gastal
Universidade Federal de Pelotas
Examinador 2

Dedico este trabalho a meu avô Everardo Teixeira Mendes (*in memoriam*), e ao seu sonho de ver sua neta se formar. Em quase 12 anos de ausência, aprendi que honrar sua memória é dedicar-me a cada dia, a persistir e a desbravar os caminhos, como o senhor sempre fez.

AGRADECIMENTOS

À instituição-mãe, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Paraibano (IFSPB), campus Sousa, por ter sido residência minha por tantos anos, fortalecendo-me e proporcionando conhecimento de forma gratuita e de excelente qualidade. Aos professores, funcionários e colaboradores que fazem a educação pública funcionar diariamente.

À instituição Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pela oportunidade de realização do estágio e do trabalho de conclusão de curso. Em especial expresso minha gratidão às orientações e acolhimento do Prof. Dr. Gustavo Desire Gastal e a Prof.^a Dra. Bruna Curcio, figuras principais para a minha inserção na universidade, sempre dispostos a me ajudar e me guiar nesse momento tão importante.

Ao ClinEq (Grupo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Medicina de Equinos) e FiBRA (Fisiopatologia e Biotécnicas da Reprodução Animal), projetos internos de pós-graduação e pesquisa do curso de Medicina Veterinária da UFPEL, que me permitiram transitar e aprender nesse universo grandioso da pesquisa em reprodução de grandes animais. Agradeço também a equipe de professores, pós-graduandos e alunos que também fizeram parte dessa caminhada.

Ao meu orientador e pai-científico, Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar, que me acolheu e sempre me estimulou a vencer desafios e fugir da zona de conforto.

À minha família, em destaque a minha mãe, Karen Beatriz, a avó Nicinha Almino, ao meu primo Luã Alencar - que desbravou as terras sousenses antes de mim- e a minha Madrinha Samara Alencar, cujo apoio e o amor se sobrepõem a qualquer dificuldade, distância e desafio.

Aos meus irmãos, Sofia e Heitor Cavalcante Bezerra, os quais amo de coração.

À Luiza Gheno, à Cantilena e à Frida, que me abrigaram e protegeram do frio gaúcho. Obrigada, minha amiga, por me ensinar a tomar mate, pelas viagens até o Rio Grande e as horas de música country e música emo dos anos 2000 durante contagens e dias difíceis. Sou eternamente grata pela sua amizade.

Aos meus amigos, Lara Fabian, Nataliane, Laura, Virgínia e Nathan pelo lar criado em Sousa no qual a saudade passou a morar. E a Indara Luana, Brenda Victória e Victor Juan, que sempre carregou no peito onde quer que eu invente de ir na próxima.

Ao meu Avô, Everardo Teixeira Mendes (*in memoriam*), a quem esse trabalho é dedicado, agradeço pelo amor, proteção e cuidado, de ti herdei a coragem e a perseverança (e talvez um pouco da teimosia). Saudades eternas.

RESUMO: As células estromais ovarianas são componentes menos estudados nas avaliações histológicas de fragmentos ovarianos submetidos a vitrificação, apesar de sua função de suporte, sustentação e ação androgênica durante foliculogênese e desenvolvimento de folículos pré-antrais (FOPAs). Este trabalho teve como objetivo comparar a densidade estromal de tecido ovariano equino submetidos ou não a vitrificação. Ovários oriundos de 5 éguas obtidos por ovariectomia laparoscópica foram submetidos a um protocolo de vitrificação com Etilenoglicol (EG) e trealose no meio base (α -MEM + 2,5 mM Hepes + 6% de Soro Fetal Equino), seguido de reaquecimento. Ambos fragmentos (seja vitrificado, seja controle fresco não vitrificado) foram seccionados em tamanho de cultivo padronizado (3x3x1 mm) e destinados ao processamento histológico clássico para avaliação da densidade das células estromais, visando compreender os impactos dessa técnica de preservação tecidual sobre o microambiente ovariano. Os achados elucidam que o material vitrificado ($44,68 \pm 0,57$ células/mm², Média $\pm$ EPM), apresentou densidade estromal significativamente maior no grupo vitrificado em comparação ao controle fresco não-vitrificado ($41,90 \pm 0,53$ células/mm²). Adicionalmente, a variação de idade entre as réplicas e a data de coleta do material pode influenciar a densidade estromal. Conclui-se, portanto, que a avaliação da densidade estromal constitui uma ferramenta relevante para a compreensão do microambiente ovariano e podem servir de base para o aperfeiçoamento de estratégias de preservação de espécies zootécnicas e biomédicas.

Palavras-chave: Banco de germoplasma; Folículos pré-antrais; Microambiente ovariano; Processamento histológico.

ABSTRACT: Ovarian stromal cells are less-studied components in histological evaluations of ovarian fragments subjected to vitrification, despite their role in providing support, sustenance, and androgenic activity during folliculogenesis and the development of preantral follicles (PAFs). The objective of this study was to compare the stromal density of equine ovarian tissue that had or had not undergone vitrification. Ovaries from 5 mares, obtained via laparoscopic ovariectomy, were subjected to a vitrification protocol using ethylene glycol (EG) and trehalose in the base medium (α -MEM + 2.5 mM HEPES + 6% fetal equine serum), followed by thawing. Both tissue fragments (whether vitrified or fresh, non-vitrified controls) were sectioned into standardized culture-sized pieces ($3 \times 3 \times 1$ mm) and subjected to conventional histological processing to assess stromal cell density, with the aim of understanding the impacts of this tissue preservation technique on the ovarian microenvironment. The findings show that the vitrified material (44.68 ± 0.57 cells/mm², mean $\pm$ SEM) exhibited a significantly higher stromal density in the vitrified group compared to the fresh, non-vitrified control (41.90 ± 0.53 cells/mm²). Additionally, age variation among the replicates and the date of material collection may influence stromal density. It can therefore be concluded that the assessment of stromal density is an important tool for understanding the ovarian microenvironment and can serve as a basis for improving strategies for the preservation of zootechnical and biomedical species.

Keywords: Germplasm bank; Preantral follicles; Ovarian microenvironment; Histological processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Anatomia comparativa ovariana da mulher e da égua	13
Figura 2 — Processo de vitrificação tecidual ovariana comparado ao congelamento lento e os impactos nas células estromais ovarianas.....	17
Figura 3 — Método de Contagem das células estromais utilizando o software ImageJ.....	20
Figura 4 — Média $\pm$ EPM da contagem de células estromais (por 2500mm ²) em fragmentos de tecido ovariano nos grupos controle fresco não vitrificado e grupo vitrificado.....	21
Figura 5 — Média $\pm$ EPM da contagem de células estromais (por 2500mm ²) em fragmentos de tecido ovariano em cada réplica avaliada nos grupos controle fresco não vitrificado e grupo vitrificado.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idades de cada réplica (R1 a R5) e data as quais as éguas foram submetidas a ovariectomia e processamento dos fragmentos de tecido ovariano.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

UFPEL – Universidade Federal de Pelotas

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

CNA - Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil

ECM – Matriz Extracelular

PBS - Solução Salina Tamponada Com Fosfato

EG – Etilenoglicol

FOPAs – Folículos Ovarianos Pré-Antrais

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira destaca-se entre as maiores do mundo, com um rebanho de 5,7 milhões de animais distribuídos por 1,7 milhão de estabelecimentos por todo o país (IBGE, 2024). A atividade desse setor produtivo movimenta cerca de R\$30 bilhões anualmente e emprega mais de 3 milhões de pessoas de forma indireta e direta (CNA, 2025). A expansão desse setor deve-se à expressividade do rebanho e à aplicação de biotécnicas de reprodução (CNA, 2025; Squires, 2020) que impulsionam o mercado interno e externo, com a comercialização de animais vivos e de seus materiais biotecnológicos.

