

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Carina Diniz Rocha**

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS  
ASSOCIADA AO RESVERATROL**

**UBERLÂNDIA-MG**  
**2017**

Carina Diniz Rocha

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS  
ASSOCIADA AO RESVERATROL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal  
Linha de Pesquisa: Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini  
Co-orientadora: Dra. Kele Amaral Alves

UBERLÂNDIA-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R672v      Rocha, Carina Diniz, 1984  
2017      Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao  
resveratrol / Carina Diniz Rocha. - 2017.  
92 f. : il.

Orientador:      José      Octavio      Jacomini.

Coorientadora: Kele Amaral Alves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Folículo Ovariano - Teses. 3. Antioxidantes  
- Teses. 4. Bovino - Teses. I. Jacomini, José Octavio. II. Alves, Kele  
Amaral, 1975- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Otávio Augusto e Maria Helena por me porporcionarem  
sabedoria, persistência e amor.*

*Ao meu noivo William pelo incentivo, amor, paciência e colaboração.*

*A minha irmã Aline pelo incentivo e persistência.*

*Com muito carinho e amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por colocar pessoas abençoadas em minha vida, estar sempre iluminando meus caminhos, me protegendo. Obrigada!

À Universidade Estadual do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) em especial aos professores José Ricardo Figueiredo, Ana Paula Rodrigues, por me receberem no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA), onde tive a oportunidade de realizar parte do meu doutorado, obrigada pelos ensinamentos.

A toda equipe do LAMOFOPA, em especial a Natalie, Luciana, Laritza, Luis, Juliana, Denise, Deyse, Carol, Rita e ao seu João.

A meu orientador José Octávio Jacomini pelos ensinamentos, incentivos e apoio.

Aos professores do laboratório de reprodução professora Teresinha pelo incentivo, persistência, ao professor Gustavo e Ricarda pelos ensinamentos, à Graciele pela dedicação e atenção aos pós-graduandos.

Aos pós-graduandos Mayara, Jairo, Renata e Deize pela amizade, apoio e convivência.

Ao Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, em especial ao professor Marcelo Emílio Beletti pela dedicação, paciência e a equipe do Laboratório de Histologia Mariani, Ester e Fabrício pela amizade e apoio.

À Universidade de Uberaba, em especial ao coordenador do curso de Ciências Biológicas, o professor Ricardo Baratella que sempre me incentivou e apoiou.

A minha co-orientadora Kele Amaral Alves pela amizade, dedicação, valorosa co-orientação, confiança, apoio, por contribuir para minha formação pessoal e enriquecimento científico, pelos momentos de descontração e de muito aprendizado e ao pós-doutorando Benner Geraldo Alves, pela amizade, apoio, paciência e dedicação.

A minha irmã Aline, meu cunhado Claudinho pelos momentos de confraternização, ao meu afilhado Augusto pelos momentos de diversão, muita alegria e brincadeiras.

A meu irmão Fernando, minha cunhada Fernanda pelos momentos de descontração, a minha sobrinha Beatriz pelos passeios de bicicleta pela lagoa que nos rendiam grandes risadas.

A meu noivo William, pelos conselhos, pela paciência, pelo incentivo, dedicação, compreensão, companheirismo e amor.

A meus pais Otávio e Maria Helena pelo amor, incentivo e dedicação e que sempre apoiaram em minhas decisões, sou eternamente grata!

Muito Obrigada!

*“Deus está no controle e a vitória já está garantida,  
só tenha fé”*

## Resumo

Objetivou-se com este estudo analisar a morfologia e a viabilidade tecidual de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos por meio de análise histológica, sondas fluorescentes em microscopia confocal, antes e após os procedimentos de vitrificação/aquecimento com ou sem o antioxidante resveratrol. Foram fragmentados 18 ovários e os fragmentos distribuídos aos grupos controle (C), vitrificado sem resveratrol (SR) e vitrificado com resveratrol (CR) na concentração de 20  $\mu$ M. No experimento 1 foi realizada análise morfológica dos folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecidos ovarianos por histologia clássica. Os folículos pré-antrais foram quantificados e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento. O percentual médio de folículos normais foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo de folículos vitrificados com resveratrol em relação aos vitrificados sem a adição do antioxidante. No grupo de folículos vitrificados com resveratrol a classe de folículos primordiais apresentou maior percentual ( $P < 0,05$ ) de folículos normais. Em contrapartida a classe de folículos secundários apresentou o menor percentual ( $P < 0,05$ ) de folículos normais em todos os tratamentos. Adicionalmente, foi observada uma associação negativa entre a proporção de folículos viáveis e o estágio de desenvolvimento folicular. A probabilidade de se encontrar folículos viáveis foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo de folículos vitrificados na presença do resveratrol e os folículos primordiais do grupo com resveratrol apresentaram 2,5 vezes mais chance de viabilidade após a vitrificação. A chance de se observar folículos normais foi maior ( $P < 0,05$ ) nas fases iniciais de desenvolvimento folicular. O diâmetro dos folículos de transição e de seus respectivos ovócitos foi menor quando submetidos ao processo de vitrificação com resveratrol ( $P < 0,05$ ). Na classe de folículos primários, os diâmetros foliculares e ovocitários foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre os grupos estudados. No experimento 2 foi realizada a análise de viabilidade tecidual por meio da técnica de microscopia confocal que avaliou os níveis de emissão de espécies reativas de oxigênio (EROs- DCF) e de viabilidade tecidual (iodeto de propídeo- IP). Os níveis de degeneração tecidual no grupo de fragmentos vitrificados com resveratrol foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) aos do grupo controle. Os níveis de EROs foram semelhantes entre os grupos vitrificados e vitrificados com resveratrol e inferior em relação ao grupo controle. A intensidade de fluorescência emitida com a utilização de ambas probes diminuiu ( $P < 0,05$ ) com o aumento da profundidade tecidual analisada. Além disso, a análise de regressão linear apresentou correlação negativa entre intensidade de fluorescência e a profundidade tecidual. Observou-se uma associação positiva ( $P < 0,01$ ) entre os níveis de células degeneradas e as taxas de EROs produzidas nos tratamentos em diferentes profundidades do tecido ovariano,

independentemente do tratamento e da profundidade tecidual os grupos apresentaram similaridade para os baixos EROs. A proporção de fragmentos com alto nível de EROs foi superior no grupo controle comparado aos grupos vitrificados. Em conclusão, o resveratrol favoreceu a preservação de folículos ovarianos pré-antrais em fases iniciais de desenvolvimento quando submetidas ao processo de vitrificação/ aquecimento, além de proporcionar redução na produção de EROs e maior viabilidade celular.

**Palavras-chave:** Folículo pré-antral. Microscopia confocal. Morfologia. Resveratrol.

## Abstract

The aim of this study was to analyze the morphology and tissue viability of preantral follicles of bovine fetuses by means of histological analysis, fluorescence probes diacetate diiododihydrofluorescein and propidium iodide in confocal microscopy, before and after vitrification / warming procedures without or with antioxidant resveratrol. The ovaries (n=18) were fragmented and the fragments distributed to the control (C) groups, vitrified without resveratrol (SR) and vitrified with resveratrol (CR) at the concentration of 20  $\mu$ M. The experiment 1, morphological analysis of the preantral follicles included in fragments of ovarian tissues by classical histology was performed. The preantral follicles were quantified and classified according to the developmental stage. The mean percentage of normal follicles was higher ( $P <0.05$ ) in the group of follicles vitrified with resveratrol than in the vitrified without the addition of the antioxidant. In the group of follicles vitrified with resveratrol the class of primordial follicles had a higher percentage ( $P <0.05$ ) of normal follicles. In contrast, the secondary follicle class had the lowest percentage ( $P <0.05$ ) of normal follicles in all treatments. In addition, a negative association was observed between the proportion of viable follicles and the stage of follicular development. The probability of finding viable follicles was higher ( $P <0.05$ ) in the group of vitrified follicles in the presence of resveratrol and follicles of the group with resveratrol presented 2.5 times more chance of viability after vitrification. The chance of observing normal follicles was higher ( $P <0.05$ ) in the early stages of follicular development. The diameter of the transitional follicles and their respective oocytes was lower when submitted to the vitrification process with resveratrol ( $P <0.05$ ). In the primary follicle class, the follicular and oocyte diameters were similar ( $P > 0.05$ ) between the studied groups. The experiment 2, the tissue viability analysis was performed using a confocal microscopy technique that evaluated the fluorescence levels emitted by DCF and IP. The fluorescence levels emitted by PI in the group of fragments vitrified with resveratrol were similar ( $P > 0.05$ ) to the control group. The levels of EROs were similar between the vitrified and vitrified groups with resveratrol and lower in relation to the control group. The intensity of fluorescence emitted with the use of both probes decreased ( $P <0.05$ ) with the increased tissue depth analyzed. In addition, linear regression analysis showed a negative correlation between fluorescence intensity and tissue depth. A positive association ( $P <0.01$ ) was observed between the degenerate cell levels and the ROS rates produced in the treatments with different depths of ovarian tissue, regardless of treatment and tissue depth, groups showed similarity to low ROS.. The proportion of fragments with high level of EROs was higher in the control group compared to the vitrified groups. In conclusion, resveratrol

favorited the preservation of preantral follicles in the early stages of development when submitted to the vitrification / warming process, as well as to reduce the production of ROS and greater cell viability.

**Keywords:** Preantral follicles. Confocal microscopy. Morphology. Resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS REVISÃO DE LITERATURA**

Figura 1 - Ovário de mamíferos e suas principais estruturas envolvidas ..... Figura 2 - Classificação quanto ao desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) ..... Figura 3 - Sistema cryoloop alça de metal presa com um aro de nylon preenchido com solução de vitrificação viscosa com os fragmentos celulares no aro que será mergulhado em nitrogênio líquido..... Figura 4 - Espátula de metal com extremidade plana e gota de solução de vitrificação com fragmento tecidual. .... Figura 5 - Técnica de vitrificação por superfície sólida, com o fragmento sobreposto em cubo metálico parcialmente submerso em nitrogênio líquido..... Figura 6 - Palheta francesa preenchida com solução de vitrificação e fragmentos de tecidos ovarianos intercaladas por colunas de ar e extremidade vedadas com massa acrílica. .... Figura 7 - Vitrificação em criotubos: A) fragmentos ovarianos e B) ovário inteiro de feto bovino. .... Figura 8 - Dispositivo de aço inoxidável “ <i>Ovarian Tissue Cryosystem</i> ” (OTC) - A) Dispositivo aberto onde a) base, b) filtro e c) tampa; B tecido com solução de vitrificação na base; C) Inserção do filtro na base do OTC para remoção da solução de vitrificação; D) Fechamento do dispositivo e E) Dispositivo fechado sendo armazenado em nitrogênio líquido..... Figura 9 - Mecanismos de proteção celular sobre a formação de espécies reativas de oxigênio. .... Figura 10 - Formas isômeras do resveratrol a esquerda trans- 3,5,4 trihidrixiestibena e a direita cis- 3,5,4 trihidrixiestibeno..... Figura 11 - Ação intracelular do resveratrol (1) Ação direta sobre as espécies reativas de oxigênio. (2) Ativação do gene SIRT1..... Figura 12 - Atuação das espécies reativas de oxigênio no tecido sobre Nrf2 ligado a proteína 1 (Keap-1) no citoplasma. ....	19 21 27 28 28 29 29 30 32 34 35 36
---	--

Figura 13 - Ação do 2,7 diacetato diclorofluoresceína no tecido ovariano..... 39

**CAPÍTULO 2 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS VITRIFICADOS COM O ANTIOXIDANTE RESVERATROL**

Figura 1- Proporção de folículos pré-antrais viáveis nas diferentes classes de desenvolvimento folicular. Análise de regressão linear simples representada pela equação e pela linha..... 62

**CAPÍTULO 3 - VIABILIDADE TECIDUAL E PERFIL OXIDATIVO DE FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS VITRIFICADOS COM RESVERATROL**

Figura 1 - Imagens representativas de microscopia confocal de fragmentos ovarianos de fetos bovinos submetidos à vitrificação com e sem adição de resveratrol. (A; D; G) diacetato diclorofluoresceína – DCF - H2DCFDA, (B; E; H) iodeto de propídeo - IP e (C; F; I) a sobreposição das probes..... 81

Figura 2 - Níveis de intensidades de fluorescência nos tratamentos: controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol avaliado com as probes diaceto diclorofluoceína e iodeto de propídeo. (<sup>a; b</sup>) Diferem entre si ( $P < 0,05$ ). ..... 82

Figura 3 - A análise de regressão linear entre intensidade de fluorescência e a profundidade tecidual. Figuras A e B representam probes DCF e IP, respectivamente. ..... 83

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS VITRIFICADOS COM O ANTIOXIDANTE RESVERATROL**

Tabela 1 - Percentual médio ( $\pm$  epm) de folículos pré-antrais normais de ovários de fetos bovinos de acordo com a classe de desenvolvimento folicular nos diferentes tratamentos. .... 61

Tabela 2 - Razão de chances (Odds ratio) para viabilidade folicular nas diferentes classes foliculares dos grupos vitrificado e vitrificado com resveratrol. .... 63

Tabela 3 - Razão das chances (Odds ratio) para viabilidade folicular após vitrificação com resveratrol. .... 64

Tabela 4 - Média ( $\pm$  epm) dos diâmetros dos folículos e ovócitos das diferentes classes foliculares nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol. .... 65

Tabela 5 - Razão ( $\pm$  epm) das médias dos diâmetros folicular e ovocitário nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol. .... 65

### **CAPÍTULO 3 - VIABILIDADE TECIDUAL E PERFIL OXIDATIVO DE FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS VITRIFICADOS COM RESVERATROL**

Tabela 1 - Coeficiente de correlação (r) das probes fluorescentes DCF e iodeto de propídeo em diferentes profundidades de tecido ovariano. .... 84

Tabela 2 - Diferentes níveis de intensidade de fluorescência relativos à emissão da probe DCF nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol, de acordo com os níveis baixo, médio e alto. .... 85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

= - Igual a

± - mais ou menos

× - Vezes

< - Menor que

> - Maior que

≥ - Maior ou igual

°C - Graus Celsius

µg - Microgramas

µL - Microlitros

µm - Micrômetros

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina Sérica Bovina

CAT - Catalase

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

CG - Células da granulosa

cm - Centímetros

H<sub>2</sub>DCFH-DA - 2', 7' diacetato diclorofluoresceína

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EG - Etilenoglicol

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FOPAS - Folículos pré-antrais

GSH - Glutationa

H<sub>2</sub>O - Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina-eosina

IP - Iodeto de propídeo

LM - Microscopia de luz

LAMOFOPA - Laboratório Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

M - Molar

mg - Miligramas

min - Minutes (minutos)

mL - Mililitros

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MOIFOPA - Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

n - número

O<sub>2</sub> - Oxigênio

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Radical superóxido

OH<sup>-</sup> - Radical hidroxila

OTC - Ovarian Tissue Cryosystem

PBS - Tampão fosfato-salino

SL - Solução de Lavagem

SV - Solução de vitrificação

SOD- Superoxidodesmutase

TCM-199 Meio de cultivo tecidual 199

UECE - Universidade Estadual do Ceará

vol - Volume

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Foliculogênese, caracterização e população folicular .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Biotécnica da manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3 A criopreservação do tecido ovariano .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.1. Agentes crioprotetores.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2 Congelamento lento .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.3 Vitrificação .....</b>	<b>26</b>
<b>3.4 Antioxidantes no processo de vitrificação/ aquecimento .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4.1 Mecanismos ação dos antioxidantes.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Técnicas de análise de tecido ovariano após criopreservação .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.1 Histologia clássica .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.2 Microscopia confocal .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5.3 Sondas fluorescentes.....</b>	<b>38</b>
<b>4 HIPOTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>5 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 2 - Aspectos morfológicos de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos de fetos bovinos vitrificados com o antioxidante resveratrol .....</b>	<b>54</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>55</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>57</b>
<b>2 Material e Métodos .....</b>	<b>58</b>
<b>2.1 Coleta dos Ovários .....</b>	<b>58</b>
<b>2.2 Preparação das amostras .....</b>	<b>58</b>
<b>2.3 Vitrificação e aquecimento .....</b>	<b>59</b>

2.4 Histologia clássica .....	60
2.5 Análise estatística .....	60
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Viabilidade tecidual e perfil oxidativo de fragmentos ovarianos de fetos bovinos vitrificados com resveratrol .....</b>	<b>73</b>
Resumo .....	74
1 Introdução .....	76
2 Material e Métodos .....	77
2.1 Coleta dos Ovários .....	77
2.2 Preparação das amostras .....	77
2.3 Vitrificação e aquecimento .....	78
2.4 Análise da viabilidade tecidual e nível de produção de EROS .....	79
2.5 Análise estatística .....	79
3 Resultados .....	80
4 Discussão .....	85
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>92</b>

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

As biotécnicas reprodutivas têm o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva de animais geneticamente superiores ou ameaçados de extinção e de preservar folículos pré-antrais de mulheres jovens submetidas a tratamentos quimioterápicos ou com problemas de infertilidade. Entre as biotécnicas da reprodução a criopreservação de tecido ovariano é uma técnica promissora que pode garantir a preservação de gametas femininos de espécies animais e a recuperação da fertilidade em mulheres.

O desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas que visam à recuperação e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais são imprescindíveis para o restabelecimento fisiológico, a preservação morfológica. Os tecidos ovarianos podem ser criopreservados tanto pela técnica de congelamento lento (BORGES et al., 2009) como por vitrificação (BANDEIRA et al., 2015). A técnica de vitrificação tem a vantagem de minimizar a formação de cristais de gelo e a formação de EROs que danificam o tecido (FAUSTINO et al., 2011). Após procedimento de vitrificação o tecido ovariano pode ser destinado ao transplante no qual a maturação folicular ocorre *in vivo* (LUNARDI et al., 2012) ou ao crescimento folicular *in vitro* (CARVALHO et al., 2014). Na tentativa de minimizar danos morfológicos e a produção EROs provenientes do processo de criopreservação, estudos têm sugerido a adição de antioxidantes como a catalase (CARVALHO et al., 2013), o  $\alpha$  tocoferol (SILVA et al., 2011), a trealose (LUZ et al., 2011) e o resveratrol (TAKEO et al., 2014) em soluções de vitrificação/ aquecimento (GIARETTA et al., 2013).

O antioxidante resveratrol, proveniente de cascas de uvas vermelhas tem se destacado por ativar vias relacionadas à ativação mitocondrial a partir do gene SIRT-1, presente nas células da granulosa, ovócitos e blastocistos (WANG et al., 2013). Estudos em relação à adição de resveratrol em meios de vitrificação/ aquecimento tem apresentado resultados satisfatórios no cultivo de ovócitos, na taxa de eclosão e qualidade de embriões bovinos (SALZANO et al., 2014) e na maturação e na vitrificação/ aquecimento previne e inibe os danos causados pela criopreservação (GIARETTA et al., 2013).

Acredita-se que o resveratrol beneficie folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de fetos bovinos, e que seu efeito antioxidante mantenha a integridade de membrana plasmática dos folículos pré-antrais permitindo a preservação morfológica e viabilidade celular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a viabilidade tecidual e a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos antes e após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento associados ou não ao resveratrol.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Classificar morfologicamente os folículos pré-antrais por meio da técnica de histologia quanto à normalidade, ao desenvolvimento folicular e mensuração da média dos diâmetros dos folículos pré-antrais antes e após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento sem e com resveratrol em fragmentos de tecidos ovarianos.

Avaliar a viabilidade tecidual por meio de produção de espécies reativas de oxigênio (2'7' diacetato diclorofluoceína - DCF) e degeneração celular (iodeto de propídeo- IP) em microscopia confocal, em diferentes profundidades teciduais antes e após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento associados ou não ao resveratrol em fragmentos de tecido ovarianos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Foliculogênese, caracterização e população folicular

Os ovários são os principais órgãos reprodutivos das fêmeas e, realizam duas importantes funções: a gametogênica, responsável pela produção e liberação de células germinativas, os ovócitos (FIGUEIREDO et al., 1993) e a função endócrina em que produz hormônios como o estrógeno e a progesterona, entre outros (FORTUNE, 2003). Nos ovários podem ser observadas duas regiões a cortical e a medular. A cortical localiza-se na parte externa e é circundada pelo epitélio germinativo, onde ficam localizados os corpos lúteos, albicans (FIGUEIREDO et al., 1999) e os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2014). A região medular, localizada na parte interna do ovário, é responsável pela sustentação, vascularização e inervação do órgão, sendo constituída por numerosos vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo frouxo (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

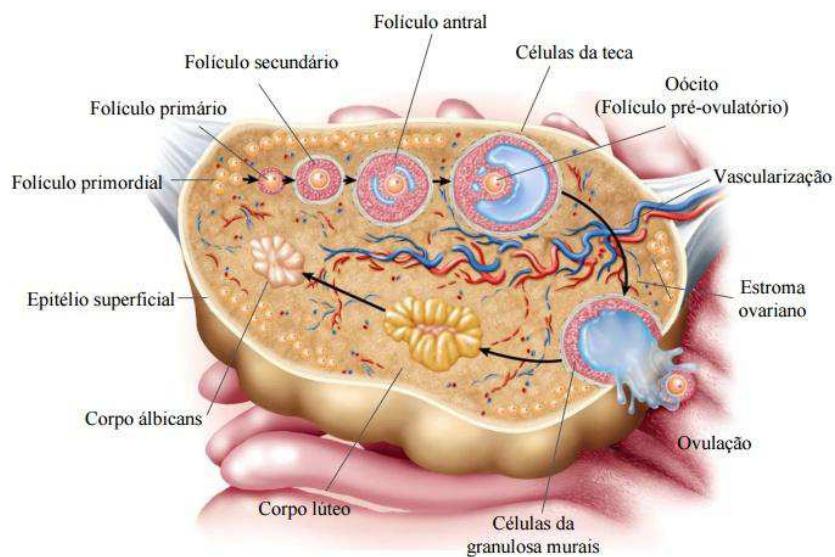


Figura 1 - Ovário de mamíferos e suas principais estruturas envolvidas

Fonte: CARVALHO et al. (2013)

Durante o início do desenvolvimento fetal, ocorre a migração das células germinativas primordiais (CGP) do saco vitelínico para a região das gônadas primitivas (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005), estas CGP multiplicam-se e transformam-se em ovogônias, células de alta atividade mitótica (FIGUEIREDO et al., 1993). A ovogênese é um conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea até a formação do ovócito apto a ser fecundado (GONÇALVES et al., 2001).

O folículo tem a função de proporcionar um ambiente adequado para o crescimento e maturação do ovócito (ALVES et al., 2015), bem como produzir hormônios (BARNETT et al., 2006). É formado por um ovócito envolto por células da granulosa e circundado pela membrana basal (GUTIERREZ et al., 2000). A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e desenvolvimento folicular. Na espécie bovina tem início durante a vida fetal por volta dos 95 dias de gestação com a formação do folículo primordial (DINIZ et al., 2005). Os animais nascem com uma reserva de folículos primordiais (COSTA et al., 2001) e estes ficam disponíveis por toda a vida reprodutiva (FIGUEIREDO et al, 2008).

Os folículos ovarianos são classificados morfologicamente como normais ou degenerados. Os folículos normais são aqueles que apresentam o ovócito e o núcleo preservados e circundados por células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas. Os folículos degenerados são aqueles que apresentam citoplasma retraído ou desorganizado, com células da granulosa separadas da membrana basal e ovócito com núcleo picnótico (FIGUEIREDO et al., 1999).

De acordo com a fase de desenvolvimento, os folículos são classificados em primordial (ovócito rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas com forma elíptica), transição (uma camada de células da granulosa achatadas e cuboides), primário (uma camada completa de células da granulosa cuboides e todo o ovócito com aspecto esférico) e secundário (ovócito com zona pelúcida rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides (Figura 2) (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

Um pequeno grupo de folículos primordiais é gradualmente estimulado ao crescimento, constituindo a etapa de ativação folicular, que é a retomada da proliferação das células da granulosa, com o desenvolvimento folicular, nota-se a presença da zona pelúcida e da cavidade antral preenchida por fluido folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

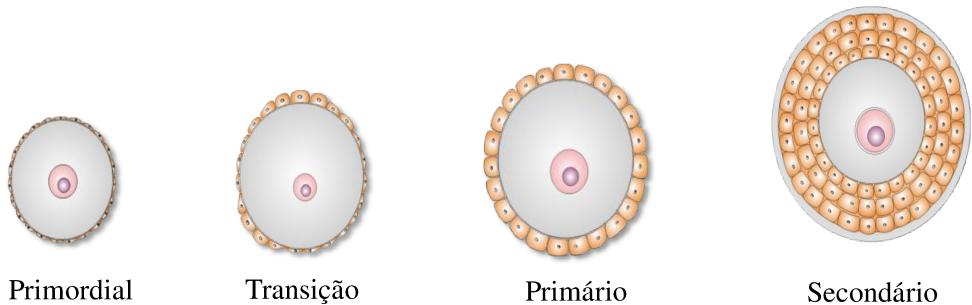


Figura 2 - Classificação quanto ao desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário)

Fonte: Adaptado de Alves (2010)

Estudos têm demonstrado que fatores inibitórios e estimulantes, sistêmicos ou locais, regulam a ativação ovocitária (ARAÚJO et al., 2014). Entre estes fatores estão o fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), hormônio anti-Mulleriano (AMH), proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento e de diferenciação epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblasto do tipo 2 (FGF-2) (SARAIVA et al., 2010) que atuam em receptores presentes nas células da granulosa e no ovócito estimulando o desenvolvimento de camadas celulares do folículo e diferenciação do ovócito (FORTUNE, 2003).

Uma vez ativados, os folículos entram em processo de desenvolvimento, maturação que são necessários para que ocorra a ovulação e fertilização ou atresia, aproximadamente 0,1% dos folículos primordiais chegam à ovulação (FIGUEIREDO et al., 1993).

A população folicular ovariana varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 folículos em camundongos (SHAW et al., 2000), 67.599 a 291.898 em suínos (ALVES et al., 2012), 7.333 a 446.333 em ovinos (AMORIM et al., 2000), 5.600 a 75.000 em equinos (ALVES et al., 2015), 2.700 a 79.600 em humanos (GOUGEON; CHAINY 1987); bovinos adultos *Bos taurus indicus* 8.010 a 94.301 e *Bos taurus taurus* 10.043 a 253.453 em fetos bovinos *Bos taurus indicus*: 41.957 a 248.865 e *Bos taurus taurus* 50.326 a 1.090.140 (SILVA-SANTOS et al., 2011).

A variação no número de folículos pré-antrais pode ser influenciada pela idade, (MALHI et al., 2005), pela raça (SILVA-SANTOS, 2011), pela variabilidade genética (SMITH et al., 1993).

A maioria dos folículos ovarianos, aproximadamente de 99,9% não ovula e se degenera por um processo denominado atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 1993) e o declínio progressivo do número de ovócitos ao longo da vida ocorre, principalmente, por

mecanismos apoptóticos, no envelhecimento celular (FIGUEIREDO et al., 2008) sendo que a isquemia uma das principais causas que levam a morte celular por degeneração (LIMA; SANTOS, 2010).

### **3.2 Biotécnica da manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA**

A MOIFOPA é uma biotecnologia de grande importância tanto para a pesquisa básica, quanto para a reprodução animal aplicada (BASSO; ESPER, 2002). Com relação à pesquisa fundamental, essa biotécnica contribui na compreensão de mecanismos da foliculogênese durante a fase pré-antral (FIGUEIREDO et al., 2007), na elucidação da ação de antioxidantes como mecanismo de defesa do metabolismo celular quanto submetidos criopreservação (COMIZZOLI et al., 2009).

Na reprodução animal esta biotecnologia pode contribuir para multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção, por meio do isolamento de folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs) a partir de um único ovário e, posterior, cultivo *in vitro* de ovócitos neles inclusos até o estágio de maturação (SILVA et al., 2012). Na reprodução assistida humana favorece a criopreservação, cultivo e transplantes de fragmentos de tecidos ovarianos de pacientes jovens com câncer ou com problemas de fertilidade (SUZUKI et al., 2015)

Esta biotécnica envolve a preservação, o crescimento e a maturação de folículos ovarianos em estágios iniciais de desenvolvimento, os folículos pré-antrais, antes da ativação dos mecanismos fisiológicos (FIGUEIREDO et al., 2007), a criopreservação, cultivo e o desenvolvimento de FOPAs (CARVALHO et al., 2014).

Entre as vantagens da MOIFOPA estão à redução do intervalo entre gerações, o uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, a obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte, a otimização e a padronização de outras biotécnicas, como fertilização *in vitro*, tecnologia de embriões, clonagem e transgenia (FIGUEIREDO et al., 2008).

### 3.3 A criopreservação do tecido ovariano

Entre os métodos de escolha para preservar a fertilidade de fêmeas, a criopreservação do tecido ovariano tem se tornado o método mais utilizado (FAUSTINO et al., 2011). Esta biotecnologia tem a finalidade de preservar, principalmente, os folículos pré-antrais, os quais estão localizados no córtex ovariano (BORDES et al., 2005) e representam a reserva principal de gametas femininos (LUCCI et al., 2002). Estes gametas podem ser recuperados com intuito de preservar a fertilidade de fêmeas de diversas espécies como em humanos (SUZUKI et al., 2015; WALLACE et al., 2016), ovino (BANDEIRA et al., 2015; BORDES et al., 2005;), caprinos (CARVALHO et al., 2013; SANTOS et al., 2007), bovinos (KAGAWA et al., 2009), suínos (BORGES et al., 2009), roedores (CHEN et al., 2006) e macacos (SUZUKI et al., 2012).

A criopreservação pode auxiliar de maneira significativa a MOIFOPA, mantendo a funcionalidade de folículos ovarianos pré-antrais preservados até o momento de sua utilização *in vitro* (FABRI et al., 2010). Segundo Carvalho et al. (2011) é possível criopreservar ovócitos maduros, imaduros puncionados de folículos antrais ou imaduros inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, isolados ou em fragmentos de tecido ovariano.

Os ovócitos imaduros e menos diferenciados presentes no interior dos folículos pré-antrais são mais resistentes a criopreservação que ovócitos maduros (OKTAY et al., 1998). Segundo KAGAWA et al., (2009) isto se explica devido ao menor tamanho do ovócito, menor taxa metabólica, fase do ciclo celular (profase I), pequeno número de células da granulosa, ausência de zona pelúcia e de grânulos corticais.

O princípio básico da criopreservação é a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou tecidos sejam conservados por períodos indeterminados em nitrogênio líquido a -196°C (SANTOS et al., 2008). O protocolo de criopreservação tende a atingir temperaturas criogênicas sem causar danos metabólicos e formação intracelular de cristais de gelo (CHIAN et al., 2004). A criopreservação de tecido ovariano pode ser realizada tanto por congelamento lento (CASTRO et al., 2011) quanto por vitrificação (LUNARDI et al., 2012).

### 3.3.1. Agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores (ACP) são substâncias de baixo peso molecular e que são utilizadas com o objetivo de minimizar efeitos nocivos às células, como a formação de cristais de gelo e o choque osmótico (CASTRO et al., 2011). Alguns fatores devem ser considerados para a sobrevivência celular, entre eles a concentração, o tipo de agentes crioprotetores, a taxa de redução da temperatura de criopreservação, manutenção da temperatura de estocagem, escolha do procedimento de descongelamento/ aquecimento e as técnicas adotadas para remoção do crioprotetor (RODRIGUES et al., 2014).

Entre os crioprotetores, existem os permeáveis ou intracelulares que são substâncias que atravessam a membrana celular e formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água intracelular, minimizando a formação de cristais de gelo (FABRI et al., 2001). Os crioprotetores mais utilizados para a criopreservação de embriões (SALZANO et al., 2014; BALABAN et al., 2008;), folículos ovarianos pré-antrais (SANTOS et al., 2007; BORDES et al., 2005) e tecido ovariano (CARVALHO et al., 2014; BORGES et al., 2009) são dimetilsulfoxido e etilenoglicol.

Cada crioprotetor tem mecanismos próprios de ação, geralmente seus efeitos estão relacionados à estabilização de membranas celulares, desidratação celular e redução no ponto de fusão do processo de criopreservação (DERMICI et al., 2001).

Os pesos moleculares dos crioprotetores intracelulares variam, sendo do glicerol 92,09 KDa, propanodiol 76,09 KDa, etilenoglicol 62,07 KDa e o dimetilsulfoxido 78,13 KDa e as diferenças de peso molecular influenciam na velocidade de penetração no tecido ovariano (CELESTINO et al., 2008). Por exemplo, o baixo peso molecular do etilenoglicol em relação ao dimetilsulfoxido, glicerol e propanodiol possibilita maior penetração celular em um curto período de exposição (KEROS et al., 2009), reduzindo a ocorrência de danos celulares de origem tóxica e osmótica (AMORIM et al., 2003).

Os estudos sobre a criopreservação de tecido ovariano em bovinos recomendam o uso do dimetilsulfoxido e etilenoglicol por apresentarem alta solubilidade e causarem menores danos aos ovócitos e em folículos pré-antrais em bovinos (LUCCI et al., 2004).

Os agentes crioprotetores extracelulares atuam interagindo com moléculas de água livre da solução influenciando a desidratação celular por efeito osmótico (FABRI et al., 2010). Os açúcares como sacarose, glicose, galactose, trealose (BORGES et al., 2009) funcionam como crioprotetores extracelulares protegendo o tecido por meio de ligações aos grupos fosfolipídicos das membranas celulares (SANTOS et al., 2008) e agem reduzindo

choque osmóticos, controlando entrada de água na célula levando a uma desidratação celular antes do congelamento (SHAW et al., 2000).

Após o tecido passar pelo processo de criopreservação e armazenado em nitrogênio líquido, quando for utilizado deve-se realizar a remoção do crioprotetor por meio de sucessivas e graduais lavagens do tecido (SUZUKI et al., 2012). Neste procedimento utiliza-se concentrações decrescentes de soluções de crioprotetores extracelular (IWAHATA et al., 2015) como a sacarose, que atua no equilíbrio osmótico, na prevenção de formação de espécies reativas de oxigênio, estabilizando membranas e minimizando danos celulares (SANTOS et al., 2006).

