



<b>Evento</b>	Salão UFRGS 2018: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
<b>Ano</b>	2018
<b>Local</b>	Campus do Vale - UFRGS
<b>Título</b>	Avaliação da integridade morfológica de oócitos imaturos de Piracanjuba após a criopreservação de tecido ovariano
<b>Autores</b>	GABRIELA THAIS PINHEIRO LIS SANTOS MARQUES
<b>Orientador</b>	DANILO PEDRO STREIT JÚNIOR

## **RESUMO**

### **TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da integridade morfológica de oócitos imaturos de Piracanjuba após a criopreservação de tecido ovariano**

Aluno: Gabriela Thais Pinheiro

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

### **RESUMO DAS ATIVIDADES**

---

#### 1. Introdução:

A criopreservação é uma tecnologia promissora na preservação do genoma de peixes, sejam espécies ameaçadas de extinção ou de grande valor zootécnico e comercial, assim sendo uma ferramenta de grande relevância para programas de conservação e reprodução.

A Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é um peixe teleósteo, neotropical de ocorrência natural nas bacias do Rio da Prata, Uruguai, Paraguai e Paraná. É um peixe reofílico que realiza grandes migrações para se reproduzir. No entanto, a construção de barragens, a poluição das águas e o desmatamento de matas ciliares culminou no declínio da espécie. Na aquacultura tem se observado a predominância de indivíduos do sexo masculino, fator que contribui na redução da variabilidade genética e que também afeta o sucesso na reprodução, uma vez que a população de fêmeas é menor.

O sucesso na criopreservação de oócitos de peixes ainda não foi atingido com êxito, uma vez que apresentam tamanho grande e elevado conteúdo de lipídios, que aumentam as chances de rompimento de membranas durante a criopreservação.

Nesse contexto, a criopreservação de tecido ovariano contendo oócitos imaturos é uma alternativa promissora, uma vez que oócitos ovarianos em estágio inicial apresentam um menor tamanho, maior permeabilidade de membrana e menor quantidade de lipídios e organelas quando comparadas aos oócitos maduros. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de três diferentes soluções crioprotetoras sobre a morfologia de oócitos imaturos (em crescimento primário) presentes em fragmentos de tecido ovariano de *B. orbignyanus*.

#### 2. Atividades realizadas:

##### 2.1 Animais e coleta

Quatro fêmeas ( $266,65 \pm 266,65 \pm 76$  g,  $26,8 \pm 2,27$  cm) de dois anos foram mantidas em caixas de 500 L em sistema de recirculação e alimentadas duas vezes ao dia até a saciedade aparente. Os parâmetros de qualidade de água foram avaliados semanalmente (pH médio 7,5; temperatura média de 27°C).

Os animais foram eutanasiados por meio de dose letal de tricáina metanosulfato (0,6 mg/mL), seguida de decapitação. As gônadas foram coletadas e quatro fragmentos de 2 x 10 mm foram obtidos de cada fêmea.

##### 2.2 Exposição aos crioprotetores e resfriamento

Os fragmentos (n=16) foram distribuídos entre os seguintes tratamentos: solução de vitrificação (SV) 1 (1,5 M Metanol + 4,5 M propilenoglicol); SV2 (1,5 M Metanol + 5,5 M Me<sub>2</sub>SO); SV3 (2,5 M etilenoglicol + 2 M Me<sub>2</sub>SO + 0,5 M Sacarose); ou grupo controle (não

criopreservado; fixado diretamente para histologia). Cada fragmento foi transferido com o mínimo volume de SV para criotubos de 2 mL, que em seguida foram submersos em nitrogênio líquido (NL).

### 2.3 Aquecimento

Os criotubos foram aquecidos à 28°C por 90 s, em seguida, as amostras foram expostas às seguintes soluções de sacarose: 1 M por 1 min, 0,5 M por 3 min e 0,25 M de sacarose por 5 min.

### 2.4 Histológica

Os fragmentos de tecido ovariano foram fixadas em formol tamponado 10%, processados com inclusão em parafina e corados com hematoxilina-eosina. A avaliação microscópica (x40) foi realizada para avaliar a integridade morfológica dos oócitos em crescimento primário (CP). Em cada grupo, pelo menos 100 oócitos CP com núcleo visível foram categorizados em íntegros e não íntegros. Oócitos não íntegros foram aqueles com presença de núcleos picnóticos (danos de núcleo) e/ou ruptura da membrana oocitária (danos de membrana).

### 2.5 Análise estatística

A significância estatística foi determinada pelo uso de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparações de média de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 3. Objetivos atingidos:

A análise histológica após criopreservação do tecido ovariano permitiu distinguir quais tratamentos apresentaram oócitos com maior percentual de integridade morfológica.

## 4. Resultados obtidos:

Na avaliação de integridade morfológica de oócitos CP, o controle apresentou o maior percentual de células íntegras ( $94,75 \pm 0,48\%$ ) quando comparado aos grupos criopreservados ( $86,50 \pm 1,19\%$  em SV1;  $81,33 \pm 3,48\%$  em SV2;  $85 \pm 3\%$  em SV3). Não houve diferença estatística entre o controle ( $3,50 \pm 1,19\%$ ), SV1 ( $9,50 \pm 3,01\%$ ) e SV3 ( $10,25 \pm 2,17\%$ ) na avaliação de danos de núcleo. Entretanto, SV2 ( $15,67 \pm 1,45\%$ ) apresentou maior percentual de núcleos com alterações.

## 5. Conclusão:

A alta integridade morfológica obtida após criopreservação do tecido ovariano contendo oócitos imaturos, utilizando as três soluções crioprotetoras testadas, sugere que esse protocolo é uma alternativa promissora para preservação do genoma feminino de Piracanjuba.