As fêmeas da espécie equina diferem das demais espécies domesticadas, por ser uma espécie poliéstrica sazonal de fotoperíodo positivo. O ovário equídeo possui conformações morfológicas singulares, como a fossa ovulatória (exclusivo da égua) e a inversão das zonas medular e cortical ovarianas (Ono, 2015; Brito, 2022). Entretanto, tais características não impedem que o modelo equino seja de grandiosa importância para o estudo da dinâmica folicular ovariana comparativa com outras espécies de produção, bem como a humana (Alves et al., 2016; Benammar et al., 2021). Nesse cenário, o estudo da fisiologia reprodutiva das fêmeas equinas, especialmente no que concerne à dinâmica ovariana, torna-se ferramenta fundamental para a compreensão e o aprimoramento dos processos reprodutivos de diversas espécies de produção sendo, portanto, considerada um modelo de “duplo propósito-duplo benefício” (Gastal et al., 2020).

No entanto, para a adequada avaliação da dinâmica ovariana equina, os estudos nesta espécie dependem de rigorosas avaliações no que concerne a fatores morfofisiológicos como, por exemplo, a compreensão não somente da morfologia e densidade folicular (como classicamente avaliado), mas também da densidade de células estromais durante o processo de avaliação histológica do córtex ovariano (Costa, 2025). Esses parâmetros são indispensáveis como indicadores da proliferação das células da granulosa, células estromais e dos processos de neovascularização de folículos pré-antrais inclusos em tecidos ovarianos submetidos a desafios de processamento (como por exemplo, a vitrificação tecidual; Rodrigues, 2025). Apesar da participação das células estromais nos complexos processos da dinâmica folicular e do funcionamento ovariano, uma grande ênfase da pesquisa ovariana humana e animal tem se atentado majoritariamente aos processos concernentes a foliculogênese, enquanto que os processos relacionados a dinâmica tecidual do parênquima ovariano (Kinnear, et al. 2020), ou seja,

o microambiente no qual ocorre o desenvolvimento desses folículos, são menos estudados.

O uso da vitrificação de tecidos ovarianos objetivando a formação de bancos de germoplasma vem se tornando uma estratégia importante para a preservação da fertilidade humana e dos animais domésticos (Carvalho et al, 2011). A técnica de vitrificação consiste em um congelamento ultrarrápido das amostras visando impedir a formação de cristais de gelo intracelulares (Shi et al., 2017). Entretanto, durante a exposição do material biológico a temperaturas extremamente baixas, efeitos colaterais advindos de elevadas concentrações de agentes crioprotetores tóxicos, podem induzir o aumento do estresse oxidativo, contribuindo para o risco de morte celular (Silva L. et al., 2020; Gandolfi et al., 2006.).

Nos equinos, em relação a preservação de gametas (Giarretta, 2015), sêmen congelado (Alves et al., 2022) e fragmentos ovarianos (Carrijo, 2016), ainda são limitadas as investigações que abordem especificamente as alterações na densidade de células estromais em tecidos ovarianos submetidos à vitrificação. Nesse sentido, a avaliação da densidade de células estromais em tecidos ovarianos equinos submetidos à vitrificação ganha importância premente, por apresentar-se como uma ferramenta relevante para elucidar os efeitos desses protocolos sobre o microambiente ovariano e contribuir para o aprimoramento de técnicas de preservação da fertilidade de humanos e animais domésticos.

Diante da importância das células estromais para a manutenção do microambiente ovariano e dos potenciais efeitos da vitrificação sobre a integridade tecidual, hipotetiza-se que o processo de vitrificação promove alterações na densidade de células estromais do tecido ovariano equino, refletindo modificações no microambiente tecidual. Portanto, este estudo tem como objetivo comparar a densidade estromal de tecido ovariano equino submetido a um protocolo de vitrificação e reaquecimento com material fresco não vitrificado, usando fragmentos de tamanho de cultivo in vitro (3 x 3 x 1 mm), visando compreender os impactos dessa técnica de preservação tecidual sobre o microambiente ovariano.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Anatomia e morfofisiologia ovariana equina

Os ovários equinos situam-se na porção ventral próxima a 4 e 5ª vértebras lombares, com o ovário direito em posição mais cranial em comparação ao esquerdo. Possuindo

tamanho e textura dependentes da fase reprodutiva, com 2-4 cm no período de anestro e aumenta aos 6-8 cm na época reprodutiva (Bettencourt et al., 2018). Com superfície dupla, com um lado convexo, aderida ao mesovário, local que ocorre a irrigação e inervação do órgão, enquanto que em sua porção côncava e lisa, (Jones, Troxel, 2006) encontra-se a fossa ovulatória, sendo essa a localização na qual há a ovulação na espécie. Externamente, o ovário é envolvido por uma camada de epitélio superficial, o epitélio germinativo (Konig, Liebich, 2016; Oliveira et al., 2019).

Uma característica marcante da gônada feminina equina é a disposição invertida do córtex e medula. Ao contrário do observado em outras espécies domésticas, nessa espécie, a zona parenquimatosa ou cortical, com folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, formam o centro do órgão, que é envolvido por uma camada espessa, innervada e vascularizada composta de tecido conectivo, a medula. O suprimento sanguíneo da medula adapta-se proporcionalmente à atividade ovariana, em resposta à atividade endócrina do órgão e a presença de corpos lúteos no córtex (Ginther, 1992; Brinsko, 2010; Hafez, 2004). Essas conformações singulares estabelecem o modelo equino (Alves et al., 2016) como um importante pilar dos estudos da dinâmica folicular comparativa e do microambiente ovariano (**Figura 1**)

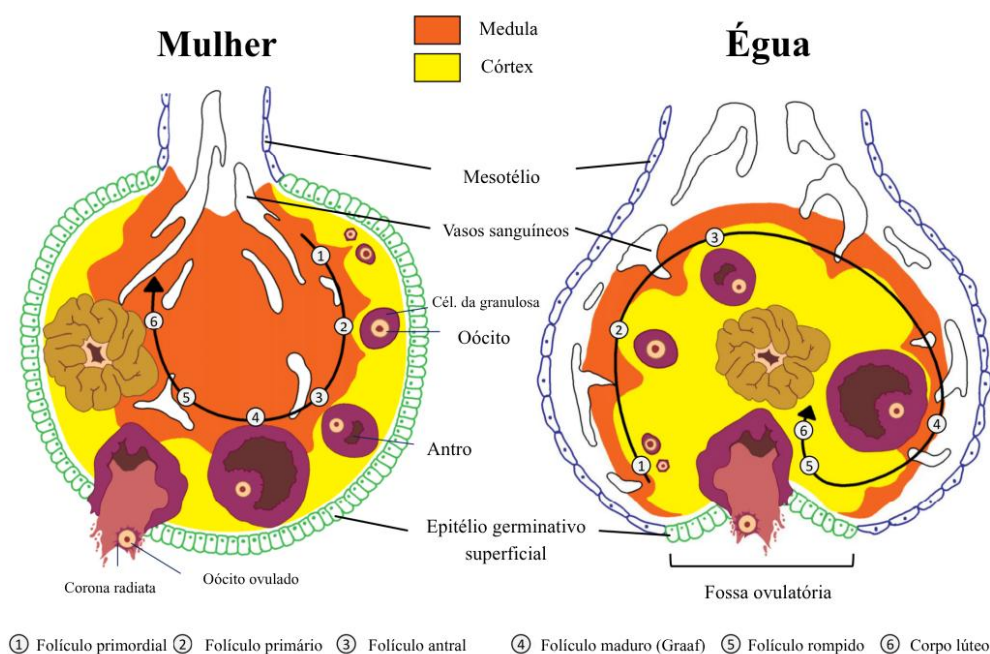


Figura 1 – Anatomia comparativa ovariana da mulher e da égua.