### **3.3.2 Congelamento lento**

O congelamento é considerado o método convencional de criopreservação e tem sido largamente utilizado para a conservação de tecido ovariano espécies como em suínos (BORGES et al., 2009), caprinos (RODRIGUES et al., 2014), ovinos (SANTOS et al., 2006), bovinos (CELESTINO et al., 2008) e humanos (FABRI et al., 2010).

Durante o congelamento lento, a desidratação celular previne a formação de cristais de gelo intracelular ou minimiza os danos que eles possam causar (SHAW et al., 2000), e mantêm o citoplasma resfriado até o congelamento celular (ROCHA, 2011). Este método caracteriza-se pela redução gradual de temperatura e pela exposição do tecido a concentrações crescentes de crioprotetores (CASTRO et al., 2011). O período de exposição ao crioprotetor pode variar de 5 a 60 minutos (CANDY et al., 1997).

Para este processo o material é resfriado lentamente, acondicionada em congelador programável previamente estabilizado à temperatura de - 6°C, seguido de cristalização manual (*seeding*) com objeto pré-resfriado em nitrogênio líquido o qual previne o super-resfriamento e a extrema desidratação celular (ROCHA, 2011), seguido de resfriamento lento de 0,5 °C/minutos até -32°C, o material é imerso e estocado em nitrogênio líquido (-196°C).

A desvantagem deste método é o custo, devido à necessidade de um congelador programável e a utilização de elevadas quantidades de nitrogênio líquido. Além disso congelamento lento requer mais tempo de manuseio (WALLACE et al., 2016).

### 3.3.3 Vitrificação

O principal objetivo de um protocolo de criopreservação é atingir temperaturas criogênicas (CARVALHO et al., 2014). A vitrificação proporciona a solidificação sem a cristalização e sem formação de cristais de gelo intracelular (KEROS et al., 2009). Segundo Carvalho et al. (2011) a vitrificação tem se destacado como método de escolha para a criopreservação de tecido ovariano devido a sua praticidade de aplicação e ao seu baixo custo de execução. Esta técnica tem apresentado resultados interessantes como nascimentos após transplante de tecido vitrificado na espécie ovina (BORDES et al., 2005) e em humanos (KAWAMURA et al., 2013).

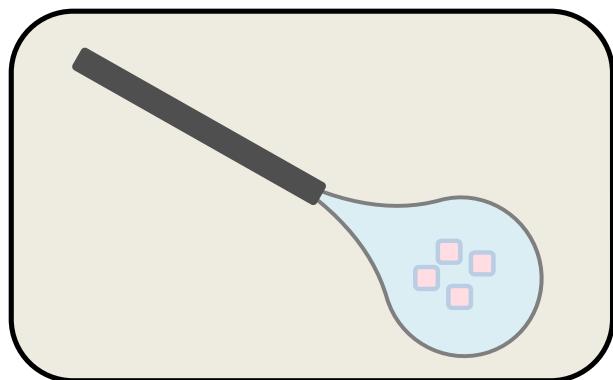
O processo de vitrificação está relacionado à exposição da célula ou do tecido a altas concentrações de agente crioprotetor por um curto período de tempo à temperatura ambiente (BANDEIRA et al., 2015). Como consequência a água passa do estado líquido para o estado vítreo, considerado um sólido sem formação de cristais de gelo (KEROS et al., 2009). Além disso, acredita-se que fatores como o estresse osmótico está relacionado à composição da solução e a taxa de resfriamento (LUZ et al., 2011). A técnica de vitrificação pode influenciar na morfologia celular após o aquecimento (CARVALHO et al., 2014).

Diversos estudos com a técnica de vitrificação têm sido desenvolvidos com a finalidade de minimizar a quantidade de solução de vitrificação, bem como obter rápida redução da temperatura, sem causar grandes danos celulares (ZHOU et al., 2010) e com objetivo de estabelecer protocolos eficientes que permitam preservar a viabilidade celular (SANTOS et al., 2007).

Para a utilização de tecido ovariano na vitrificação é necessário considerar o tamanho dos fragmentos, o tempo de exposição aos crioprotetores, uso de crioprotetores mais adequados para a espécie, o volume de solução de vitrificação e a velocidade de do processo de vitrificação (BANDEIRA et al., 2015; AMORIM et al., 2011; BORDES et al., 2005).

As técnicas de vitrificação são divididas entre as que têm contato direto com o nitrogênio líquido ( $N_2$ ) e as que não têm contato direto com o nitrogênio (CARVALHO, et al., 2011). O contato direto com nitrogênio proporciona uma rápida redução de temperatura, porém pode contaminar a amostra tornando-a inviável para posterior cultivo *in vitro* (CARVALHO et al., 2013). A vitrificação por cobertura direta (DVC) é caracterizada por apresentar brusca redução de temperatura em relação às demais técnicas, o tecido dentro do criotubo é coberto pelo nitrogênio líquido (ZHOU et al., 2010).

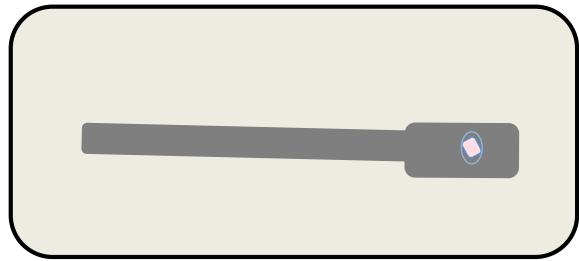
Já a técnica de *cryoloop* utiliza uma alça de metal presa com um aro de nylon, este aro é preenchido com solução de vitrificação bem viscosa para manter a célula no aro que será mergulhado em nitrogênio líquido; geralmente o *cryoloop* é armazenado no interior de criotubos (CARVALHO et al., 2011). Resultados satisfatórios tem sido relatados com ovócitos na espécie equina (MACLELLAN et al., 2002), ovina (SUCCU et al., 2007), bovina (LUSTER, 2004) e embriões de humanos (Figura 3) (BALABAN et al., 2008).



ROCHA, C. D (2017)

Figura 3 - Sistema cryoloop alça de metal presa com um aro de nylon preenchido com solução de vitrificação viscosa com os fragmentos celulares no aro que será mergulhado em nitrogênio líquido.

Na vitrificação em espátula o tecido a ser vitrificado fica na extremidade plana da espátula e uma pequena gota de solução de vitrificação é colocada com o tecido. Ao entrar em contato com a superfície da espátula pré-resfriada a gota solidifica-se e adere à superfície plana da espátula (Figura 4) (CARVALHO et al., 2010).



ROCHA, C. D (2017)

Figura 4 - Espátula de metal com extremidade plana e gota de solução de vitrificação com fragmento tecidual.

No método de superfície sólida de vitrificação (SSV), a amostra e a solução de vitrificação são colocadas sobre uma superfície de metal pré-resfriada, posicionada acima do nitrogênio líquido e, posteriormente mergulhada em nitrogênio líquido (BORDES et al., 2005) e armazenada em criotubos (SANTOS et al., 2007). O metal resfria a amostra rapidamente (Figura 5) (CARVALHO et al., 2010).



Figura 5 - Técnica de vitrificação por superfície sólida, com o fragmento sobreposto em cubo metálico parcialmente submerso em nitrogênio líquido.

Com o objetivo de reduzir a quantidade de solução crioprotetora, o método hemi-palhetas, em que a palheta francesa de 0,25mL é cortada ao meio e em sua superfície interna coloca-se uma gota de solução de vitrificação e o material a ser vitrificado. Em seguida a hemi-palheta é mergulhada no nitrogênio líquido e inserida na palheta de 0,5 mL e armazenada em nitrogênio (LIBERMAN; TUKER, 2002).

Entre as metodologias de vitrificação de sistemas fechados estão a vitrificação em palhetas fechadas ou “*Closed Pulled Straw*” (CPS). Após preenchimento da palheta, suas

extremidades são vedadas, impedindo o contato direto da amostra com o nitrogênio líquido (TING et al., 2011).

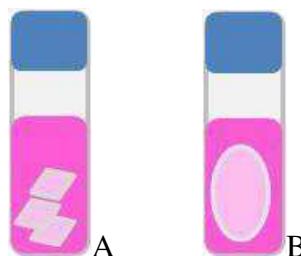
Na técnica de vitrificação convencional utilizam-se palhetas francesas, e estas são preenchidas com a solução de vitrificação e o tecido a ser vitrificado. As extremidades são vedadas e em seguida imersas em nitrogênio líquido (Figura 6) (BORDES et al., 2005).



ROCHA, C. D (2017)

Figura 6 - Palheta francesa preenchida com solução de vitrificação e fragmentos de tecidos ovarianos intercaladas por colunas de ar e extremidade vedadas com massa acrílica.

Os criotubos (ZHOU et al., 2010) e macrotubos (CARVALHO et al., 2011) podem ser utilizados do mesmo modo da palheta francesa, sendo estes indicados para criopreservação de tecidos maiores e demandam maiores quantidades de solução de vitrificação (Figura 7) (ISACHENKO et al., 2007).



ROCHA, C. D (2017)

Figura 7 - Vitrificação em criotubos: A) fragmentos ovarianos e B) ovário inteiro de feto bovino.

Na técnica *cryotop* utiliza-se uma palheta de polipropileno com uma haste plástica, que serve para manipulação e evitar a contaminação do manipulador (CARVALHO et al., 2011). O cryotop tem uma tampa plástica, que recobre a palheta-haste de forma a impedir o contato com o nitrogênio líquido (KUWAYAMA et a., 2005). É uma técnica utilizada rotineiramente em clínicas de reprodução assistida humana (CARVALHO et a., 2011).

Com o objetivo de melhorar as taxas de vitrificação, novos procedimentos têm sido desenvolvidos, entre eles a técnica “*Ovarian Tissue Cryosystem*” (OTC) que utiliza um cilindro de aço inoxidável composto por três peças: base, filtro e a tampa e evita o contato com o nitrogênio líquido durante o procedimento de vitrificação (Figura 8) (CARVALHO et al., 2013).

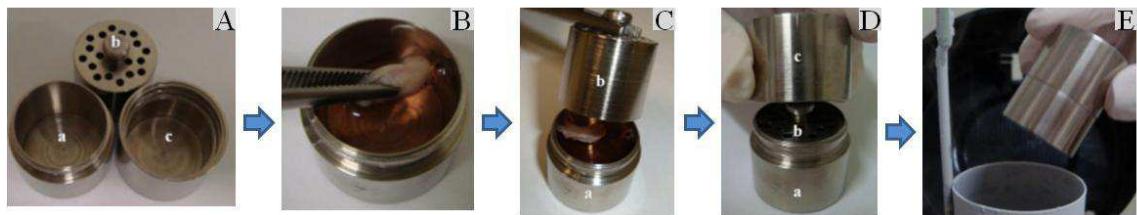


Figura 8 - Dispositivo de aço inoxidável “*Ovarian Tissue Cryosystem*” (OTC) - A) Dispositivo aberto onde a) base, b) filtro e c) tampa; B) tecido com solução de vitrificação na base; C) Inserção do filtro na base do OTC para remoção da solução de vitrificação; D) Fechamento do dispositivo e E) Dispositivo fechado sendo armazenado em nitrogênio líquido.

Fonte: Adaptado Carvalho et al. (2013)

### 3.4 Antioxidantes no processo de vitrificação/ aquecimento

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são resultantes de reações metabólicas que envolve o oxigênio ( $O_2$ ), entre eles o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^-$ ) (RIBEIRO et al., 2005). A propriedade apolar do  $H_2O_2$  permite sua passagem pela membrana celular e no citoplasma seja convertido em  $OH^-$ , molécula altamente reativa (RUDER et al., 2008) que pode desencadear reações de oxidação e redução, provocando alterações celulares (LUZ et al., 2012).

A presença de espécies reativas de oxigênio no citoplasma celular pode influenciar a sobrevivência celular após a criopreservação de tecidos ovarianos (FABRI et al., 2014). O resfriamento e aquecimento proporcionam o aumento na produção de EROS, de maneira que o

estresse osmótico gerado pelo aumento do metabolismo pode comprometer o restabelecimento do tecido ovariano, o desenvolvimento folicular (WANG et al., 2013), a esteroidogênese ovariana, a ovulação, a manutenção do corpo lúteo, a luteólise (GUPTA et al., 2010) e a pré e pós implantação embrionária (LAZAR et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio decorrentes do metabolismo celular e do meio extracelular são devido a fatores estressantes e agressivos (TATONE et al., 2010). Os principais alvos de EROs são o DNA, lipídeos, proteínas e açúcares, sendo os danos no DNA o considerado mais grave e letal quando comparado aos lipídeos, proteínas e açúcares, sendo estes removidos via degradação (RIBEIRO et al., 2005).

No resfriamento e após o aquecimento celular os níveis de EROs tendem a aumentar, devido ao estresse osmótico e a retomada das reações de oxidação e redução, evidenciando a necessidade de se adicionar antioxidantes em soluções de vitrificação e aquecimento (GIARETTA et al., 2013).

Os antioxidantes são substâncias capazes de converter as EROs em água, com a finalidade de prevenir a superprodução de espécies reativas de oxigênio (LUZ et al., 2011). Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio sistema enzimático e o não enzimático. Os antioxidantes enzimáticos são também conhecidos como antioxidantes naturais é o primeiro sistema a agir nas espécies reativas de oxigênio (AGARWAL et al., 2005). Esse sistema é composto por superóxido dismutase (SOD), glutationa (GSH), glutationa redutase (GSH- Rd redutase), glutationa peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) (RIBEIRO et al., 2005). O sistema não enzimático inclui compostos hidrofílicos e lipofílicos, como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, zinco, selênio, carotenoides e resveratrol que reduzem reações em cadeia e as lesões induzidas pelas espécies reativas de oxigênio (RUDER et al., 2008).

### **3.4.1 Mecanismos ação dos antioxidantes**

Os antioxidantes atuam no metabolismo de maneira diversificada. Um dos mecanismos é impedir a formação das EROs inibindo as reações de oxidação e redução (GUPTA et al., 2010). Quando há geração de radicais livres, os antioxidantes interagem com estas moléculas impedindo a ação destes radicais sobre lipídeos, aminoácidos e DNA evitando lesões e perda de integridade celular (SAITO et al., 2003). Outro mecanismo utilizado é o reparo de lesões causadas pelo estresse oxidativo (FABRI et al., 2014), onde há remoção do DNA danificado e a reconstituição de membranas celulares lesionadas (BERRA; MENCK,

2006), além de adaptação do metabolismo ao excesso de EROS induzindo o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (RIBEIRO et al., 2005).

Como forma de proteção a célula possui um sistema de defesa que pode ser realizado por dois mecanismos. Um é a detoxificação das espécies reativas de oxigênio antes que estas causem lesões celulares (LANE et al., 2002) formado por glutationa (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase (GSH-Px) e o  $\alpha$  tocoferol e o outro mecanismo é a reparação de lesões ocorridas, realizado pelo ácido ascórbico, glutationa redutase (GSH-Rd) e pela glutationa peroxidase (GSH-Px) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), a maior parte dos antioxidantes encontra-se no meio intracelular, com exceção do  $\alpha$  tocoferol, um antioxidante estrutural de membrana (Figura 9) (BARREIRO; DAVID, 2006).

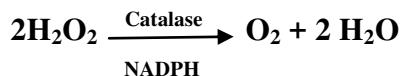
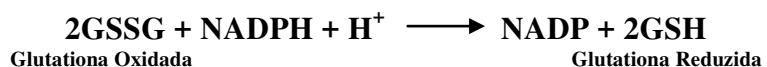
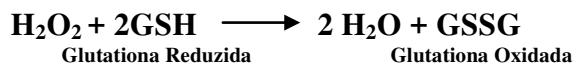
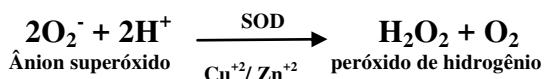


Figura 9 - Mecanismos de proteção celular sobre a formação de espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de Berra; Menck (2006)

Segundo GUPTA et al., (2010) a glutationa é uma enzima intracelular de grande importância para a célula, pois atua no mecanismo de proteção contra lesões e participa da detoxificação de agentes químicos e eliminação de metabólitos resultantes da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de membranas celulares. Variações nos níveis de glutationa afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA. A oxidação GSH pode diminuir a síntese

protéica e o pode ser perdida de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (RIBEIRO et al., 2005).

Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes como o superóxido dismutase (SOD), dependente de cofatores como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  desencadeiam a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 9) (ANDRADE et al., 2010).

A enzima antioxidante catalase localizada nas mitocôndrias e nos peroxissomos, atua na redução de diversos compostos por intermédio do NADPH (CARVALHO et al., 2014). Possui como atividade antioxidante a capacidade de prevenir a oxidação da glutatona, inibir lesões oxidativas de DNA e converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 9). (COMBELLES et al., 2009).

Outro mecanismo utilizado pelo organismo na defesa contra os radicais livres é o sistema antioxidante não enzimático, também conhecido como antioxidantes exógenos, pelo fato de serem, na maioria das vezes, provenientes da dieta (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Diversas pesquisas têm destacado que o uso de nutrientes, principalmente os encontrados nos alimentos podem atuar na proteção de células e tecidos (VOLOSHYNA et al., 2012). As frutas, verduras e legumes estão entre os alimentos com maior capacidade antioxidante. As vitaminas A, C e E, os carotenoides, polifenóis como o resveratrol atuam minimizando danos e formações de espécies reativas de oxigênio (SAUTHER, 2005).