(Fonte: Benammar et al., 2021 adaptada.)

Nessa conjuntura, a heterogeneidade da distribuição espacial folicular equina é um conceito significativo para estudos com fragmentos teciduais da espécie (Alves et al.,

2018). Fatores como porção e regiões ovarianas influenciadas pela idade, classe folicular e morfologia ovariana determinam a distribuição espacial na camada cortical ovariana; os folículos pré-antrais de éguas jovens ficam mais próximos ao centro geométrico, enquanto que uma dispersão é observada com a mesma classe folicular em animais mais velhos (Alves et. al., 2018; Hyde et al., 2022). Estruturalmente, a camada cortical ovariana é composta por estruturas foliculares e estromais de caráter frouxo, sendo constituída de fibras colágenas (tipos I e III) e de agrupamentos de fibroblastos, denominados células estromais. O estroma, composto de células, matriz extracelular (MEC) e produtos metabólicos possuem uma função de suporte ao desenvolvimento folicular, apresentando uma complexa interação entre seus componentes. (Shen, 2023; Brito, 2022; Silva Y., 2020).

Portanto, a compreensão da anatomorfofisiologia ovariana equina é fundamental para o sucesso das biotecnologias reprodutivas, visto que, a avaliação de alterações de densidade e viabilidade das estruturas estromais é essencial para compreender o suporte físico e ambiental para o desenvolvimento folicular (Rodrigues, 2025). Dessa forma, a importância da investigação dos fatores de estresse relacionados aos processos de preservação tecidual como a vitrificação é fundamental para a compreensão de como o criodano pode alterar a densidade e comprometer a integridade do microambiente ovariano.

2.2. Foliculogênese e interação estroma-folículo

Os folículos ovarianos dependem de fatores extracelulares para seu recrutamento e desenvolvimento oocitário no parênquima cortical. A foliculogênese inicia na vida pré-natal com a formação dos folículos primordiais, culminando em folículos ovulatórios liberados no animal adulto (Leitão, 2018; Senger, 2005). Para a ativação desses folículos primordiais e progressão da maturação oocitária, a atividade de células adjacentes é essencial, com ação de substâncias parácrinas supressoras e moduladoras pelas células estromais e folículos próximos (Hyde et al., 2022; Kinnear, 2020).

As células estromais são caracterizadas pelo formato fusiforme e organização em espirais, com função importante endócrina e parácrina na manutenção, formação e desenvolvimento de corpos lúteos e folículos ovarianos. Durante esse processo, com o crescimento folicular, há a diferenciação dessas células estromais para células da teca que se subdividem em teca interna e teca externa. As células da teca interna são produtoras de andrógenos, contribuindo para a função endócrina das células estromais; As células da

teca externa são compostas de células similares a fibroblastos, importantes para a sobrevivência e manutenção dos folículos (Kinnear et al., 2020; König; Liebich, 2016; Liu, 2020). Em contrapartida, a ação parácrina das células estromais se dá pela secreção de moléculas biológicas ativas, incluindo moléculas reguladoras, como citocinas, fatores de crescimento e peptídeos bioativos capazes de influenciar células próximas (Kuchakzadeh et al., 2024; Lima, 2016).

A interação celular durante a maturação folicular surge também da interação bioquímica entre as células da teca, de origem estromal, e as células da granulosa, que como consequência, ajudam a promover o desenvolvimento folicular (Parrot; Skinner, 1998). A sintetização de reguladores endócrinos de crescimento e andrógenos pelas células da teca interna, integra-se no processo da conversão de andrógenos desses compostos em estrógenos, realizado pelas células da granulosa garantindo o suporte endócrino indispensável para a maturação folicular (Hummitzsch et al., 2015; Richards et al., 2017). Logo, a organização folicular equina constitui uma unidade funcional na qual a eficiência da granulosa, maturação folicular e desenvolvimento oocitário está relacionada à integridade e à densidade do conteúdo estromal ovariano.

As moléculas reguladoras secretadas pelo estroma influenciam a proliferação e a sobrevivência das células da granulosa, atuando como moduladores do ritmo da foliculogênese ao interagir em processos como morfologia celular, agregação, comunicação, proliferação e sobrevivência (Bottini, 2020; Kinnear, 2020; Berkholtz et al., 2006; Liu, 2020). Nesse sentido, a manutenção de uma densidade celular estromal adequada facilita para que esses sinais parácrinos alcancem os folículos (Aguiar et al., 2020), diminuindo o processo de atresia e facilitando a competência oocitária, especialmente em tecidos submetidos a desafios de processamento como aqueles submetidos à vitrificação.

2.3. Microambiente ovariano

O microambiente ovariano provê suporte nutricional e transporte de sinalizações para o crescimento de folículos, ovulação e formação de corpos lúteos, sendo também um componente essencial para a comunicação intercelular entre os diferentes tipos celulares presentes. Esse ambiente é composto pela matriz extracelular (MEC), células estromais, sistema vascular e imune, além de células tronco ovarianas. Nesse sentido, torna-se um pré-requisito para o desenvolvimento folicular e a maturação oocitária, nos quais a matriz extracelular e o estroma ovariano desempenham papel fundamental, contribuindo para o

suporte físico, bioquímico e parácrino necessário à foliculogênese (Shen et al., 2023; Guo et al., 2024; Woodruff; Shea, 2007).

A matriz extracelular ovariana (MEC) é composta por redes de proteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos responsáveis pela regulação de funções celulares como adesão, migração e proliferação pela interação célula-receptora e pela interação das células com fatores de crescimento sequestrados pela MEC. Essas interações se dão pela ação da MEC como uma reserva que é capaz de armazenar e liberar moléculas, controlando a biodisponibilidade durante o processo da foliculogênese (Kinnear et al., 2020, Tomaszewski et al., 2021). Nesse processo a constante remodelação da matriz acompanha a morfogênese, ancorando as células e regulando a diferenciação celular de acordo com o aumento do folículo, possibilitando a sustentação por envolver as células foliculares (Martins, 2020), interagindo com as células estromais para contribuir para o desenvolvimento e manutenção do microambiente folicular.

Nesse contexto, as células estromais participam do microambiente ovariano de forma dinâmica, exercendo um papel central no controle da síntese da matriz extracelular. Assim, a MEC permite o funcionamento ideal do nicho, por agir na síntese e secreção contínua de colágenos garantido pela população de fibroblastos (Boraldi et al., 2024), as quais se adaptam às variações e tensões geradas pelo desenvolvimento folicular. Paralelamente, o processo de mecanotransdução realizado pelo estroma ovariano influencia a atividade celular, no qual o estímulo mecânico é capaz de modular respostas bioquímicas (Wang; Yang, 2025). À vista disso, as interações do microambiente ovariano com o folículo, principalmente no que se diz a funcionalidade e percepção celular da MEC e do estroma, estabelecem o dinamismo complexo da foliculogênese e do suporte necessário para o desenvolvimento oocitário.