O resveratrol, um antioxidante presente na casca de uvas e amoras (GAMBINI et al., 2015), apresenta benefícios à saúde contra doenças como a diabetes, cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, obesidade, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias e estar envolvida no processo de envelhecimento celular (VOLOSHYNA et al., 2012). É um antioxidante sintetizado naturalmente na planta e apresenta duas formas isômeras a trans-resveratrol (trans - 3, 5, 4' trihidroxiestíbano) e cis - resveratrol (cis-3, 5, 4' trihidroxiestíbano) (Figura 10) (FILIP et al., 2003). O isômero trans-resveratrol é convertido, na presença de luz, o cis-resveratrol é a forma estável do antioxidante (SAUTHER et al., 2005). Este composto tem a característica de atravessar passivamente membranas celulares ou interagir com receptores de membrana (GULCIN, 2010). Também interage com moléculas extracelulares e intracelulares e por esta razão seu mecanismo de ação celular pode ser desencadeado por meio da ativação de vias de sinalização quando se liga aos receptores de membrana celular, ativando mecanismos intracelulares ou mesmo desenvolvendo seus efeitos dentro do núcleo (GAMBINI et al., 2015).

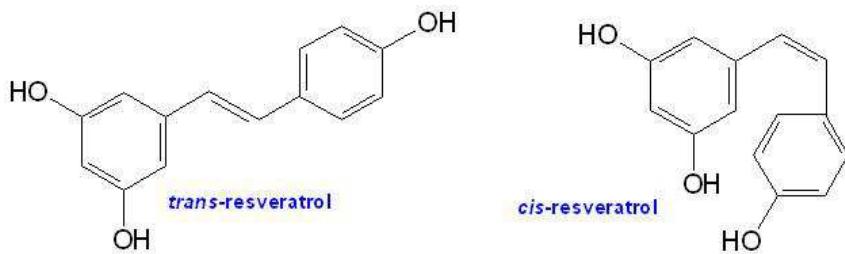


Figura 10 - Formas isômeras do resveratrol a esquerda trans- 3,5,4 trihidrixiestibena e a direita cis- 3,5,4 trihidrixiestibeno.

Fonte: Adaptado de Sauther (2015)

Em relação ao controle de espécies reativas de oxigênio o resveratrol reduz os níveis de EROS por indução de expressão de genes antioxidantes (KITADA; KOYA, 2013). Existem vários mecanismos que explicam a atividade citoprotetora do resveratrol (TATONI et al., 2015), um deles é a ação direta do antioxidante e o outro é estimular a biogênese mitocondrial por meio da ativação direta de genes SIRT 1 dependente de NAD<sup>+</sup>, sendo este gene um dos principais reguladores de biogêneses mitocondrial (WANG et al., 2013). O gene SIRT-1 é importante no equilíbrio do estresse oxidativo minimizando a formação de espécies reativas de oxigênio, na formação mitocondrial, no metabolismo lipídico-glicêmico, via desacetilação de substratos como proteínas, fatores de transcrição, PGC-1 $\alpha$  (co-ativador de PPAR $\gamma$  – receptores ativados por proliferadores de perossomos), que regula genes envolvidos no metabolismo energético e na expressão de proteínas mitocondriais (Figura 11) (SÉFORA-SOUZA; ANGELIS-PEREIRA, 2013).

Segundo Zhang et al. (2013) o aumento da atividade das enzimas antioxidantes pelo resveratrol pode ocorrer via ativação da sirtrina-1 (SIRT- 1), por meio de uma deacetilação de histona dependente de NAD<sup>+</sup>. O gene SIRT-1 protege contra o estresse oxidativo por elevar a atividade transcricional das proteínas Forkhead Box (FOXOs), as quais regulam a expressão de genes antioxidantes, como a catalase e superóxido dismutase (Figura 11) (LUZ et al., 2012).

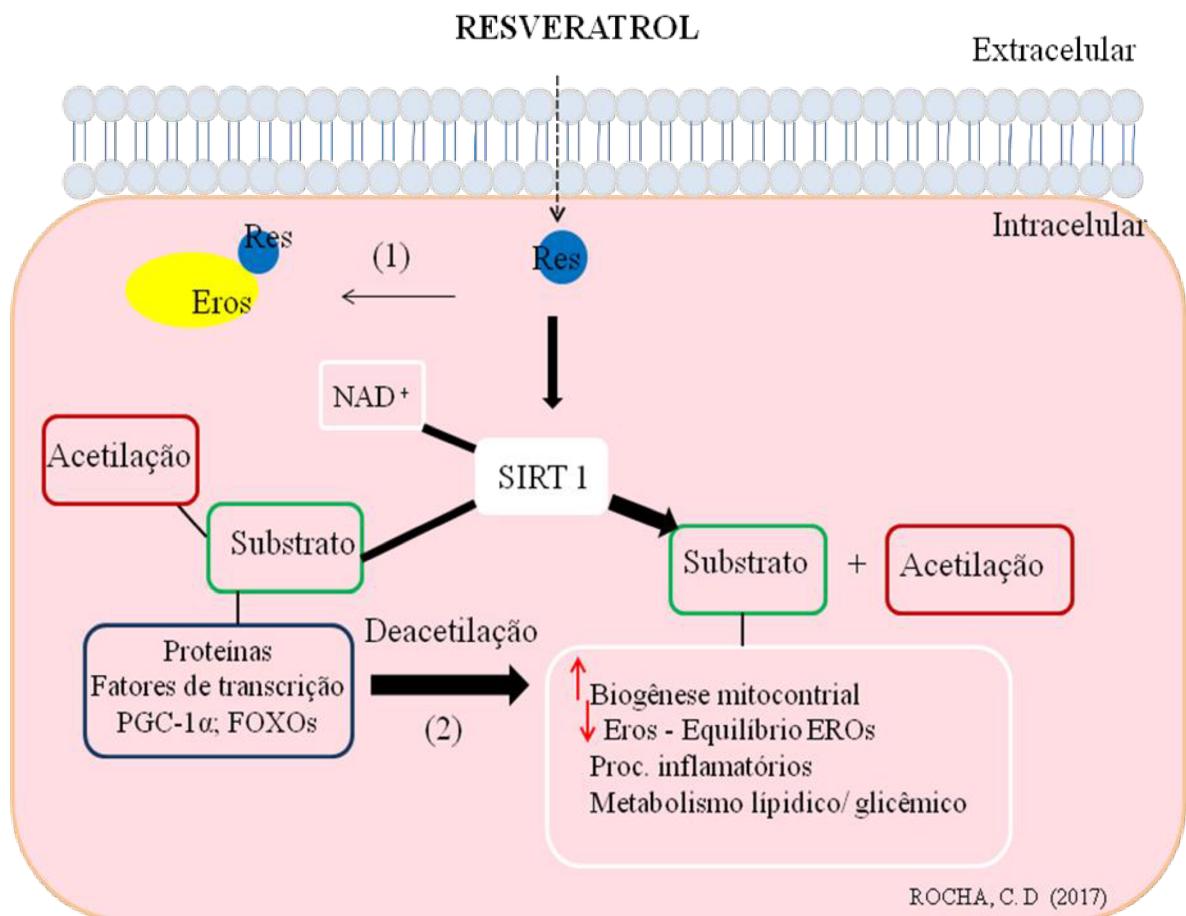


Figura 11 - Ação intracelular do resveratrol (1) Ação direta sobre as espécies reativas de oxigênio. (2) Ativação do gene SIRT1.

Quando administrado via exógena o resveratrol modula a expressão de atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, glutationa peroxidase, catalase, entre outras. Um exemplo é a ativação da via da regulação da transcrição do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), ativador de genes codificantes de proteínas antioxidantes (SÉFORA-SOUZA; ANGELIS-PEREIRA, 2013). O Nrf 2 inibe a expressão de mediadores pró-inflamatórios por meio de enzimas anti-inflamatórias, como a heme oxigenase -1 (HO-1) (KIM et al., 2010).

Em condições basais o Nrf2 encontra-se no citoplasma ligado ao complexo repressor Kelchlike ECH- associado a proteína 1 (Keap-1). Em situações de estresse oxidativo o Nrf2 dissocia-se do KEAP-1 e transloca-se para o núcleo onde se liga a elemento de resposta antioxidante (ARE) e ativa a transcrição de enzimas antioxidantes (Figura 12) (DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015).

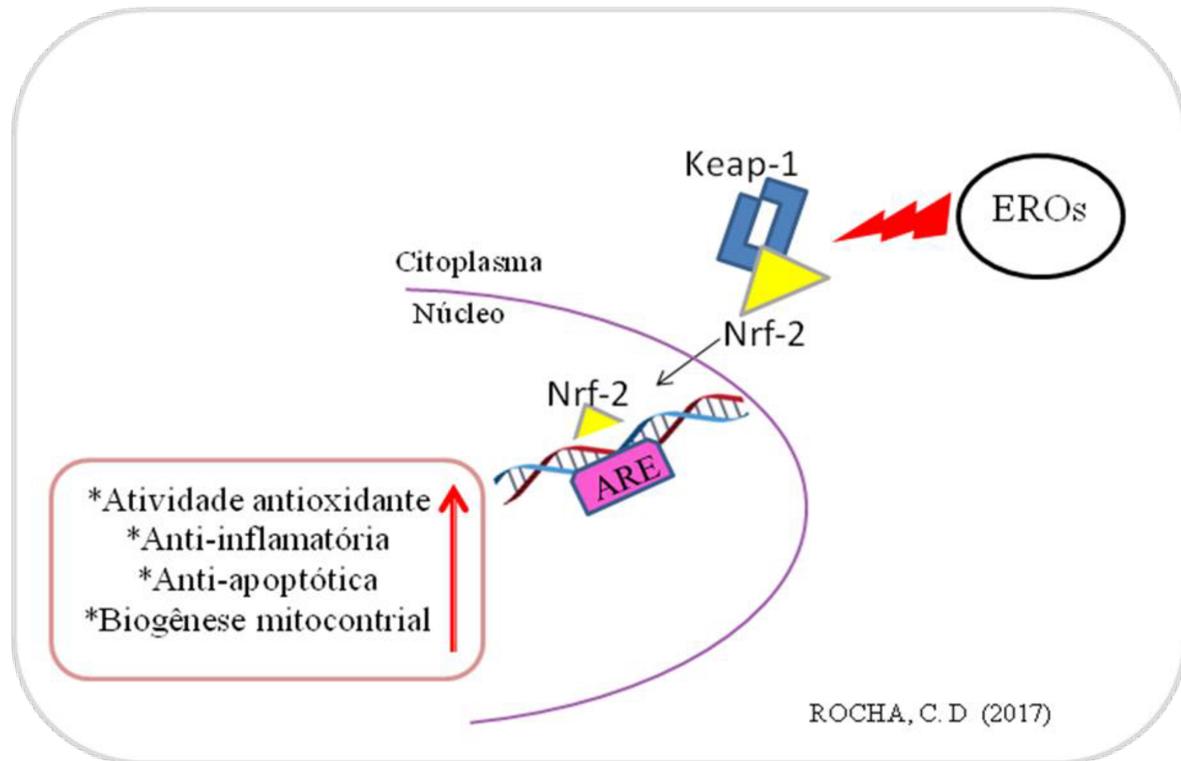


Figura 12 - Atuação das espécies reativas de oxigênio no tecido sobre Nrf2 ligado a proteína 1 (Keap-1) no citoplasma.

As EROS desempenham papel importante na reprodução, em especial de fêmeas durante o período gestacional, no parto, durante o desenvolvimento folicular desde a formação, maturação e ovulação dos ovócitos (COMBELLES et al., 2009). Também influencia a formação de blastocisto, implantação embrionária (AGARWAL et al., 2003) por vários mecanismos mediados pelo gene SIRT-1 presente nos folículos, ovócito, células da granulosa e blastocisto (WANG et al., 2013) incluindo alterações no metabolismo lipídico, inibição de síntese protéica e esgotamento de ATP (AGARWAL et al., 2005).

A expressão de biomarcadores de espécies reativas de oxigênio por meio de enzimas como superóxido dismutase, glutationa peroxidase, peróxido de lipídeo tem sido estudada em ovários humanos (RUDER et al., 2008), bovinos (TAKEO et al., 2014; KWAK; HYUN, 2012), caprinos (GALEATTI et al., 2015), suínos (GIRETTA et al., 2013; VALLORANI et al., 2012; SOMFAI et al., 2007), felinos (COMIZZOLI et al., 2009), em todas as fases de desenvolvimento folicular, incluindo folículos primordiais, primários, secundários, terciários, antrais e atrésicos (ARAÚJO et al., 2014).

Existe um equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes nos tecidos ovarianos, estas enzimas neutralizam a produção de EROS que protege o ovócitos e

embriões (LAZAR, 2012). Como forma de detecção de EROs utiliza-se biomarcadores como sondas fluorescentes, pela técnica de imunohistoquímica, Western Blot, dosagem de enzimas antioxidantes (AGARWAL et al., 2005).

### **3.5 Técnicas de análise de tecido ovariano após criopreservação**

#### **3.5.1 Histologia clássica**

A eficiência da criopreservação de tecido ovariano pode ser avaliada por diferentes técnicas com base na morfologia e na ultra-estrutura dos tecidos (OSKAM et al., 2010; NISOLLE et al., 2000), viabilidade celular (ROCHA, 2011), dentre outras técnicas.

A técnica de histologia clássica é utilizada para análise da morfologia e integridade folicular, além de permitir avaliação de um grande número de folículos e é considerada de baixo custo e de fácil execução (CARVALHO et al., 2011). É uma técnica limitada capaz de identificar somente sinais avançados de atresia, como picnose nuclear, danos citoplasmáticos como retração citoplasmática, ruptura das células da granulosa e danos na membrana basal (FAUSTINO et al., 2011), além de não permitir avaliação quanto a integridade de organelas citoplasmática (DERMICI et al., 2002).

#### **3.5.2 Microscopia confocal**

A microscopia confocal permite avaliar a viabilidade tecidual em diferentes profundidades, é uma técnica interessante quando aplicada em fragmentos de tecidos ovarianos (FABRI et al., 2014). As análises computadorizadas de imagens permitem a obtenção de resultados rápidos, objetivos, precisos e com alta repetibilidade (CARVALHO et al., 2014) e pode ser associada às sondas fluorescentes (ARRUDA et al., 2007).

As sondas fluorescentes tem sido importantes na avaliação de viabilidade folicular ovariana (LUNARDI et al., 2012). Estas sondas são indicadores de alterações metabólicas na célula, devido às mudanças de determinadas moléculas ali presentes (FABRI et al., 2014) que se ligam a moléculas específicas sob condições específicas e quando conectadas emitem fluorescência se excitadas por comprimento de onda luminosa adequado (ESPOSTI, 2002).

### 3.5.3 Sondas fluorescentes

O uso de sondas fluorescentes tem se destacado como metodologia de triagem em tecidos ovarianos para análise de viabilidade celular, devido a sua alta sensibilidade folicular (LUNARDI et al., 2015). O processo de criopreservação pode provocar ruptura da membrana celular imperceptíveis durante a análise histológica e resultar em morte folicular após o aquecimento (BANDEIRA et al., 2015).

Em análise de viabilidade, quanto à integridade da membrana plasmática podem ser utilizadas sondas fluorescentes (FABRI et al., 2014). Entre as sondas destacam-se o Hoechst 33342 (ALVES et al., 2012), YoPro-1 (GAWLITTA et al., 2004) e iodeto de propídeo (IP) (ROCHA, 2011). O iodeto de propídeo (IP) é um composto fluorescente de comprimento de onda  $\lambda$  excitação = 535 nm,  $\lambda$  emissão = 617 nm, de elevado peso molecular e funciona como marcador fluorescente nuclear de coloração vermelha, capaz de atravessar somente membranas lesionadas (GAWLITTA et al., 2004). É incapaz de identificar células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na membrana plasmática (LUNARDI et al., 2012). A viabilidade celular é caracterizada pela ausência de fluorescência de coloração vermelha, uma vez que a ruptura da membrana plasmática torna a célula inviável para futuros procedimentos como cultivo, criopreservação, transplantes entre outros (ROCHA, 2011).

O corante penetrante como 2',7' diacetato diclorofluoresceína ( $H_2$ DCFH-DA) pode ser utilizado isolado ou em associação com outros corantes (BATISTA; GUERRA, 2010). Estudos sobre viabilidade celular tem associado marcadores fluorescentes como 2',7' diacetato diclorofluoresceína ( $H_2$ DCFH-DA) e iodeto de propídeo (IP) (BARROS et al., 2013). O 2',7' diacetato diclorofluoresceína ( $H_2$ DCF-DA) é utilizado na detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As enzimas esterases intracelulares hidrolisam o DCFH-DA à DCFH, e este oxidado por espécies reativas de oxigênio resulta em 2',7' diclorofluoresceína (DCF), um composto fluorescente de comprimento de onda ( $\lambda$  excitação = 498 nm,  $\lambda$  emissão = 522 nm) (Figura 13) (FABRI et al., 2014).

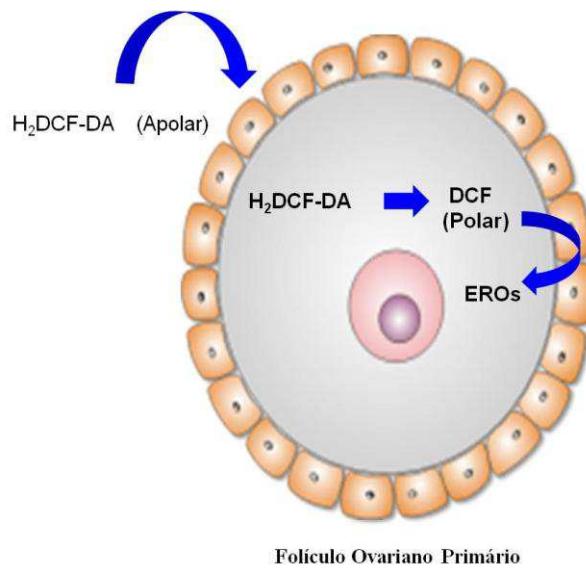


Figura 13 - Ação do 2,7 diacetato diclorofluoresceína no tecido ovariano.

Fonte: ROCHA (2011)

O método DCF é capaz de detectar a quantidade de EROs por meio de emissão de intensidade da fluorescência de coloração verde, emitida após a ação de enzimas esterases e oxidação por peróxido de hidrogênio (ESPOSTI, 2002). A intensidade de fluorescência está relacionada a quantidade de peróxidos presentes no tecido quanto maior for a intensidade de fluorescência, presença de DCF, mais DCFH foi oxidado por EROs (GLEBSKA; KOPPENOL, 2003).

#### **4 HIPÓTESES**

A presença do antioxidante resveratrol em soluções de vitrificação/ aquecimento proporciona menores danos celulares causados pelo processo de criopreservação de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecidos ovarianos.

O resveratrol favorece o restabelecimento celular após procedimento de vitrificação.

## 5 JUSTIFICATIVA

Como pode ser constatado na revisão de literatura, o resveratrol é um antioxidante de grande aplicabilidade e não há relatos da sua utilização na vitrificação de ovários de fetos bovinos. A vitrificação tem sido utilizada como uma alternativa para minimizar danos celulares causados pelo processo de criopreservação, como a formação intracelular de cristais de gelo (BANDEIRA et al., 2015).

A vitrificação também oferece riscos ao tecido ovariano, os quais podem ser decorrentes de uma redução de temperatura ineficiente, toxicidade das altas concentrações de crioprotetores, contaminação pelo nitrogênio líquido, dentre outros (AMORIM et al., 2011). Dentre as técnicas de vitrificação, a convencional, utilizando-se palhetas francesas, preenchidas com a solução de vitrificação com o tecido a ser vitrificado e as extremidades vedadas (CHEN et al., 2001) foi aprovada por pesquisadores pelo fato de ser um sistema fechado, o que não permite contato do tecido com o vapor de nitrogênio, minimizando riscos de contaminação.

Por meio do uso de vitrificação de palhetas francesas foi identificada maior proporção de folículos pré-antrais morfológicamente normais e mantida a viabilidade folicular em fragmentos ovarianos após vitrificação, quando comparado com outras técnicas de vitrificação como de superfície sólida e macrotubo (CARVALHO et al., 2011). Esta técnica permite o uso de menor volume de solução de vitrificação, além de possibilitar a vitrificação simultânea de vários fragmentos.

A utilização da espécie bovina nesta pesquisa é significativa para a pesquisa básica e aplicada. Para pesquisa básica com a finalidade de aprimorar conhecimento fisiológico e morfológico do ovário na espécie bovina. Na pesquisa aplicada a fim de utilizar fetos é de grande interesse, pois técnicas de preservação de material genético de animais, como a vitrificação de tecido ovariano com uso de antioxidantes pode também ser utilizada em outras espécies, como nas espécies em risco de extinção ou de alto valor zootécnico, uma vez que os folículos ovarianos pré-antrais iniciais da espécie bovina quando vitrificados apresentam melhores índices de sobrevivência quando comparado com as fases de desenvolvimento folicular avançada (FIGUEIREDO et al., 2008).

O desenvolvimento de protocolo e soluções para serem utilizadas em técnica de vitrificação, com objetivo de reduzir danos celulares causados pela técnica no congelamento e aquecimento é de grande relevância para a pesquisa e para o avanço da biotecnologia, bem como para a aplicação prática desta técnica na preservação de fêmeas.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, n. 5, p. 641-650, 2005

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M.A. ROLE of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, n.4, 2003.

ALVES, K.A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

ALVES, B. G.; ALVES, K.A.; ARAÚJO, V.R.; BELETTI, M. E GAMBARINI, M.I.; JACOMINI, J. O. Quantitative and morphological study of preantral follicles from prepubetal gilts. **Acta Science Veterinary**, v. 40, n 7, 2012.

ALVES, B. G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. 201-. Uberlândia, 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

AMORIM, C.A.; CURABA, M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproduction Biomedic Online**. V. 23, n. 2, p. 160-186, 2011.

AMORIM, C. A. A.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, B. D.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and Sterility**, v. 79, supl. 1, 2003.

AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; MARTINI, A.; GONÇALVES, P. B. D. Quantitative and qualitative analysis of the efficiency of the mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v. 53, p. 1251-126, 2000.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A. SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.34, n.2, p.79-85, 2010.

ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.78, 2014.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.8-16, 2007.

BALABAN, B.; URMAN, B.; ATA, B.; ISIKLAR, A.; LARMAN, MG.; HAMILTON, R.; GARDNER, D. K. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. **Human Reproduction**, v. 23, n. 9, p. 1976-1982, 2008

BANDEIRA, F. T.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; LIMA, L. F.; VIANA, D. A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; PEREIRA, M. L. S.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, AP. R. Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction Domestic Animal**, v. 50, p.177–185, 2015.

BARNETT, K, R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1- 19, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; E DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006

BARROS, L.O.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; SILVA, . E.C.B.; CARNEIRO, G.F.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de glutationa peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.65, n.2, p.430-438, 2013.

BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraesrtrural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.39, p.311-319, 2002.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **QUIMICA NOVA**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006. Mudar texto de 2016 para 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; COURBIERE, B.; GUERIN, J. F.; SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 20, n.10, p. 2745-278, 2005.

BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FAUSTINO, D. O.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; AMORIM, C. A.; BÁO S. N.; LUCCI, C. M. Cryopreservation of swine ovarian tissue: Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 195-200, 2009

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; SANTOS, F. W.; SANTOS, R. R.; CAMPOLLO, C. C.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research Veterinary**, v. 97, p. 140-147, 2014.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M.; CASTRO, S. V.; LOPES, C. A.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, v.138, n. (3-4), p. 220-7, 2013.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011

CARVALHO, A. **Vitrificação de tecido ovariano caprino**. 2010. Teresina, 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Piauí.

CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FOGIRED, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.

CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; MELO, M. A. P.; BÁO, S. N.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultrastructure after cooling and freezing of ovarian tissue. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 3-4, p. 309-318, 2008.

CHEN, S. U.; CHIEN, C. L.; WU, M. Y.; CHEN, T. H.; LAI, S. M.; LIN, C. W.; YANG, Y. S. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. **Human Reproduction**, v. 21, p. 2794-2800, 2006.

CHIAN; R. C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. **Journal Reproduction and Development**, v.50, n.6, p. 685-696, 2004.

COMBELLES, C.M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? **Reproduction Biomedicine Online**, v.18, p.864-880, 2009.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. *In Vitro* Compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44 supl.2, p. 269-274, 2009.

COSTA, L. F. S.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J . R.; CARÁMBULA, S. F.; NEVES, J. P.; MONTAGNER, M. M. Desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos *in vitro* em monocamada de células ovarianas *in vitro* development of bovine preantral follicles in monolayer of ovarian cells. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.323-327, 2001.

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J. F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 4, 2001.

DINIZ, E. G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C.; Morphological Development of the ovaries in embryos and fetuses of Nelore breed. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57, p.70-76, 2005.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; ABRAMOV, A. Y. The emerging role of Nrf-2 in mitochondrial function. **Free Radical Biology and Medicine**, v.88, p.179-188, 2015.

ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods**, v, 26, p. 335-340, 2002.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCHA, M.; MAGNANI, V.; PARADISO, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v.101, n.3, p. 795-804, 2014

FABRI, R.; PASQUINELLI, G.; KEANE, D.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Optimizarion of protocols for human ovarian tissue cryoprsevation with sucrose 1,2- propanediol and human serum. **Reproductive BioMedicine Online**, 21, p. 819-828, 2010.

FABRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA.; ROCCHETTA, G.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Human oocyte cryopreservation : new perspectives regarding oocyte survival. **Human Reproduction**, v. 16, p. 411-416, 2001.

FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.3-15, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Medica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61-868, 1997.

FIGUEIREDO, J. R. Bioética: repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Ciências Veterinária nos Tropicos**. v.1, n. 1, p. 116-118., 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oocitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v.9, n. , p. 11-25, 1999.

FIGUEIREDO, J. R. HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**. v. 40, p.789 -799. 1993.

FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKALA, J.; SPICKOVA, Z.; MELZOCHB, K.; SCHMIDT, S. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry**, v. 83, p.585-593, 2003.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v. 78, p.135-63, 2003.

GALEATI, G.; SPINACI, M. Resveratrol from red grapes: An useful agent for oocyte maturation and subsequent embryonic development, **Austin Journal of invitro Fertilization**, v. 2 , n.1, p. 1-3, 2015

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCHE, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

GAWLITTA, D.; OOMENS, C. W. J.; BAAIJENS, P. T.; BOUTEN, C. V. C. Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. **Cytotechnology**, v.46, p.139-150, 2004

GIARETTA, E.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p. 1-7, 2013.

GLEBSKA, J.; KOPPENOL, W. H. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 676-682, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Varela, 2001, 340p.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reprodtcion and Fertility**, 81, p.433-42, 1987.

GULCIN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 11, p. 210-218, 2010.

GUPTA, S.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The Role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v6, p. 227-238 227, 2010.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum aormation of aovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**. v. 62, p.1322-1328, 2000.

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; REINBERG, J.; MONTAG, M.; VAN DER VEN, K.; DORN, C.; ROESING, B.; VAN DER VEN, H. Cryopreservation of human ovarian tissue: comparison of rapid and conventional freezing. **Cryobiology**, v. 55, n. 3, p. 261-268, 2007.

IWAHATA, H.; HASHIMOTO, S.; INOUE, M.; INOUE, T.; ITO, K.; YOSHIHARU NAKAOKA, Y.; SUZUKI, N.; MORIMOTO, Y. Neonatal outcomes after the implantation of human embryos vitrified using a closed-system device. **Journal Assisted Reproduction Genetic**, v. 32, p. 521-526, 2015.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Research BioMedicine Online**, v.18, n.4, p.568-577, 2009.

KEROS, V.; XELLA, S.; HULTENBY, K.; PETTERSSON, K.; SHEIKHI, M.; VOLPE, A.; HREINSSON, J.; HOVATTA, O. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.24, n.7, p. 1670-1683, 2009.

KIM, J.; CHA, Y.N.; SURH, Y.J. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. **Mutation Research**, v. 690, p.12-23, 2010.

KITADA, M.; KOYA, D. Renal Protective Effects of Resveratrol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproduction Biomedic Online**. v.11, n.5, p. 608-614, 2005

KWAK, S. S.; HYUN, S. H. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Journal of Embryo Transfer**. v. 27, n. 2, p.71-80, 2012.

LANE, M.; MAYBACH, J.; GARDNER, D. K . Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. **Human Reproduction** , v.17, n.10 p. 2686–2693, 2002.

LAZAR, L. The role of oxidative stress in female reproduction and pregnancy. **Oxidative Stress and Diseases**, 2012.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M. J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction**, v. 124, n. 4, p. 483-489, 2002.

LIMA, G. K.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotecnica de moifopa, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, p.S36-S42, 2010.

LUCCI, C. M.; KACINSKISA, M. K.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1101-1114, 2004

LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterizarion and development of na efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, p. 1467-1483, 2002

LUNARDI, F. O.; CHAVES, R. N.; LIMA, L. F.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOUZA, C. E. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; DINNYES, A.; CAMPOLLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of *in vitro* culture. **Cell Tissue Research**, 362, p.241-251, 2015.

LUNARDI, F. O.; ARAÚJO, V. R.; FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPOLLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v.107, p.121-130, 2012

LUSTER, S. M. **Cryopreservation of bovine and caprine oocytes by vitrification**. 2004. Louisiana, 35f. Tese. Louisiana State University

LUZ, H. K. M.; SANTOS, R. R.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CARVALHO, A. A.; CAMPOLLO, C. C.; SANTOS, F. W.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing medium. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 4, p. 338-342, 2012.

LUZ, H. K. M.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.R.; Rodrigues, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões, **Acta Scientiae Veterinariae** v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011

MACLELLAN, L. J.; E.M. CARNEVALE, M. A.; COUTINHO DA SILVA, C. F. SCOGGIN, J. E.; BRUEMMER, E. L. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super stimulated and non-stimulated mares. **Theriogenology**, 58, p. 911-919, 2002.

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; SINGH. J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 45-53, 2005.

NISOLLE, M.; CASANAS-ROUX, F.; QU, J.; MOTTA, P.; DONNEZ, J. Histologic and ultrastructural evaluation of fresh and frozen-thawed human ovarian xenografts in nude mice. **Reproductive Biology**, v. 74, n 1, p. 122-129, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 1-7, 1998.

OSKAM, I. C.; ASADI, B. A.; SANTOS, R. R. Histologic and ultrastructural features of cryopreserved ovine ovarian tissue: deleterious effect of 1,2-propanediol applying different thawing protocols. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 8, p.2764-2766, 2010.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L.P.; QUEIROZ, M. E. L R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal Bioscience**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

ROCHA, C. D. **Isolamento e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de marrãs pré-púberes**. 2011. Uberlândia, 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Society for Reproduction and Fertility**, 139, p. 309-318, 2010.

RODRIGUES, A. P. R.; CASTRO, S. V.; LUNARDI, F. O.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços na criopreservação de tecidos ovarianos de cabras e ovelhas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, supl. 2, p. 284-291, 2014

RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p. 345-357, 2008.

SAITO, Y.; YOSHIDA, Y.; KAZAWA, T.; TAKAHASHI, K.; NIKI, E. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n41, p. 39428-39434, 2003

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHAB, A.; BIFULCO, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. **Animal Reproduction Science**, v.151 , n. 3-4, p. 91 -96, 2014.

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIRED, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15. 2008.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, SILVA , J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v. 3237, p. 167-176, 2007.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; VAN DEN HURCK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Hormônios hipofisários e seu papel na foliculogênese Pituitary hormones and their role in folliculogenesis. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SÉFORA-SOUZA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**, v.15, n.4, p.617-626, 2013.

SHAW, J. M. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SILVA, A. R.; SOUZA, A. L. P.; SANTOS, E. A. A.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SOUZA, . C.; CASTELO, T. S. Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 219-234, 2012.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA,F.A.; SENEDA, M. M. .Estimate of the

population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, 76, p. 1051- 1057, 2011.

SMITH, P., W.S. O, N.L. HUDSON, L. SHAW, D.A. HEATH, L. CONDELL, D.J. PHILLIPS, K.P. MCNATTY. Effects of the booroola gene (FECD) on body-weight, ovarian development and hormone concentrations during fetal life. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 98, n.1, p.41-54, 1993.

SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; KARJA, N. W. K.; FARHUDIN, M.; DINNYE'S, 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**, v.55, p.115-126, 2007.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; Carlos A. MALLMANN C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.3, p. 437- 442, 2005.

SUCCU, S.; LEONI, G. G.; BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; BEBBERE, D.; MOSSA, F.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. **Theriogenology**. v.1, n.68, suppl.1, p.107-114, 2007.

SUZUKI, N.; YOSHIOKA, N.; TAKAE, S.; SUGISHITA, Y.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, C. S.; MORIMOTO, Y.; KAWAMURA, K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Human Reproduction**, v. 30, n.3, p.608–615, 2015

SUZUKI, N.; HASHIMOTO, S.; IGARASHI, S.; TAKAE, S.; YAMANAKA, M.; YAMOCHI, T.; TAKENOSHITA, M.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y.; ISHIZUKA, B. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. **Human Reproduction**, p. 1-10, 2012.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIK, R.; IWATA, H. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.60, n.2, 2014

TATONE, C.; EMIDIO, G.; VITTI, M.; CARLO, M.; SANTINI JR., S.; ALESSANDRO, A. M.; FALONE, S; AMICARELLI, F. Review article Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1-11. 2015.

TATONE, C.; EMIDIO, G. D.; MARILENA VENTO, M.; ROSANNA CIRIMINNA, R.; ARTINI, P. G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; LAWSON, M. S. L.; ZELINSKI, M. B. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2461-2472, 2011.

VALLORANI, C.; SPINACIA, M.; BUCCIA, D.; PORCU E.; TAMANINIA, C.; GALEATI, G. Pig oocyte vitrification by cryotop method and the activation of the of the apoptotic cascade. **Animal Reproduction Science**. v. 135, p.68-74, 2012.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formaçao of mammalian oocytes and their growth differemtiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VOLOSHYNA, I.; HUSSAINI, S. M.; REISS, A. B. Resveratrol in cholesterol metabolism and atherosclerosis. **Journal of Medicinal Food**, v.15, n.9, p. 763-773, 2012.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P. .; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013.