A integridade do microambiente ovariano está diretamente relacionada à organização e à quantidade de células presentes no estroma, sendo sua densidade um parâmetro relevante para a integridade tecidual. Dessa forma, a avaliação da densidade celular pode refletir o grau de preservação estrutural do tecido; *in vitro*, células estromais próximas aos folículos auxiliam no processo de neovascularização de folículos pré-antrais inclusos em tecidos ovarianos submetidos a desafios de processamento (como por exemplo, a vitrificação tecidual, Rodrigues, 2025), sobrevivência e qualidade de enxertos ovarianos (Gastal et al., 2017). A dinâmica das variações do nicho ovariano com a matriz extracelular e na integridade de células estromais, observadas em diferentes espécies como equinos (Alves et al., 2016), humanos (Grosbois et al., 2023) e bovinos (Catunda

et al., 2026) concretizam a relevância do microambiente ovariano para os estudos de biotecnologias reprodutivas, nas quais a avaliação da densidade de células estromais se destaca como um parâmetro importante para a investigação da integridade do tecido.

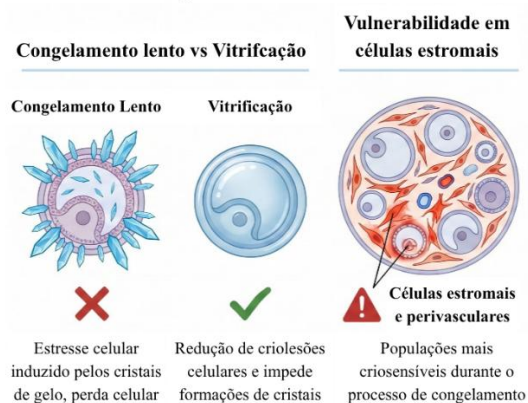
2.4. Preservação tecidual ovariana e vitrificação

A criação de bancos de germoplasma para a preservação da fertilidade humana e equina destaca-se como uma das aplicações de grande ênfase nos estudos de biotecnologias reprodutivas, sendo o modelo reprodutivo da égua um importante comparativo para os estudos em outras espécies, especialmente em relação ao da mulher (Alves et al., 2016; Benammar et al., 2021). Neste contexto, metodologias de criopreservação que sejam capazes de salvaguardar a qualidade do material gonadal são desejadas. Ademais, para suprir a necessidade da criopreservação de oócitos equinos e fragmentos ovarianos a utilização do método de vitrificação tecidual compõe uma alternativa à técnica do congelamento lento (Ming et al., 2024; Gastal et al., 2018).

A vitrificação consiste na desidratação do tecido à temperatura ambiente, por meio da exposição a soluções altamente concentradas de crioprotetores, seguida pelo congelamento ultrarrápido que evita a formação de cristais de gelo, permitindo que a solução passe do estado líquido ao estado vítreo (**Figura 2**) e possa então ser conservada a temperaturas ultrabaixas e posteriormente possa ser aquecida para uso (Hafez, 2004; Gastal et al., 2017). Entretanto, durante o processo de resfriamento e exposição do material a crioprotetores tóxicos, podem induzir o aumento do estresse oxidativo, contribuindo para o risco de morte celular.

Figura 2 - Processo de vitrificação tecidual ovariana comparado a congelamento lento e os impactos nas células estromais ovarianas.

Criopreservação de tecido ovariano



(Fonte: adaptado de Wu et al., 2026).

No contexto das células estromais, os achados experimentais são variáveis, nos quais a vitrificação pode preservar a integridade estromal de forma superior a outros métodos de criopreservação, mas o oposto também já foi observado (Behl et al., 2023). As alterações causadas as estruturas celulares estromais, estão associadas a danos oxidativos, que desorganizam o microambiente tecidual (Candelaria, 2024), podendo comprometer a viabilidade celular e a atividade folicular, além de impactar a densidade de células estromais.

A eficácia da vitrificação de tecido ovariano depende de vários fatores, como o método escolhido e a seleção de crioprotetores (Gandolfi et al., 2006). Diante disso, a compreensão da dinâmica de células estromais e sua interação com o microambiente ovariano torna-se fundamental para o aprimoramento das biotecnologias reprodutivas, particularmente no contexto da preservação de tecido ovariano. Neste cenário, a busca por protocolos de vitrificação que minimizem as criolesões e mantenham a integridade estrutural são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular. Dessa forma, a associação entre o conhecimento da morfofisiologia ovariana e o desenvolvimento de protocolos mais eficazes podem ampliar as aplicações dessas biotecnologias tão importantes para a reprodução equina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho de conclusão de curso (TCC) foi desenvolvido como parte de um projeto experimental mais amplo, no qual tecidos ovarianos equinos de éguas com diferentes condições clínicas foram submetidos a protocolos de vitrificação, com foco na avaliação da densidade de células estromais. O estudo encontra-se em desenvolvimento na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), com os procedimentos experimentais devidamente aprovados pelo Comitê de Ética da instituição (Protocolo n.º 12986-2021).

3.1. Coleta de amostras

Foram utilizados fragmentos ovarianos provenientes de éguas adultas SRD (n=5), não gestantes, obtidos após procedimento de ovariectomia unilateral por laparotomia no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Pelotas (HCV - UFPel), com idade de $6 \pm 3,01$ anos (média $\pm$ EPM), peso corporal médio de $321,4 \pm 24,89$ kg e classificadas em escore corporal médio de 7-8 (na escala em que 1 são considerados animais magros e 9 considerados obesos segundo Henneke et al., 1983).

3.2. Processamento dos fragmentos ovarianos

Imediatamente após a coleta, os ovários foram imersos com álcool 70% por 10 segundos, para desinfecção superficial e, em seguida, lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remoção de debris celulares. Em sequência, com auxílio de pinça anatômica e bisturi, os ovários, tiveram os tecidos adiposos e ligamentos adjacentes removidos, sendo então seccionados longitudinalmente conforme descrito por Alves et al. (2018), com exclusão de regiões contendo corpos lúteos e folículos antrais.

Foram obtidos 6 fragmentos de cada ovário (n= 5) de tamanho padronizado para cultivo in vitro 3 x 3 x 1 mm (C x L x A) seccionados entre o centro geométrico e a fossa ovulatória do ovário. O total de 30 fragmentos provenientes de 5 éguas foram distribuídos de forma aleatória em dois tratamentos: material fresco não vitrificado e material vitrificado, totalizando 6 fragmentos para cada tratamento, distribuídos aleatoriamente para avaliação histológica de rotina

3.3. Processamento histológico

Após a coleta, os fragmentos frescos e vitrificados foram fixados em Paraformaldeído 4% (PFA) conforme descrito por Gastal et. al (2017) e permaneceram em álcool 70% em temperatura ambiente até o processamento histológico clássico, no qual os fragmentos foram embebidos em parafina e cortados de forma seriada com 7 μ m de espessura, em comparação as secções de rotina que se utiliza de secções de 4-6 μ m. Em seguida, os fragmentos foram montados e coradas as lâminas com hematoxilina e eosina.