WALLACE, W. H. B.; KELSEY, T. W.; ANDER, R. fertility preservation in pré-pubertal girls with câncer: the role of ovarian. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 6-12, 2016.

ZHANG, H.; ZHAI, A.; WANG, Y.; ZHANG, J.; WU, H.; WANG, Y.; LI, C.; LI, D.; LU, L.; WANG, X.; CHANG, J.; HOU, Q.; JU, Z.; ZHOU, D.; MENG, A. Resveratrol meliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v.54, p.40-50, 2013.

ZHOU, X. H; WUB, Y. J.; SHIA, J.; YA-XIAN XIA.; ZHENG, S. S. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of novel direct cover vitrification and conventional vitrification. **Cryobiology**, 60, p.101-105, 2010.

**CAPÍTULO 2 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
INCLUSOS EM FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS  
VITRIFICADOS COM O ANTIOXIDANTE RESVERATROL**

## **Aspectos morfológicos de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos de fetos bovinos vitrificados com antioxidante resveratrol**

**Resumo:** Objetivou-se com este estudo avaliar a morfologia de folículos pré-antrais de ovários de fetos bovinos vitrificados com e sem resveratrol. Os ovários (n=18) foram fragmentados e distribuídos aos tratamentos controle (C), vitrificado sem resveratrol (SR) e vitrificado com resveratrol (CR) na concentração de 20  $\mu$ M. Os folículos pré-antrais foram quantificados e classificados de acordo com a morfologia. O percentual de folículos normais diferiu entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) de modo que o grupo de folículos vitrificados com resveratrol foi superior ao grupo dos vitrificados sem resveratrol. No grupo de folículos vitrificados com resveratrol a classe de folículos primordiais apresentou maior percentual ( $P < 0,05$ ) de folículos normais. Em contrapartida a classe de folículos secundários apresentou a menor porcentagem de folículos normais em ambos os tratamentos. Adicionalmente, foi observada uma associação negativa ( $P < 0,05$ ) entre a proporção de folículos viáveis e o estágio de desenvolvimento folicular. A probabilidade de se encontrar folículos viáveis foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo de folículos vitrificados na presença do antioxidante resveratrol e folículos primordiais do grupo com resveratrol apresentaram 2,5 vezes mais chance de viabilidade após a vitrificação. A chance de se observar folículos normais foi maior ( $P < 0,05$ ) nas fases iniciais de desenvolvimento folicular. O diâmetro dos folículos de transição e seus respectivos ovócitos foi menor quando submetidos ao processo de vitrificação com resveratrol ( $P < 0,05$ ). Na classe de folículos primários, os diâmetros foliculares e ovocitários foram semelhantes entre os grupos estudados. Os resultados nos permitem concluir que o resveratrol beneficiou a preservação de folículos ovarianos pré-antrais em fases iniciais de desenvolvimento quando submetidas ao processo de vitrificação/ aquecimento, uma vez que estes folículos inclusos em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos apresentaram melhor morfologia celular na presença do antioxidante resveratrol, evidenciando seu efeito positivo na manutenção e viabilidade folicular sobre a membrana citoplasmática celular.

**Palavras-chave:** Folículos pré-antrais. Resveratrol. Vitrificação.

## **Morphological aspects of preantral follicles included in ovarian fragments of bovine fetuses vitrified with antioxidant resveratrol**

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the morphology of preantral follicles of ovaries of bovine fetuses vitrified with and without resveratrol. The ovaries (n = 18) were fragmented and distributed to control (C), vitrified without resveratrol (SR) and vitrified with resveratrol (CR) at the concentration of 20  $\mu$ M. The preantral follicles were quantified and classified according to morphology. The percentage of normal follicles differed between treatments ( $P < 0.05$ ) so that the group of follicles vitrified with resveratrol was superior to the group of vitrified without resveratrol. In the group of follicles vitrified with resveratrol the class of primordial follicles had a higher percentage ( $P < 0.05$ ) of normal follicles. In contrast, the secondary follicle class had the lowest percentage of normal follicles in both treatments. In addition, a negative association ( $P < 0.05$ ) was observed between the proportion of viable follicles and the stage of follicular development. The probability of finding viable follicles was higher ( $P < 0.05$ ) in the group of vitrified follicles in the presence of the antioxidant resveratrol and primordial follicles of the group with resveratrol presented 2.5 times more chance of viability after vitrification. The chance of observing normal follicles was higher ( $P < 0.05$ ) in the early stages of follicular development. The diameter of the transitional follicles and their respective oocytes was lower when submitted to the vitrification process with resveratrol ( $P < 0.05$ ). In the primary follicle class, the follicular and oocyte diameters were similar among the groups studied. The results allow us to conclude that resveratrol benefited the preservation of preantral ovarian follicles in the early stages of development when submitted to the vitrification / warming process, since these follicles included in fragments of ovarian tissue of bovine fetuses presented better cellular morphology in the presence of the antioxidant resveratrol, evidencing its positive effect on the maintenance and follicular viability on the cellular cytoplasmic membrane.

**Keywords:** Preantral follicles. Resveratrol. Vitrification

## 1 Introdução

A criopreservação de tecido ovariano apresenta diversas vantagens, entre as quais podemos citar a grande quantidade de ovócitos inclusos em folículos ovarianos e o fato dos folículos pré-antrais, em especial os primordiais, serem mais resistentes aos danos causados pela criopreservação (SHAW, 2000). Entre os processos de criopreservação a vitrificação tem se destacado por proporcionar maior viscosidade, impedindo formação de cristais de gelo no meio intracelular (SANTOS et al., 2007).

A exposição de tecidos aos crioprotetores, a redução de temperatura e aquecimento podem desencadear danos celulares morfológicos e estruturais (DERMICI et al., 2001). Durante a vitrificação, a formação de espécies reativas de oxigênio pode ser gerada por meio de diferentes mecanismos, como o aumento metabólico oxidativo, estresse osmótico (CASTRO et al., 2011), ou mesmo alterações nos mecanismos de defesa celular como dos antioxidantes, que protegem as células da peroxidação lipídica (RIBEIRO et al., 2005). A presença de espécies reativas de oxigênio em excesso tende a causar alterações celulares como danos nas membranas celulares. Com objetivo de minimizar estes danos causados pelo processo de vitrificação/ aquecimento o uso de antioxidantes como catalase (CARVALHO et al., 2013) e resveratrol tem sido empregados visando reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (TAKEO et al., 2014).

O resveratrol tem se destacado por apresentar propriedades farmacológicas de ação benéfica sobre os tecidos, é um antioxidante com ação anti-inflamatória, anticancerígena, neuroprotetora, cardioprotetora, entre outros (WANG et al., 2013). Além de modular e melhorar as defesas antioxidantes celulares por meio de ação direta ou indireta sobre as espécies reativas de oxigênio (LEE et al., 2010). Na vitrificação as espécies reativas de oxigênio parecem aumentar, principalmente após o aquecimento celular, uma vez que há a reintrodução do oxigênio nas células criopreservadas bem como a retomada das reações de oxidação e redução, culminando com a produção de espécies reativas de oxigênio, evidenciando a necessidade do aumento das defesas antioxidantes após o aquecimento celular (GIARETTA et al., 2013).

Segundo Diniz et al. (2005) ovários de fetos bovinos acima de 180 dias de gestação apresentam folículos pré-antrais em todos os estágios de desenvolvimento o que possibilita a avaliação dos efeitos da vitrificação em todos estes estágios. Uma das técnicas eficientes para se avaliar o efeitos dos processos de criopreservação de tecidos é a histologia clássica, por ser prática, eficiente e de baixo custo (FABRI et al., 2014) As secções histológicas são utilizadas

para avaliar a morfologia e a viabilidade do tecido ovariano após vitrificação/ aquecimento, além de permitir a classificação folicular quanto ao desenvolvimento (primordial, transição, primários e secundário).

Na literatura não há estudos sobre a vitrificação de fragmentos ovarianos de fetos bovinos associados ao antioxidante resveratrol. Desta forma, objetivou-se com este estudo avaliar a morfologia de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento associada ou não ao resveratrol.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Coleta dos Ovários**

Ovários de fetos bovinos ( $n = 18$ ) a partir de 180 dias de gestação foram obtidos de frigorífico local. A idade dos fetos foi determinada pela distância em centímetros da articulação atlanto-occipital e a inserção da cauda (REXOARD et al., 1974). Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% por 10 segundos, em seguida lavados duas vezes em PBS e transportados em caixa isotérmica a temperatura de 4°C, por até 2 horas.

### **2.2 Preparação das amostras**

No laboratório os ovários foram cortados ao meio e a fragmentação do córtex ovariano originou fragmentos de 3 mm x 3mm x 1mm. Foram distribuídos 6 fragmentos/ réplica aos seguintes grupos: controle (C), sem resveratrol (SR) e com resveratrol (CR), realizado 3 réplicas. Uma parte dos fragmentos ( $n=2$ ) do grupo controle foi fixada em paraformaldeído 4% por 3 horas e em seguida fixada em álcool 70% para análise de histologia clássica e outra parte ( $n=4$ ) reservada para outras análises. Os fragmentos dos grupos vitrificados ( $n=6$ ) e vitrificados com resveratrol ( $n=6$ ) passaram por processo de vitrificação antes da fixação em paraformaldeído 4% por 3 horas e fixação em álcool 70% (CARVALHO et al., 2014).

### 2.3 Vitrificação e aquecimento

O processo de vitrificação de fragmentos ovarianos envolveu o equilíbrio das amostras em duas soluções de vitrificação (SV) com diferentes concentrações de crioprotetores (CARVALHO et al., 2014). A solução 1 (SV1) continha TCM199 suplementado com 10 mg/ mL de Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 10% de EG e 10% DMSO. A solução 2 (SV2) foi composta por TCM199 suplementado com 10mg/ mL Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 20% de EG e 20% DMSO. O tratamento com resveratrol SV1Res utilizou as mesmas soluções de base (SV1) com o acréscimo do antioxidante 20  $\mu$ M resveratrol (TAKEO et al., 2014). Do mesmo modo SV2Res composto por SV2 e adicionado 20  $\mu$ M resveratrol. Os fragmentos foram expostos a SV1 e SV1Res, respectivamente grupo sem resveratrol (SV1) e com resveratrol (SV1 Res), durante 4 minutos e em seguida expostos a SV2/ SV2Res durante 1 minuto, todo os procedimentos realizados a temperatura ambiente.

Em seguida os fragmentos foram envasados em bainhas francesas com SV2 que foram vedadas com massa acrílica. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio por 5 minutos (-30°C) e mergulhadas em nitrogênio líquido por 1 minuto em seguida armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) durante uma semana (TING et al., 2011).

Para o aquecimento, as amostras foram expostas a temperatura ambiente a 25°C por 30 segundos e em seguida imersas em banho-maria a 37°C durante 1 minuto. Após o aquecimento, o grupo de fragmentos vitrificados sem o resveratrol foi submetido à remoção da solução de vitrificação por meio de solução de lavagem (SL), realizada em 3 etapas: I) TCM199 + 3 mg/ mL de BSA +0,5M de sacarose, II) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,25 M de sacarose, e III) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA. O grupo de fragmentos vitrificados com resveratrol também foi submetido à remoção da solução de vitrificação como a anterior, sendo que a solução de lavagem I foi acrescida 20  $\mu$ M resveratrol, II) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,25 M de sacarose, e III) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA. Os fragmentos ficaram por 5 minutos em cada etapa em ambos os grupos (CARVALHO et al., 2014). Após aquecimento os fragmentos foram incubados por 24 horas em placas de 24 poços contendo 500  $\mu$ L de meio TCM 199 suplementado com gentamicina (1 $\mu$ L/mL), em temperatura ambiente (25°C) (DAI et al., 2015).

## 2.4 Histologia clássica

Os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4%, em álcool 70% e encaminhados para análise de histologia clássica e após inclusão em parafina os fragmentos foram seccionados serialmente a 7  $\mu\text{m}$  de espessura (ALVES et al., 2015) e corados com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas utilizando microscopia de luz (Nikon, Japão) em aumento de 400x e imagens capturadas pelo Leica Software Imaging, Wetzlar, Alemanha.

Os folículos foram classificados em normais quando o ovócito e nucléolo estavam preservados e circundados por células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas e os folículos degenerados (anormais) aqueles que apresentaram citoplasma do ovócito retraído ou desorganizado, com células da granulosa separada da membrana basal e ovócito com núcleo picnótico (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Os folículos pré-antrais foram quantificados e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento em primordial (ovócito rodeado por uma camada de células da granulosa achatadas com forma elíptica), transição (uma camada de células da granulosa achatada e cuboides), primário (uma camada completa de células da granulosa cuboides e todo o ovócito com aspecto esférico) e secundário (ovócito com zona pelúcida rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides) (FIGUEIREDO et al., 1993)

Foram medidos apenas diâmetro dos folículos pré-antrais incluídos em fragmentos ovarianos de fetos bovinos morfológicamente normais. A medida foi calculada a partir da média de dos eixos perpendiculares de cada estrutura (folículo e ovócito) através do programa computacional Las Ez aumento de 400x. Todas as avaliações e medições foram realizadas pelo mesmo operador.

## 2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos à transformação logarítmica. As variáveis paramétricas (diâmetro folicular e ovocitário, razão diâmetro folicular/ovocitário e percentual médio de folículos normais) foram comparadas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis.

A análise de regressão linear avaliou a associação entre porcentagem de folículos normais e classe folicular. Em adição, a razão de chances (Odds Ratio) foi determinada para avaliar a influência da classe folicular sobre a porcentagem de folículos normais após a vitrificação com resveratrol. Os dados foram apresentados na forma de média ( $\pm$  erro padrão da média) e percentagem e os resultados considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### 3 Resultados

Foram validados 2 fragmentos/ réplica/ grupo, totalizando 53.559 folículos distribuídos em 881 secções histológicas. O percentual médio de folículos normais diferiu entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ) de modo que o grupo de folículos vitrificados com resveratrol foi superior ao grupo dos vitrificados sem resveratrol. Além disso, a proporção de folículos normais vitrificados com resveratrol foi superior nas classes primordial, transição e primário quando comparado com o grupo vitrificado sem resveratrol (Tabela 1). No grupo de folículos vitrificados a proporção de folículos normais foi maior ( $P < 0,05$ ) nas classes dos folículos primordiais e de transição. Já no grupo de folículos vitrificados com resveratrol a classe de folículos primordiais apresentou maior proporção ( $P < 0,05$ ) de folículos viáveis. Em contrapartida a classe de folículos secundários apresentou a menor proporção de folículos normais nos tratamentos avaliados.

Tabela 1 – Percentual médio ( $\pm$  epm) de folículos pré-antrais normais de ovários de fetos bovinos de acordo com a classe de desenvolvimento folicular nos diferentes tratamentos.

	Primordial	Transição	Primário	Secundário	Total
Controle	$68,3 \pm 1,2^{\text{Aab}}$	$71,4 \pm 2,1^{\text{Aa}}$	$68,4 \pm 3,2^{\text{Aab}}$	$57,9 \pm 6,2^{\text{Ab}}$	$68,1 \pm 1,2^{\text{A}}$
Vitrificado	$33,5 \pm 1,8^{\text{Ba}}$	$32,7 \pm 2,5^{\text{Ba}}$	$21,1 \pm 2,8^{\text{Bb}}$	$11,9 \pm 3,1^{\text{Bb}}$	$32,8 \pm 1,7^{\text{B}}$
Resveratrol	$57,0 \pm 1,4^{\text{Ca}}$	$49,8 \pm 2,5^{\text{Cb}}$	$45,1 \pm 3,3^{\text{Cb}}$	$17,5 \pm 2,9^{\text{Bc}}$	$56,1 \pm 1,4^{\text{C}}$

<sup>A, B, C</sup> na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ )

<sup>a, b, c</sup>, na mesma linha diferem entre si ( $P < ,05$ )

Adicionalmente, a análise de regressão linear considerando os folículos dos tratamentos vitrificado e vitrificado com resveratrol demonstrou uma associação negativa ( $P < 0,05$ ) entre a proporção de folículos viáveis e o estágio de desenvolvimento folicular (Figura 1).

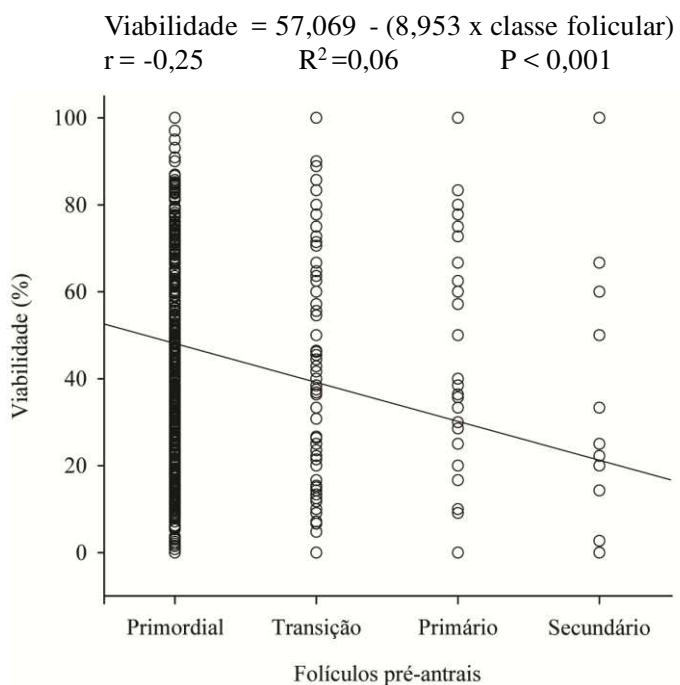


Figura 14 - Proporção de folículos pré-antrais viáveis nas diferentes classes de desenvolvimento folicular. Análise de regressão linear simples representada pela equação e pela linha.