3.4. Protocolo de vitrificação

O protocolo de vitrificação foi realizado conforme descrito por Gastal et al. (2017). Utilizou-se placas de Petri contendo os fragmentos ovarianos obedecendo as seguintes soluções e intervalos de exposição: Solução de 0,3M Etilenoglicol (EG) e 0,5M de trealose no meio base (α -MEM + 2,5 mM Hepes + 6% de Soro Fetal Equino) por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram submersos na solução 1,5 EG em meio base por 1 minuto em temperatura ambiente. Os fragmentos foram então desumidificados, colocados em criotubos (1mL) submersos em nitrogênio líquido e armazenados. Para o reaquecimento, o criotubos foram expostos a temperatura ambiente sendo, em seguida, imersos em água na temperatura de 37°C durante 1 minuto. Imediatamente após a imersão, os fragmentos foram submetidos a concentrações decrescentes de sacarose (0,5, 0,25 e 0 M em meio base) por 5 minutos entre cada solução para remoção de crioprotetores.

3.5. Densidade Estromal

A densidade estromal foi determinada através da leitura da lâmina histológica, localizando os núcleos localizados no estroma cortical dos fragmentos processados por histologia clássica, nos quais 10% das secções histológicas obtidas de cada fragmento ovariano serão analisadas conforme previamente descrito (Gastal et al., 2017) Foram totalizadas 60 imagens por réplica e 5 quadrantes ($50 \times 50 \mu\text{m} = 2,500 \mu\text{m}^2$ cada) contabilizados aleatoriamente por imagem. Ao todo, foram analisadas 600 imagens, totalizando 3000 quadrantes. Foram removidos da contagem os folículos pré-antrais, vasos sanguíneos e artefatos histológicos remanescentes. As imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital (Olympus DP-72) acoplada a microscópio óptico (Nikon 236 Eclipse 50i/55i; Morrell Instrument Co., Inc., Melville, NY, USA) e com uso do ImageJ software (versão 1.53s) para análise. Os resultados foram expressos como número de células por milímetro quadrado (células/ μm^2).

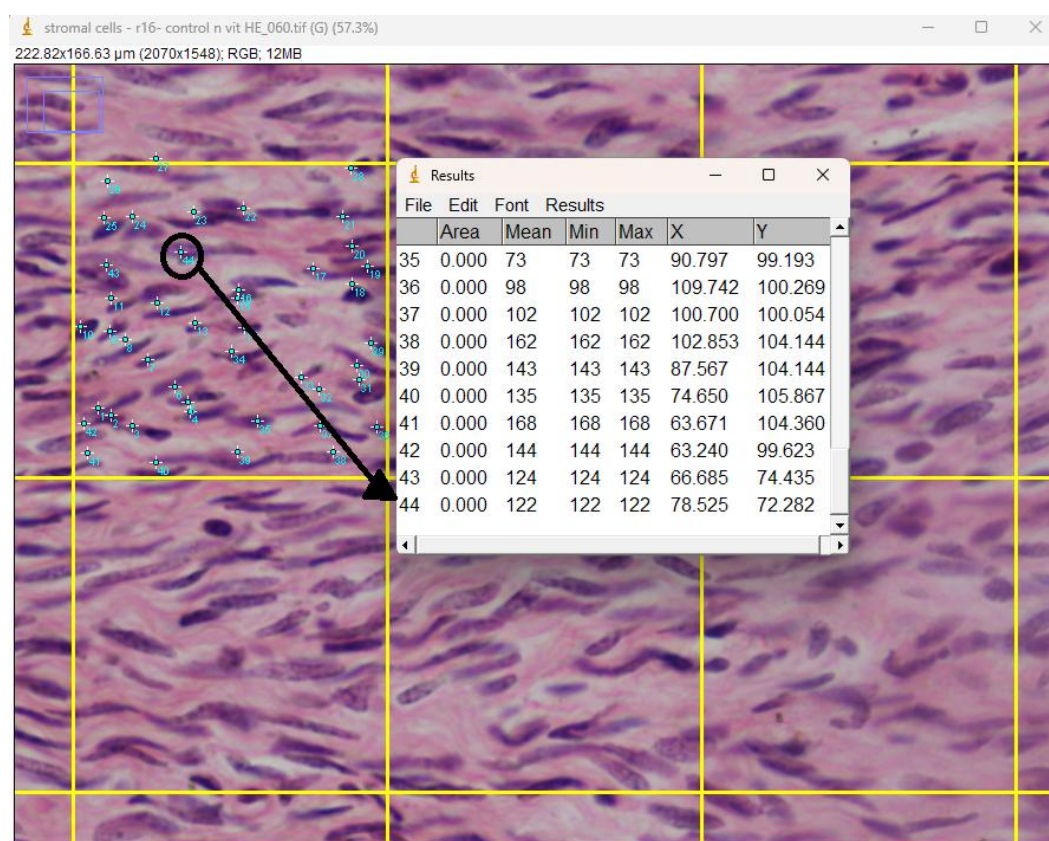


Figura 3 – Método de Contagem das células estromais de fragmento ovariano equino utilizando o software ImageJ (versão 1.53s). Fonte: a autora.

3.6. Análise estatística

Os dados referentes aos números de células estromais contabilizados neste trabalho foram analisados por meio de Modelos Lineares Mistos Generalizados (MLMG

ou GLMM) com a distribuição de Poisson, no software R (versão 4.6.0, R Core Team, 2026). Para os resultados, o tratamento foi estabelecido como um efeito fixo e a contagem das imagens obtidas de cada réplica, efeito aleatório. A diferença entre ambos os grupos (Controle não vitrificado x vitrificado) foi avaliada com o teste de Tukey, considerando os resultados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado um aumento de células estromais em grupos vitrificados em relação ao controle fresco. A média de células estromais do grupo controle não vitrificado foi de $41,90 \pm 0,53$ células/ μm^2 (Média $\pm$ EPM), enquanto que o grupo vitrificado obteve um número significativamente maior ($p < 0,05$) de células estromais, contabilizando, em média $44,68 \pm 0,57$ células/ μm^2 (**Figura 4**).

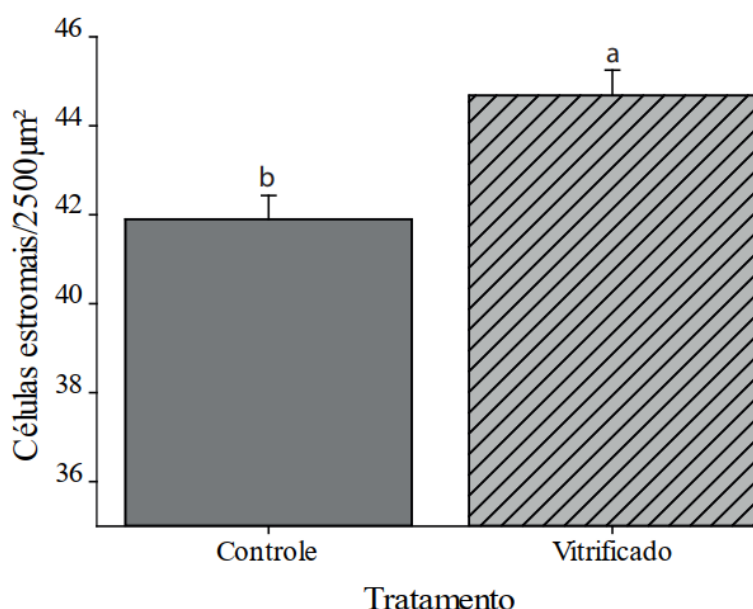


Figura 4 - Média $\pm$ EPM da contagem de células estromais (por $2500\mu\text{m}^2$) em fragmentos de tecido ovariano equino nos grupos controle fresco não vitrificado e grupo vitrificado. ^{a,b}(Letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)).