A análise de razão das chances (Odds ratio) entre os grupos de folículos vitrificados demonstrou que independente da classe folicular, a probabilidade de encontrar folículos viáveis foi 2,5 vezes superior ( $P < 0,05$ ) no grupo de folículos vitrificados na presença do antioxidante resveratrol (Tabela 2). Na comparação entre classes foliculares, observou-se que folículos primordiais do grupo com resveratrol apresentaram 2,5 vezes ( $P < 0,05$ ) mais chance de viabilidade após a vitrificação. Em adição as classes de folículos em desenvolvimento vitrificados na presença de resveratrol também apresentaram maiores chances de viabilidade em comparação ao grupo de folículos vitrificados.

Tabela 2 – Razão de chances (Odds ratio) para viabilidade folicular nas diferentes classes foliculares dos grupos vitrificado e vitrificado com resveratrol

Classe folicular	Grupos	Viabilidade	OR	IC - 95%	Valor-P		
Primordial	Vitrificado	29,4 (4043/13725)	2,5	2,4 - 2,7	0,0001		
	vs.						
Transição	Vitrificado	51,8 (7534/14544)	2,1	1,7 - 2,5	0,0001		
	Resveratrol						
Primário	Vitrificado	31,1 (366/1175)	2,7	2,0 - 3,7	0,0001		
	vs.						
Secundário	Vitrificado	48,8 (416/ 851)	2,4	1,3 - 4,4	0,0052		
	Resveratrol						
Total	Vitrificado	10,1 (16/157)	2,5	2,4 - 2,6	0,0001		
	vs.						
		51,0 (8172/16022)					
OR: Odds ratio		IC: Intervalo de confiança	Valor-P (P < 0,005)				

A razão das chances para viabilidade folicular entre as classes foliculares dentro do grupo de folículos vitrificados com resveratrol demonstrou que a chance de se observar folículos normais é maior ( $P < 0,05$ ) nas fases iniciais de desenvolvimento folicular (Tabela 3). Sendo assim, a maior chance foi observada quando comparadas as classes de folículos primordiais com a de secundários.

Tabela 3 - Razão das chances (Odds ratio) para viabilidade folicular após vitrificação com resveratrol

Classes foliculares	Viabilidade %	OR	IC - 95%	Valor-P
Primordial	51,8 (7534/14544)			
vs.		1,1	0,9 - 1,2	0,1052
Transição	48,8 (416/851)			
Primordial	51,8 (7534/14544)			
vs.		1,4	1,1 - 1,6	0,0023
Primário	43,8 (171/390)			
Primordial	51,8 (7534/14544)			
vs.		3,9	2,8 - 5,3	0,0001
Secundário	21,5 (51/237)			
Transição	48,5 (416/851)			
vs.		1,2	0,9 - 1,5	0,1121
Primário	43,8 (171/390)			
Transição	48,8 (416/851)			
vs.		3,4	2,4 - 4,8	0,0001
Secundário	21,5 (51/237)			
Primário	43,8 (171/390)			
vs.		2,8	1,9 - 4,1	0,0001
Secundário	21,5 (51/237)			
OR: Odds ratio	IC: Intervalo de confiança		Valor-P (P < 0,005)	

As médias dos diâmetros dos folículos primordiais foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) nos grupos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol (Tabela 4). Em contrapartida, o diâmetro dos folículos de transição e seus respectivos ovócitos foram menores quando submetidos ao processo de vitrificação com resveratrol ( $P < 0,05$ ). O que não foi observado para os folículos primários.

Tabela 4 – Média ( $\pm$  epm) dos diâmetros dos folículos e ovócitos das diferentes classes foliculares nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol.

	Primordial		Transição		Primário	
	Folículo	Ovócito	Folículo	Ovócito	Folículo	Ovócito
Controle	30,3 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	26,4 $\pm$ 1,0 <sup>A</sup>	33,5 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	25,3 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	33,9 $\pm$ 2,0 <sup>A</sup>	22,1 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>
Vitrificado	30,9 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	26,8 $\pm$ 0,8 <sup>A</sup>	36,0 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	27,9 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	35,2 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	18,8 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>
Vitrificado+ Resveratrol	26,3 $\pm$ 1,1 <sup>A</sup>	21,5 $\pm$ 1,2 <sup>B</sup>	28,5 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	20,4 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>	31,8 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	19,6 $\pm$ 1,3 <sup>A</sup>

<sup>A, B</sup> na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ )

A razão diâmetro folicular e ovocitário foi analizada (Tabela 5). Na comparação entre os grupos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol na classe de folículos primordiais não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na razão (folículo/ ovócito). Esta proporção na classe de folículos de transição foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo de folículos vitrificados com resveratrol em relação do grupo vitrificado sem resveratrol. Por outro lado, os folículos primários do grupo vitrificado apresentaram maior razão ( $P < 0,05$ ) comparado aos tratamentos controle e vitrificado com resveratrol.

Tabela 5 – Razão ( $\pm$  epm) das médias dos diâmetros folicular e ovocitário nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol

	Primordial	Transição	Primário
Controle	1,14 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	1,34 $\pm$ 0,06 <sup>AB</sup>	1,56 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>
Vitrificado	1,15 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	1,29 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	1,89 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>
Vitrificado + Resveratrol	1,24 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	1,39 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	1,63 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>

<sup>A, B</sup> na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ )

#### 4 Discussão

Dentro de nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho que avaliou os efeitos da vitrificação de folículos pré-antrais de fetos bovinos associada ao resveratrol. A proporção de folículos normais diferiu entre os tratamentos de modo que o grupo de folículos vitrificados com resveratrol foi superior ao grupo dos vitrificados sem resveratrol, comprovando que a associação de agentes crioprotetores intracelulares DMSO e EG com antioxidante resveratrol preservou a morfologia após os processos de vitrificação/ aquecimento de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos. A formação de espécies reativas ao oxigênio aumenta após o aquecimento celular, uma vez que há reintrodução de oxigênio nas células criopreservadas, e a retomada das reações oxidação e redução, evidenciando a necessidade do aumento das defesas antioxidantes após o aquecimento celular (TATONE et al., 2010). Os antioxidantes permitem maior proteção às membranas plasmáticas, por agirem sobre as espécies reativas ao oxigênio como radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ) (BARROS et al., 2001) provenientes do processo de vitrificação/ aquecimento e do metabolismo celular.

O resveratrol proporciona equilíbrio osmótico durante a vitrificação, especialmente no aquecimento (GIARETTA et al., 2013), momento em que o metabolismo celular foi restabelecido (CARVALHO et al., 2014), e que a integridade de membrana plasmática é imprescindível para a viabilidade celular (COURBIERE et al., 2005). O uso de resveratrol em ovócitos suínos durante a maturação, vitrificação e aquecimento ou 2 horas após aquecimento previne e inibi aos danos causados pela criopreservação (GIARETTA et al., 2013). Carvalho et al. (2014) propõem que a adição de antioxidantes em qualquer etapa da vitrificação/ aquecimento de fragmento de tecidos ovarianos pode prevenir a produção de espécies reativas de oxigênio causada pela criopreservação.

No grupo de folículos vitrificados a proporção de folículos normais foi superior nas classes dos primordiais e de transição, enquanto que no grupo de folículos vitrificados com resveratrol a classe de folículos primordiais apresentou a maior proporção de viabilidade. De acordo com KAGAWA et al. (2009), os ovócitos imaturos presentes no interior dos folículos pré-antrais, principalmente os primordiais são mais resistentes ao processo de vitrificação/ aquecimento que ovócitos maduros. Para SHAW et al. (2000) isto ocorre devido às características como o tamanho do ovócito, baixa taxa metabólica, fase celular prófase I, ausência de zona pelúcida, ausência de grânulos corticais e pequena quantidade de lipídios

intracitoplasmáticos, o que poderia ter contribuído para melhorar a permeabilidade aos agentes crioprotetores e diminuir a formação de radicais livres.

A classe de folículos secundários apresentou a menor proporção de folículos normais em ambos os tratamentos e a associação negativa entre a proporção de folículos viáveis e o estágio de desenvolvimento folicular confirma que o processo de criopreservação tende favorecer os folículos pré-antrais nas fases iniciais de desenvolvimento por serem folículos pouco diferenciados celularmente, corroborando com outros estudos (HOVATTA et al., 2005; VAJTA et al., 1998).

Além disso, a análise de razão das chances (Odds ratio) entre os grupos de folículos vitrificados demonstrou, que independente da classe folicular a probabilidade de se encontrar folículos viáveis foi superior no grupo de folículos vitrificados na presença do antioxidante resveratrol. O antioxidante resveratrol tem sido uma alternativa a ser utilizada para melhorar índices na produção *in vitro* de embriões criopreservados, elevando taxa de sobrevivência e eclosão, após vitrificação/ aquecimento (SALZANO et al., 2014; COMIZZOLI et al., 2009).

Na comparação entre classes foliculares, os folículos primordiais do grupo com resveratrol apresentaram 2,5 vezes mais chance de viabilidade após a vitrificação. Os folículos vitrificados com resveratrol demonstraram que a chance de se observar folículos normais é maior nas fases iniciais de desenvolvimento folicular, segundo (SILVA et al., 2002) fases iniciais de desenvolvimento folicular são mais resistentes a vitrificação/ aquecimento e metabolicamente menos ativos.

Em relação à viabilidade folicular o uso deste antioxidante na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  em meio de maturação está relacionado à alta taxa de blastocistos (43,5%) e baixa expressão de genes reguladores de apoptose como Bcl-2 e Caspase-3 (LEE et al., 2010). Soluções de aquecimento suplementadas com resveratrol (2  $\mu\text{M}$ ) reduziram os níveis de apoptose em ovócitos suínos após aquecimento (GIARETTA et al., 2013; KWAK; HYUM, 2012). Em bovinos, a maturação de ovócitos com resveratrol nas concentrações 0,1 - 1 e 10  $\mu\text{M}$  aumentaram as concentrações intracelulares de glutationa (GSH), um dos sistemas de defesa antioxidante celular (WANG et al., 2013).

As médias dos diâmetros dos folículos primordiais foram semelhantes nos grupos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol. Em contrapartida, o diâmetro dos folículos de transição e seus respectivos ovócitos foram menores quando submetidos ao processo de vitrificação com resveratrol. Segundo Luz et al. (2012) as alterações na permeabilidade da membrana celular podem levar ao aumento de água intracelular e consequentemente aumento do volume celular, além da presença de vacúolos citoplasmáticos e degeneração celular. Os

folículos e ovócitos retraem quando expostos a crioprotetores intracelulares (SANTIN et al., 2009), devido à desidratação causada pela hiperosmolaridade do meio extracelular, pois a membrana celular é mais permeável à saída de água do que à entrada de crioprotetores (HOLT, 2000).

A semelhança entre os diâmetros foliculares e ovocitários na classe dos folículos primários em todos os grupos de tratamento demonstra que o resveratrol proporcionou condições favoráveis para que os folículos tivessem entrada controlada de água e por isso se apresentaram menores na fase de transição, mas que na fase seguinte já recuperaram as taxas de crescimento observadas nos outros grupos. Este fato pode ter contribuído para a preservação da viabilidade folicular no grupo vitrificado com resveratrol. Durante o aquecimento é necessário a utilização de uma solução que atue como tampão osmótico para evitar a entrada rápida de água na célula e levar ao aumento exagerado de volume e danos celulares (SANTOS et al., 2006). A comunicação do ovócito e células da granulosa por aderência pode facilitar a recuperação do diâmetro destas estruturas, que expressam o gene SIRT 1 (EMIDIO et al., 2014; WANG et al., 2013) relacionado a biogênese mitocondrial e ativado pelo antioxidante resveratrol (KWAK; HYUM, 2012). Estudo anterior avaliou os benefícios do resveratrol na concentração de 20  $\mu$ M em ovócitos bovinos e observou que este antioxidante regula a expressão de SIRT-1 em ovócitos, consequentemente o aumento no número de mitocôndrias e ATP em ovócitos maturados (TAKEO et al., 2014).

É importante ressaltar que estudos sobre o uso de antioxidantes, especialmente o resveratrol, em processo de vitrificação/aquecimento auxiliam no desenvolvimento de novas técnicas na criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais, principalmente de fetos bovinos, com a perspectiva de melhoramento genético, por meio de geração de descendentes férteis, além da redução de intervalo de gerações e com o genoma bem preservado.

Os resultados nos permitem concluir que o resveratrol beneficiou a preservação de folículos pré-antrais em fases iniciais de desenvolvimento quando submetidas ao processo de vitrificação/ aquecimento, uma vez que estes folículos inclusos em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos apresentaram melhor morfologia celular quando associados ao antioxidante resveratrol, evidenciando seu efeito positivo na manutenção e viabilidade folicular sobre a membrana citoplasmática celular.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, K.A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.
- BARROS, L. F. HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 401-409, 2001.
- CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FW SANTOS, F. W.; SANTOS, R. R.; CAMPOLLO, C. C.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research Veterinary**, v. 97, p. 140-147, 2014.
- CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.
- COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. *In vitro* compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. **Reproduction Domestic Animal**, v. 44 supl.2, p. 269-274, 2009.
- COURBIERE, B.; MASSARDIER, J.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; GUERIN, J. F.; LORNAGE, J. Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheep ovaries with vascular pedicle by vitrification. **Fertility and Sterility**. v. 84, supl 2, p. 1065-1071, 2005.
- DAÍ, J.; WU, C.; MUNERI, C. W.; 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**, v. 71, p. 291-298, 2015.
- EMIDIO, G. D.; FALONE, S.; VITTI, M.; ALESSANDRO, A. M.; VENTO, M.; PIETRO, C. D. AMICARELLI, F.; TATONE, C. SIRT1signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. **Human Reproduction**, v. 29, n. 9, p. 2006-2017, 2014.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCHA, M.; MAGNANI, V.; PARADISO, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v.101, n.3, p. 795-804, 2014

FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.3-15, 2011.

FIGUEIREDO, J. R. HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R. et al. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**. v. 40, p.789 -799. 1993.

GIARETTA, E.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p. 1-7, 2013.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal of Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue, **Reproductive BioMedicine**, v. 10, n. 6, p.729-734, 2005.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Research BioMedicine Online**, v.18, n.4, p.568-577, 2009.

KWAK, S. S.; HYUN, S. H. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Journal of Embryo Transfer**. v. 27, n. 2, p.71-80, 2012.

LEE, K.; WANG, C.; CHAILLE, J. M.; MACHATY, Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*. **Journal Reproduction Development**, v. 56 p.330-335, 2010.

LUZ, H. K. M.; SANTOS, R. R.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CARVALHO, A. A.; CAMPELLO, C. C.; SANTOS, F. W.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase prevents lipid peroxidation and enhances survival of caprine preantral follicles cryopreserved in a 1,2-propanediol-freezing medium. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 4, p. 338-342, 2012.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. **Society for Reproduction and Fertility**, v.139, p. 309-318, 2010.

REXOAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Croup-rump length of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.3, p.346-347, 1974.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELUZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L.P.; QUEIROZ, M. E. L R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal Bioscience**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHAB, A.; BIFULCO, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. **Animal Reproduction Science**, v.151 , n. 3-4, p. 91 -96, 2014.

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

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DENHURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v. 327, p. 167-176, 2007.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; VAN DEN HURCK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249-263, 2006.

SHAW, J. M. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L. F.; COSTA, S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.105-117, 2002.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIK, R.; IWATA, H. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.60, n. 2, 2014

TATONE, C.; EMIDIO, G. D.; MARILENA VENTO, M.; ROSANNA CIRIMINNA, R.; ARTINI, P. G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, v.26, n. 8, p. 563-567, 2010.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; LAWSON, M. S. L.; ZELINSKI, M. B. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2461-2472, 2011.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 51, p. 53-58, 1998.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P. .; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013.