O processo de vitrificação evita a formação de cristais de gelo durante o processamento. De forma que a desordem natural das moléculas de água e solutos é preservada, minimizando o impacto dos sistemas a serem preservados em comparação a outros métodos criopreservantes como o congelamento lento (Behl et al., 2023). Nesse processo, as células sobrevivem pelo aumento da concentração de solutos dentro da célula por osmose que impede o congelamento total do tecido durante transição vítrea, que também facilita o processo de contratilidade das soluções para equilíbrio (Wowk,

2010). Dessa forma, a diminuição de volume de água, e aproximação das células estromais uma das outras, poderiam parcialmente explicar o aumento da densidade das células estromais contabilizadas nas amostras, por sua posição espacial mudar durante o processo de vitrificação. É importante ressaltar que o tecido estromal constitui um ambiente dinâmico, com variações de organização durante o desenvolvimento folicular, fator discutido por estudos recentes, como o de Sheng et al. 2022, que reiteram a plasticidade e adaptação da densidade desse grupo celular diante de diferentes estímulos que se assemelha ao apresentado nesse trabalho.

Apesar das alterações osmóticas e estruturais potencialmente contribuir para a maior densidade celular observada nos fragmentos vitrificados, outros estudos relatam comportamentos diferentes das células estromais após a criopreservação. Relatos prévios em humanos (Behl et al., 2023; Shi et al., 2017) e bovinos (Santana et al. 2025; Candelaria et al., 2024) demonstraram que o grupo controle fresco apresenta maior densidade de células estromais em comparação aos fragmentos analisados após vitrificação. Vale ressaltar que nesses estudos, a metodologia de contagem estromal e a proporção dos quadrantes é diferente, com um menor número de contagens ou com mais quadrantes de menor proporção (10 quadrantes com área de $100\mu\text{m}^2$ comparada com 5 quadrantes de $2500\mu\text{m}^2$) o que pode explicar em parte os resultados discrepantes observados neste estudo.

Outra explicação para essas divergências pode ser relacionada a outras variáveis como o protocolo de vitrificação utilizado, no que concerne as características inter-específicas da técnica e ao uso de diferentes crioprotetores em diferentes concentrações. No entanto, ao avaliar outros estudos sobre contagem de células estromais em equinos, como o de Gastal et al. 2017, que utilizaram proporções de fragmentos similares ao deste trabalho e também avaliaram as imagens com proporções parecidas, os achados se assemelham. De fato, Gastal et al., 2017 demonstrou um aumento no número de células estromais durante a contagem do grupo vitrificados em comparação ao grupo controle fresco e ao protocolo de congelamento lento.

A análise individual dos tratamentos entre as réplicas avaliadas pode ampliar o conhecimento e a interpretação sobre o comportamento de cada réplica individualmente em relação ao tratamento. Isso ganha relevância uma vez que estudos prévios demonstraram efeitos individuais nos animais avaliados. Diante disto, foi observado uma contagem de células estromais significativamente superior ($p < 0,05$) no tratamento vitrificado nas réplicas R1, R4 e R5 em comparação ao grupo controle não vitrificado. A

réplica R4 sobressaiu em relação aos demais ($57,92 \pm 0,67$ células/mm²), seguida pela R5 ($56,33 \pm 0,54$ células/mm²), quando comparadas com as outras réplicas (**Figura 5**). Em relação ao grupo controle, um achado similar foi observado, no qual novamente as réplicas 4 ($49,63 \pm 0,47$ células/mm²) e 5 ($49,40 \pm 0,52$ células/mm²) apresentaram um número maior de células estromais em comparação as demais réplicas (**Figura 5**). Vale observar que as réplicas R2 e R3 apresentaram padrão inverso, onde a densidade de células estromais foi maior no grupo controle não vitrificado em comparação ao grupo vitrificado. Todavia, não houve diferença na comparação dentro dos tratamentos (controle não vitrificado ou vitrificado) quando comparando as réplicas entre si.

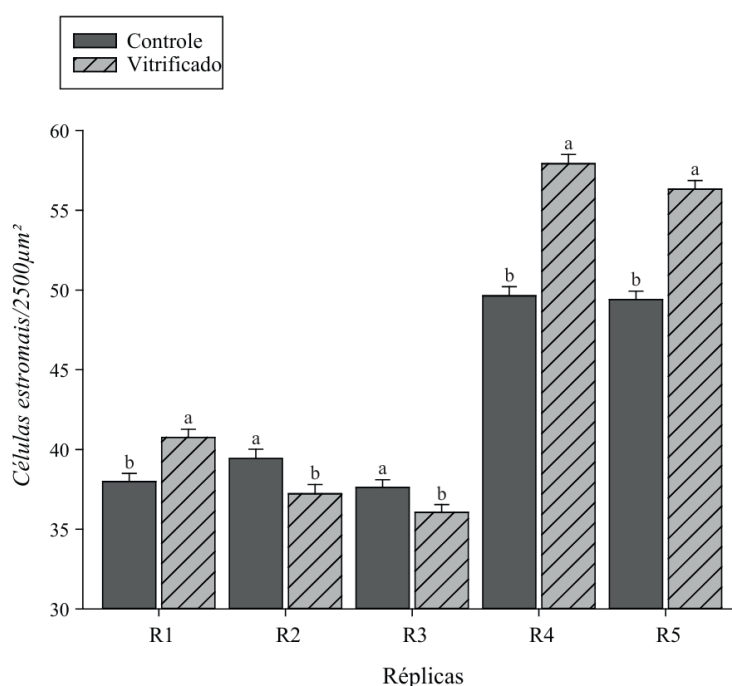


Figura 5 – Média $\pm$ EPM da contagem de células estromais (por 2500µm²) em fragmentos de tecido ovariano equino em cada réplica avaliada nos grupos controle fresco não vitrificado e grupo vitrificado. ^{a,b}(Letras diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$)).

As réplicas de maior contagem, curiosamente, são oriundas dos animais mais jovem (R4) e mais velho do experimento (R5), com 2 e 18 anos, (**Tabela 1**) respectivamente. Conforme descrito por outros autores, como Alves et. al., 2018 e Hyde et al., 2022, a idade é um fator importante para a compreensão da disposição espacial de folículos pré-antrais (FOPAS) no córtex ovariano, no qual animais mais jovens tendem a ter FOPAS mais próximos ao centro geométrico ovariano, enquanto que os mais velhos apresentam FOPAS distribuídos mais distantes do centro geométrico. Na metodologia desse trabalho, optou-se por obter fragmentos ovarianos baseados nesses

achados, privilegiando o corte de tecido ovariano rico em FOPAS localizado entre o centro geométrico e a fossa ovulatória. Nesse contexto, ao considerar a interação dos folículos e das células estromais, que circundam os folículos permitindo o desenvolvimento folicular em razão da sua função estrutural e parácrina, é possível que regiões com maior concentração folicular, apresentem também maior densidade estromal. Entretanto, essa hipótese não foi avaliada diretamente no escopo desse estudo e requer mais investigações para sua confirmação.

Tabela 1 – Idades de cada réplica (R1 a R5) e data as quais as éguas foram submetidas a ovariectomia e processamento dos fragmentos de tecido ovariano.

Réplica	Idade (anos)	Data da coleta
R1	4	14/09/2022
R2	3	21/09/2022
R3	3	23/09/2022
R4	2	18/07/2023
R5	18	03/04/2024

Outro aspecto importante nos trabalhos realizados com a espécie equina, é a sazonalidade reprodutiva (Brito, 2022) que influencia a ciclicidade, atividade ovariana e, consequentemente, a densidade de células estromais. No estado do Rio Grande do Sul, onde foi realizado as coletas e processamentos desse trabalho, há uma boa definição das estações do ano, com diferenças perceptíveis do fotoperíodo, fator primário da modulação da dinâmica folicular nas éguas. A sazonalidade reprodutiva é mediada pela melatonina, secretada pela glândula pineal em resposta a estímulos luminosos captados na presença de luz. Esse hormônio interfere via o eixo hipotalâmico-hipófise-gônadal, na concentração circulante de FSH e LH, hormônios responsáveis pela ciclicidade e retorno as etapas que precedem o estro (Ginther et al., 2004; Coelho et al., 2023).

No presente trabalho, ao avaliar a data de coleta e processamento dos fragmentos ovarianos das réplicas (**Tabela 1**), podemos observar que entre as réplicas R1, R2 e R3, foram realizadas no mês de setembro, durante a transição final do inverno e início da primavera, próxima ao fim dos dias mais longos do ano. Adicionalmente a réplica 5 foi coletada durante o outono, e a réplica com maior número de contagens (4), em julho. Esses dados divergem-se ao que Alves et al., (2016) observaram ao avaliar biópsias

ovarianas em éguas durante a fase de diestro, onde o número de células estromais foi bem maior quando comparada as biópsias realizadas em éguas em anestro. Essa divergência pode estar relacionada, ao menos em parte, às diferenças metodológicas entre os estudos, como as distintas formas de obtenção e processamento do tecido ovariano, características dos próprios fragmentos corticais, como seu tamanho e metodologia de fragmentação que podem influenciar a preservação e organização do estroma. (Aguilar et al., 2020). Adicionalmente, é possível que a variação climática entre as coletas exerça influência indireta com a dinâmica folicular, podendo influenciar a densidade estromal pela influência do fotoperíodo, contribuindo para a variabilidade observada entre as réplicas.

Em conjunto, os achados deste estudo reforçam a importância da avaliação da densidade estromal como componente da análise da qualidade de tecido ovariano submetido a desafios de processamento como a vitrificação. As diferenças observadas entre os tratamentos demonstram que o estroma ovariano possui um dinamismo e plasticidade ao interagir com as variações associadas a vitrificação e, também, as variações biológicas entre os animais. Dessa forma, a inclusão desses parâmetros estromais em estudos sobre a preservação tecidual ovariana, associando-os ao efeito da morfologia e densidade foliculares é de fundamental importância para a obtenção de uma melhor compreensão dos impactos sobre a vitrificação neste microambiente, fornecendo uma base para protocolos cada vez mais seguros e viáveis para a preservação da fertilidade na espécie equina e em consequência, em outros modelos animais e humanos.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto que a avaliação estromal por meio da contagem celular constitui uma ferramenta relevante para a compreensão do microambiente ovariano e folicular, uma vez que as células estromais desempenham papel essencial na manutenção da homeostase tecidual, no desenvolvimento e na sobrevivência folicular. Embora alterações decorrentes dos desafios de processamento sejam esperadas, esse trabalho observou o aumento de células estromais vitrificadas em relação ao grupo controle fresco, fator associado ao dinamismo das células estromais estudadas, que ainda são pouco exploradas nos estudos de reprodução animal e humana, trazendo a necessidade fundamental para o aprimoramento e a melhor compreensão deste dinamismo. Ademais, a preservação da integridade do estroma ovariano destaca-se como um fator importante para a manutenção da viabilidade folicular, contribuindo para o avanço das biotécnicas

reprodutivas e para a expansão de bancos de germoplasma da espécie equina. Finalmente, o progresso em estudos dessa população celular pode servir de base para o aperfeiçoamento de estratégias de preservação em outras espécies de interesse zootécnico e biomédico.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. L. N. et al. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 296-309, 2020.
- ALVES, B. G. et al. Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198108, 2018.
- ALVES, K. A. *et al.* The Mare Model to Study the Effects of Ovarian Dynamics on Preantral Follicle Features. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-18, 22 fev. 2016. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0149693>.
- ALVES, N. C. *et al.* Resveratrol addition to freezing equine semen extender influence the number of sperm bound to bovine oviduct explants. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 113, p. 103696, 2022.
- BEHL, S. *et al.* Vitrification versus slow freezing of human ovarian tissue: a systematic review and meta-analysis of histological outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 40, n. 3, p. 455-464, 2023.
- BENAMMAR, A. *et al.* The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies? **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2304, 2021.
- BERKHOLTZ, C. B. *et al.* Extracellular matrix functions in follicle maturation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 24, n. 4, p. 262–269, 2006.
- BETTENCOURT, E. M. V *et al.* Anatomia reprodutiva da égua. In: BETTENCOURT EMV. **Reprodução em equinos: Manual Prático**. Évora: Évora, 2018. Cap. 3. p. 48-49. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10174/26399>. Acesso em: 21 jun. 2026.
- BOTTINI, A. L. **Cultura de tecido ovariano: padronização e análise histológica**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.
- BRINSKO, S. P *et al.* Reproductive Anatomy of the mare. In: BRINSKO, Steven P *et al.* **Manual of Equine Reproduction**. 3. ed. Maryland: Elsevier Health Sciences, 2010. Cap. 1. p. 1-3.
- BORALDI, F. *et al.* The Role of Fibroblasts in Skin Homeostasis and Repair. **Biomedicines**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1586, 17 jul. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12071586>.
- BRITO, M. V. G. C. *et al.* **Princípios fisiológicos reprodutivos da fêmea equina, aplicados à abordagem da técnica de inseminação artificial**. 2022. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário Brasileiro, Recife, 2022.
- CANDELARIA, J. I. *et al.* Assessment of ovarian tissue and follicular integrity after cryopreservation via slow freezing or vitrification followed by in vitro culture. **F&S Science**, v. 5, n. 2, p. 154-162, 2024.

CARRIJO, R. F. **Vitrificação de tecido ovariano equino em diferentes concentrações de resveratrol: 10 μ M e 20 μ M**. 2022. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

CARVALHO A.A. et al. Vitrificação: Uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinária Brasilica**, v.5, n.3, p.236, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.21708/avb.2011.5.3.2321>.

CATUNDA, M. B. A. *et al.* Effects of Resveratrol-Loaded Nanoparticles on Follicular Survival, Stromal Integrity and Activity of Endogenous Free-Radical Scavengers in Bovine Ovarian Cortical Slices Cultured In Vitro. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 70158-70167, 28 jan. 2026. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.70158>.

COELHO, L. A. et al. Seasonal Variation of Melatonin Concentration and mRNA Expression of Melatonin-Related Genes in Developing Ovarian Follicles of Mares Kept under Natural Photoperiods in the Southern Hemisphere. **Animals**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1063, 15 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ani13061063>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/6/1063>. Acesso em: 21 jun. 2026

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). **Mercado Mundial de Equídeos**. Brasília, DF: CNA, 2024. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/publicacoes/mercado-mundial-de-equideos>. Acesso em: 17 mar. 2026.

COSTA, F. C. **Remodelação do córtex ovariano durante o cultivo in vitro e efeitos de bioandaimes descelularizados e nanopartículas poliméricas carregadas com resveratrol no crescimento e viabilidade de folículos secundários bovinos**. 2025. 194 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025.

DU, M. *et al.* Optimization of vitrification methods for equine oocytes. **Tissue And Cell**, [S.L.], v. 91, p. 102632, dez. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2024.102632>.

GANDOLFI, F. *et al.* Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 1150-1156, 2006.

GASTAL, G. D. A. et al. Effects of cryoprotectant agents on equine ovarian biopsy fragments in preparation for cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 86-93, 2017.

GASTAL, G.D.A. et al. Effect of cryopreservation techniques on proliferation and apoptosis of cultured equine ovarian tissue. **Theriogenology**, [S.L.], v. 126, p. 88-94, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.034>.

GIARETTA, E. **Effect of antioxidant supplementation on pig and horse gamete storage**. 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bolonha, Itália, 2015.

- GINTHER, O. J. et al. Seasonal influence on equine follicle dynamics. **Animal Reproduction: (AR)**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 31-44, dez. 2004. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a608bf7783717068b480c/pdf/animreprod-1-1-31.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2026
- GROSBOIS, J. et al. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. **Human Reproduction**, v. 38, n. 3, p. 444-458, 2023.
- GUO, Y. et al. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. **Human Reproduction Update**, v. 30, n. 5, p. 614-647, 2024.
- HAFEZ, E.S..E; HAFEZ, B.. Foliculogênese, Maturação Ovocitária e Ovulação. In: HAFEZ, E.s.e.; HAFEZ, B.. **Reprodução animal**. 7. ed. Baueri: Manole, 2004. Cap. 5. p. 71-85.
- HENNEKE DR, POTTER GD, KREIDER JL, YEATES BF. Relationship 588 between condition score, physical measurements and body fat percentage in 589 mares. *Equine Vet J* 1983;15:371–2. <https://doi.org/10.1111/j.2042-5903.1983.tb01826>.
- HUMMITZSCH, K. et al. Stem cells, progenitor cells, and lineage decisions in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 36, n. 1, p. 65-91, 2015.
- HYDE, K. A. et al. Preantral follicle population and distribution in the horse ovary. **Reproduction and Fertility**, v. 3, n. 2, p. 90-102, 2022.
- HYDE, K. A. *et al.* Characterization of preantral follicle clustering and neighborhood patterns in the equine ovary. **Plos One**: Public Library of Science, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 0275396, 4 out. 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0275396>.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Rebanho de equinos (cavalos) no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2024. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>. Acesso em: 17 mar. 2026.
- JONES, S. M.; TROXEL, T. R. Understanding reproductive physiology and anatomy of the mare. **Agriculture and Natural Resources**. FSA (University of Arkansas (System). Cooperative Extension Service), Arkansas. United States Department of Agriculture, and County Governments Cooperating. 2006.
- KINNEAR, H. M. *et al.* The ovarian stroma as a new frontier. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. R25-R39, 2020.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- KUCHAKZADEH, F. *et al.* Tissue engineering and stem cell-based therapeutic strategies for premature ovarian insufficiency. **Regenerative Therapy**, v. 25, p. 10-23, 2024.

LEITÃO, C. C. F. *et al.* Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 215, 30 mar. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
<http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.16332>

LIMA, L. F. *et al.* Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. **Reprodução & Climatério**, v. 31, n. 2, p. 93-104, 2016.

LIU, T. *et al.* Where are the theca cells from: the mechanism of theca cells derivation and differentiation. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 14, p. 1711-1718, 2020.

MARTINS, E. A. F. **Avaliação histomolecular da dimensão fractal e da remodelação da matriz extracelular durante o desenvolvimento ovariano de fetos bovinos**. 2020. 65 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Fisiologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2020.

OLIVEIRA, H. G *et al.* Fisiologia e fatores interferentes na reprodução de éguas. **Ciência Animal**, v. 29, n. 4, p. 112-123, 2019.

ONO, M. *et al.* Analysis of the equine ovarian structure during the first twelve months of life by three-dimensional internal structure microscopy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 12, p. 1599-1603, 2015.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M.I K. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2240-2245, 1998.

RICHARDS, J. S. *et al.* Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. **Endocrine reviews**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2018.

RODRIGUES, A. P. R. *et al.* Avanços na vitrificação e subsequente cultivo in vitro de tecido ovariano e testicular de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 26-37, 2025.

SANTANA, P. S. *et al.* Morphological changes in ovarian follicles, stromal cells, and extracellular matrix in cryopreserved cattle ovarian tissue and the beneficial effects of Croton argyrophyllus Kunth essential oil. **Cryobiology**, [S.L.], v. 121, p. 105338, dez. 2025. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2025.105338>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0011224025001440?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jun. 2026.

SENGER, P L. **Pathways to Pregnancy & Parturition**. 3. ed. Washington: Itpo-Usa, 2005. 393 p.

SHEN, Lu *et al.* The stromal microenvironment and ovarian aging: mechanisms and therapeutic opportunities. **Journal of ovarian research**, v. 16, n. 1, p. 237, 2023.

SHI, Q. *et al.* Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 8538-8547, 17 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09005-7>.

SHENG, Xiaoqiang *et al.* Temporal and spatial dynamics mapping reveals follicle development regulated by different stromal cell populations. **BioRxiv**, p. 2022.03. 04.480328, 2022. Acesso em: 17 jun. 2026

SILVA, L. M. *et al.* Importância da utilização de ácido alfa lipóico (ALA) e catalase (CAT) no processo de vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais, visando reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo. **Revista de Medicina da UFC**, v. 60, n. 1, p. 41-46, 2020.

SILVA, P. Y. **Parâmetros morfofuncionais do tecido ovariano submetido ao transplante heterotópico**. 2020. 146 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2020.

SQUIRES, E. Current reproductive technologies impacting equine embryo production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102981, 2020.

TOMASZEWSKI, C. E. *et al.* Sequestered cell-secreted extracellular matrix proteins improve murine folliculogenesis and oocyte maturation for fertility preservation. **Acta biomaterialia**, v. 132, p. 313-324, 2021.

WANG, H.; YANG, L. Ovarian mechanobiology: understanding the interplay between mechanics and follicular development. **Cells**, v. 14, n. 5, p. 355, 2025.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. The Role of the Extracellular Matrix in Ovarian Follicle Development. **Reproductive Sciences**, [S.L.], v. 14, n. 8, p. 6-10, dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719107309818>.

WOWK, Brian. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 11-22, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.007>.

WU, Hsin-Hung. Technological Advances of Cryopreservation in Ovarian Tissue for Female Children: Exploring the Molecular Insights and Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 27, n. 12, p. 5186, 2026.

	INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA
	Campus Sousa - Código INEP: 25018027
	Av. Pres. Tancredo Neves, S/N, Jardim Sorrilândia III, CEP 58805-345, Sousa (PB)
	CNPJ: 10.783.898/0004-18 - Telefone: None

Documento Digitalizado Ostensivo (Público)

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - LARA DE ALENCAR BEZERRA

Assunto:	TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - LARA DE ALENCAR BEZERRA
Assinado por:	Lara Alencar
Tipo do Documento:	Dissertação
Situação:	Finalizado
Nível de Acesso:	Ostensivo (Público)
Tipo do Conferência:	Cópia Simples

Documento assinado eletronicamente por:
▪ **Lara de Alencar Bezerra, DISCENTE (202118730008) DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA - SOUSA**, em 18/08/2026 18:13:50.

Este documento foi armazenado no SUAP em 18/08/2026. Para comprovar sua integridade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifpb.edu.br/verificar-documento-externo/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 1956228
Código de Autenticação: 32764d4cef