**CAPÍTULO 3 - VIABILIDADE TECIDUAL E PERfil OXIDATIVO DE  
FRAGMENTOS OVARIANOS DE FETOS BOVINOS VITRIFICADOS COM  
RESVERATROL**

## **Viabilidade tecidual e produção de espécies reativas de oxigênio de fragmentos ovarianos de fetos bovinos vitrificados com resveratrol**

**Resumo:** Objetivou-se com este estudo analisar a viabilidade tecidual e a produção de espécies reativas de oxigênio após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento de fragmentos ovarianos de fetos bovinos associados ou não ao resveratrol. Foram fragmentados (3mm x 3mm x 1mm) ovários (n=18) de fetos bovinos e distribuídos aos tratamentos: controle (C), vitrificado sem resveratrol (SR) e vitrificado com resveratrol (CR) e realizado a análise em microscopia confocal com as sonda diacetato diclorofluoresceína (DCF) e iodeto de propídeo (IP). Os níveis de fluorescência emitidos pelo IP no grupo de fragmentos vitrificados com resveratrol foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao grupo controle. As EROs avaliadas pela probe DCF foram semelhantes entre os grupos vitrificado sem e com resveratrol. O grupo controle apresentou maior nível de fluorescência com DCF ( $P < 0,05$ ) comparado aos outros grupos. A intensidade de fluorescência emitida com a utilização de ambas probes diminuiu ( $P < 0,05$ ) com o aumento da profundidade tecidual analisada, confirmado pela análise de regressão linear. Houve associação positiva ( $P < 0,01$ ) entre os níveis de células degeneradas e as taxas de espécies reativas de oxigênio produzidas nos tratamentos com diferentes profundidades do tecido ovariano, independentemente do tratamento e da profundidade tecidual. Todos os grupos apresentaram similaridade para os baixos níveis de EROs. A proporção de fragmentos com alto EROs foi superior ( $P < 0,05$ ) no grupo controle comparado aos tratamentos de vitrificação. Conclui-se que a produção de EROs e viabilidade tecidual por meio de análise de microscopia confocal em fragmentos de tecido ovarianos após vitrificação associada ao antioxidante resveratrol permitiu uma menor produção de EROs e maior viabilidade tecidual.

**Palavras-chave:** Antioxidante. 2'7' diacetato diclorofluoresceína. Folículos pré-antrais. Iodeto de propídeo.

## **Tissue viability and oxidative produce reactive oxygen species of ovarian fragments of bovine fetuses vitrified with resveratrol**

**Abstract:** The aim of this study was to analyze the tissue viability and the production of reactive oxygen species after the vitrification / warming procedures of ovarian fragments of bovine fetuses associated or not with resveratrol. Ovaries (n = 18) of bovine fetuses were fragmented and distributed to the treatments: control (C), vitrified without resveratrol (SR) and vitrified with resveratrol (CR), and confocal microscopy Probe diacetate dichlorodihydrofluorescein (DCF) and propidium iodide (PI). The fluorescence levels emitted by PI in the group of fragments vitrified with resveratrol were similar ( $P > 0.05$ ) to the control group. The EROs evaluated by the DCF probe were similar between the vitrified groups without and with resveratrol. The control group presented a higher level of fluorescence with DCF ( $P < 0.05$ ) compared to the other groups. The intensity of fluorescence emitted with the use of both probes decreased ( $P < 0.05$ ) with the increase of tissue depth analyzed, confirmed by the linear regression analysis. There was a positive association ( $P < 0.01$ ) between degenerate cell levels and the rates of reactive oxygen species produced in treatments with different depths of ovarian tissue, regardless of treatment and tissue depth. All groups showed similarity to the low levels of ROS. The proportion of fragments with high EROs was higher ( $P < 0.05$ ) in the control group compared to the vitrification treatments. It was concluded that the production of EROs and tissue viability by means of confocal microscopy analysis in ovarian tissue fragments after vitrification associated with the antioxidant resveratrol, better cryopreserved the ovarian fragments, allowing a lower production of ROS and greater viability.

**Keywords:** Antioxidants. 2'7' dichlorofluorescein diacetate. Preantral follicles. Propidium iodide.

## 1 Introdução

A criopreservação de tecido ovariano tem sido uma estratégia para proteger a função ovariana de mulheres jovens com câncer dos efeitos tóxicos da quimioterapia e radioterapia. Além disso, esta técnica vem sendo difundida com o intuito de preservar os gametas de animais de alto valor genético ou em vias de extinção (FIGUEIREDO et al., 1993).

Estudos têm sido realizados com objetivo de aprimorar o processo de criopreservação de gametas femininos de modo a obter melhor aproveitamento do potencial reprodutivo. Entre os métodos de criopreservação a vitrificação é considerada viável e eficiente para a criopreservação de tecido ovariano por apresentar altas taxas de sobrevivência de folículos pré-antrais ovarianos já estudados em roedores (FATEHI et al., 2013; WANG et al., 2011; HASEGAWA et al., 2006), ovinos (SANTOS et al., 2007), caprinos (CARVALHO et al., 2011), bovino (BAO et al., 2010), suínos (HASHIMOTO et al., 2013), macacos (SUZUKI et al., 2012; YEOMAN et al., 2005) e seres humanos (KHOSRAVI et al., 2013; AMORIM et al., 2012; SHEIKHI et al., 2011; DONNEZ et al., 2004). O efeito negativo do processo de criopreservação são os danos à estrutura celular decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio EROs (AGARWAL et al., 2005) que são produzidas fisiologicamente pelo metabolismo celular. O excesso de EROs ou níveis de antioxidantes insuficientes torna-se prejudiciais às células, levando a oxidação de biomoléculas como proteínas, carboidratos e lipídeos, DNA e perda da homeostase celular ocasionando danos irreversíveis e morte celular (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). Com o objetivo de minimizar a produção de EROs tem sido utilizada substâncias antioxidantes nas soluções de vitrificação e/ou de aquecimento

O antioxidante resveratrol, encontrado em frutas vermelhas, como casca de uva e amoras tem se destacado devido a sua capacidade de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (DODE; SPRICIGO, 2014). Estudos comprovaram o efeito positivo do resveratrol na produção *in vitro* de embriões (LEE et al. 2010), na maturação de ovócitos antes da vitrificação (GIARETTA et al. 2013), e na capacidade de elevar a taxa de sobrevivência e de eclosão após vitrificação/ aquecimento em ovócitos bovinos quando adicionado aos meios de cultivo (ABDEL-WAHAB, 2012). Há a possibilidade de que a associação do antioxidante resveratrol pode melhorar a integridade, viabilidade e promover redução de espécies reativas de oxigênio dos folículos pré-antrais de fetos bovinos após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento.

Existem vários métodos para avaliar o efeito da criopreservação associada a antioxidantes na preservação de folículos pré-antrais, porém, os testes rápidos podem poupar

tempo, viabilizar a técnica e o aproveitamento posterior da amostra de tecido ovariano. A identificação de EROs em análise em microscopia confocal por meio de sonda fluorescente tem sido utilizada com o objetivo de quantificar o estresse oxidativo de tecidos e folículos ovarianos após criopreservação (FABRI et al., 2014). As sondas fluorescentes são excelentes sensores de espécies reativas de oxigênio, devido a alta sensibilidade, aplicabilidade, simplicidade na coleta e análise de dados, além de apresentar alta resolução espacial em técnicas de imagem microscópica.

Ovários de fetos bovinos acima de 180 dias de gestação apresentam folículos pré-antrais em todos os estágios de desenvolvimento (primordial, transição, primário e secundário) o que possibilita a avaliação dos efeitos da vitrificação em todos estes estágios e o aproveitamento destes fragmentos pode representar um grande avanço no melhoramento genético da espécie. Não há relatos sobre a vitrificação de fragmentos ovarianos de fetos bovinos nem a associação do resveratrol para este procedimento na espécie desta forma, objetivou-se com este estudo analisar a viabilidade tecidual e a produção de espécies reativas de oxigênio após os procedimentos de vitrificação/ aquecimento associados ou não ao resveratrol de fragmentos ovarianos de fetos bovinos.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Coleta dos Ovários

Ovários de fetos bovinos ( $n = 18$ ) a partir de 180 dias de gestação foram coletados em frigorífico local. A idade dos fetos foi determinada pela distância em centímetros da articulação atlanto-occipital e a inserção da cauda (REXOARD et al., 1974). Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% por 10 segundos, em seguida lavados duas vezes em PBS e transportados em caixa isotérmica a temperatura de 4°C, por até 2 horas.

### 2.2 Preparação das amostras

No laboratório os ovários foram cortados ao meio e a fragmentação do córtex ovariano originou fragmentos de 3 mm x 3mm x 1mm. Foram distribuídos 4 fragmentos/ réplica aos seguintes grupos: controle (C), sem resveratrol (SR) e com resveratrol (CR), realizado 3

réplicas. Os fragmentos dos grupos vitrificados e vitrificados com resveratrol passaram por processo de vitrificação antes da fixação em paraformaldeído 4% por 3 horas e fixação em álcool 70% (CARVALHO et al., 2014).

### 2.3 Vitrificação e aquecimento

O processo de vitrificação de fragmentos ovarianos envolveu o equilíbrio das amostras em duas soluções de vitrificação (SV) com diferentes concentrações de crioprotetores (CARVALHO et al., 2014). A solução 1 (SV1) continha TCM199 suplementado com 10 mg/ mL de Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 10% de EG e 10% DMSO. A solução 2 (SV2) foi composta por TCM199 suplementado com 10mg/ mL Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 20% de EG e 20% DMSO. O tratamento com resveratrol SV1Res utilizou as mesmas soluções de base (SV1) com o acréscimo do antioxidante 20  $\mu$ M resveratrol (TAKEO et al., 2014). Do mesmo modo SV2Res composto por SV2 e adicionado 20  $\mu$ M resveratrol. Os fragmentos foram expostos a SV1 e SV1Res, respectivamente grupo sem resveratrol (SV1) e com resveratrol (SV1 Res), durante 4 minutos e em seguida expostos a SV2/ SV2Res durante 1 minuto, todo os procedimentos realizados a temperatura ambiente.

Em seguida os fragmentos foram envasados em bainhas francesas com SV2 que foram vedadas com massa acrílica. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio por 5 minutos (-30°C) e mergulhadas em nitrogênio líquido por 1 minuto em seguida armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) durante uma semana (TING et al., 2011).

Para o aquecimento, as amostras foram expostas a temperatura ambiente a 25°C por 30 segundos e em seguida imersas em banho-maria a 37°C durante 1 minuto. Após o aquecimento, o grupo de fragmentos vitrificados sem o resveratrol foi submetido à remoção da solução de vitrificação por meio de solução de lavagem (SL), realizada em 3 etapas: I) TCM199 + 3 mg/ mL de BSA +0,5M de sacarose, II) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,25 M de sacarose, e III) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA. O grupo de fragmentos vitrificados com resveratrol também foi submetido à remoção da solução de vitrificação como a anterior, sendo que a solução de lavagem I foi acrescida 20  $\mu$ M resveratrol, II) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,25 M de sacarose, e III) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA. Os fragmentos ficaram por 5 minutos em cada etapa em ambos os grupos (CARVALHO et al., 2014). Após aquecimento os fragmentos foram incubados por 24 horas em placas de 24 poços contendo 500  $\mu$ L de meio

TCM 199 suplementado com gentamicina (1 $\mu$ L/mL), em temperatura ambiente (25°C) (DAI et al., 2015).

## 2.4 Análise da viabilidade tecidual e nível de produção de EROS

As amostras foram fixadas em DCF na concentração 10 $\mu$ M de 2'7' diacetato dichlorodihidrofluoresceína (DCF; H2DCFDA, Sigma® - D6883) por 30 minutos. Em seguida as amostras foram coradas com iodeto de propídio (Sigma® – P-4170) na concentração 100mg/mL em PBS por 15 minutos e fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos e armazenadas ao abrigo da luz, em geladeira até leitura em microscopia confocal (Leica LSM 710 Meta), por meio do programa computacional Zeiss, no aumento 40 x

Na avaliação as amostras (n=36) foram dispostas em lâmina, lamínula úmida e avaliadas com laser Argon 488 em comprimentos de onda apropriados para cada sonda, sendo DCF ( $\lambda$  excitação= 488 nm e  $\lambda$  emissão= 565 nm) e IP ( $\lambda$  excitação= 543 nm e  $\lambda$  emissão= 616 nm). Foram avaliados 4 fragmentos de cada tratamento para cada réplica e em todos os fragmentos foram analisadas imagens em 3D e a combinação das sondas. Cada fragmento passou por 3 avaliações gerando 10 secções por scaneamento microscópico confocal.

A avaliação da oxidação intracelular mede a produção de peróxido de hidrogênio por meio de detecção intracelular de oxidação gerando coloração verde que varia de alta a baixa intensidade de acordo com o grau de oxidação (FABRI et al., 2014). As amostras foram avaliadas com cálculo da intensidade de fluorescência emitida em pixels. A análise de integridade de membrana foi realizada com o corante iodeto de propídeo que permeia apenas membrana de células necrosadas, sendo que o corante reage com DNA e RNA citoplasmático, gerando fluorescência vermelha, já as células normais não fluorescem (IDZIOREK et al. 1995).

## 2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos a transformação logarítmica. O

teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os níveis de DCF e viabilidade tecidual (iodeto de propídeo) entre os tratamentos.

A correlação entre espécies reativas de oxigênio e viabilidade folicular dentro dos tratamentos e em diferentes níveis de profundidade do tecido ovariano foram calculadas pelo teste de Spearman e a diferença entre os coeficientes de correlação foi realizada pelo teste de Fischer (Fischer r-to-z transformation). A análise de regressão linear avalia a associação dos níveis de espécies reativas de oxigênio e a da viabilidade tecidual com a profundidade do tecido ovariano. Os dados foram apresentados na forma de média ( $\pm$  erro padrão da média) e os resultados considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

### **3 Resultados**

Foram avaliados 36 fragmentos (distribuídos em 3 tratamentos). As imagens geradas a partir das avaliações dos níveis de espécies reativas de oxigênio (DCF), da viabilidade tecidual (iodeto de propídeo) e a combinação entre elas estão demonstradas na Figura 1.

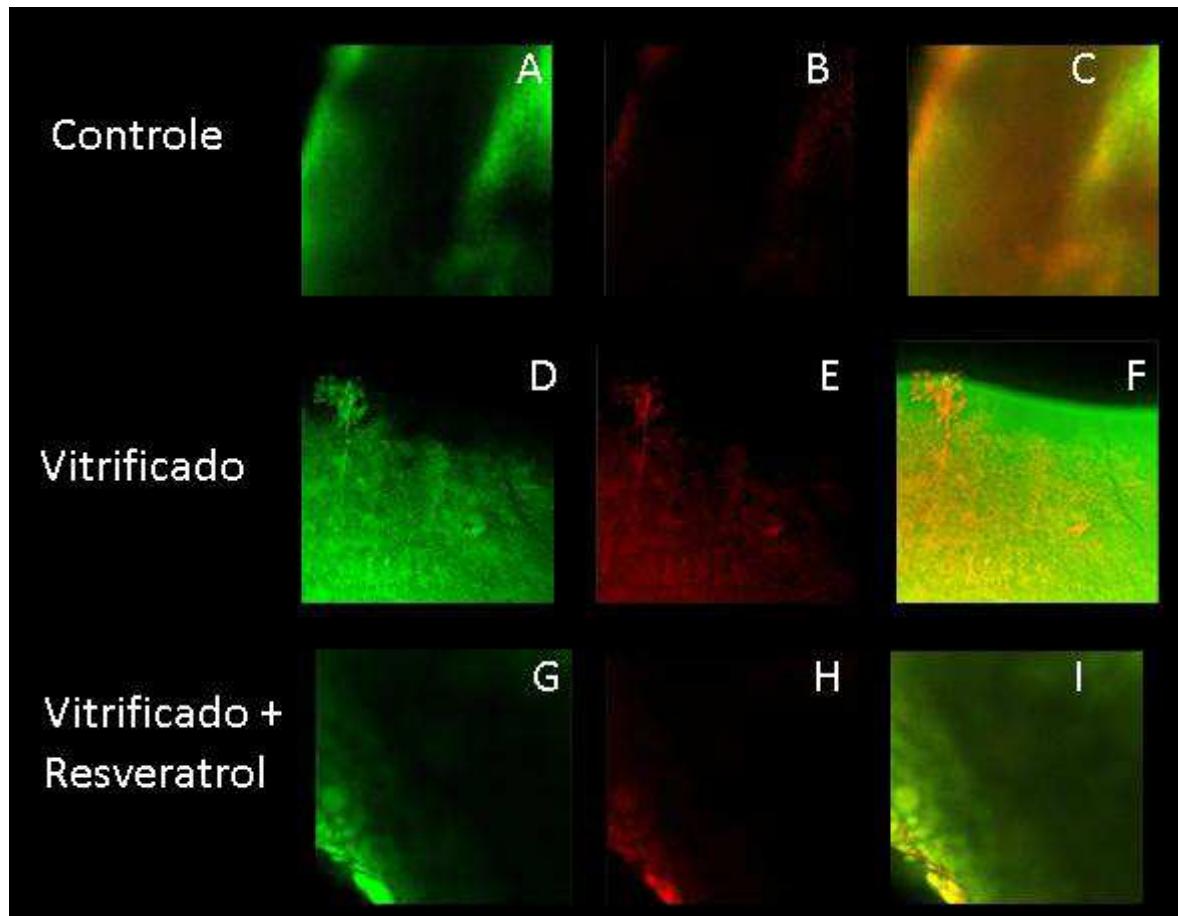


Figura 1 - Imagens representativas de microscopia confocal de fragmentos ovarianos de fetos bovinos submetidos à vitrificação com e sem adição de resveratrol. (A; D; G) diacetato diclorofluoresceína – DCF - H2DCFDA, (B; E; H) iodeto de propídeo - IP e (C; F; I) a sobreposição das probes

As intensidades de fluorescência nos diferentes tratamentos com as sondas DCF e IP estão demonstradas na figura 2.

Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram semelhantes entre os grupos vitrificados e vitrificados com resveratrol e ambos foram menores que o controle (Figura 2A). A viabilidade tecidual (IP) no tratamento vitrificado com resveratrol foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao grupo controle (Figura 2B).

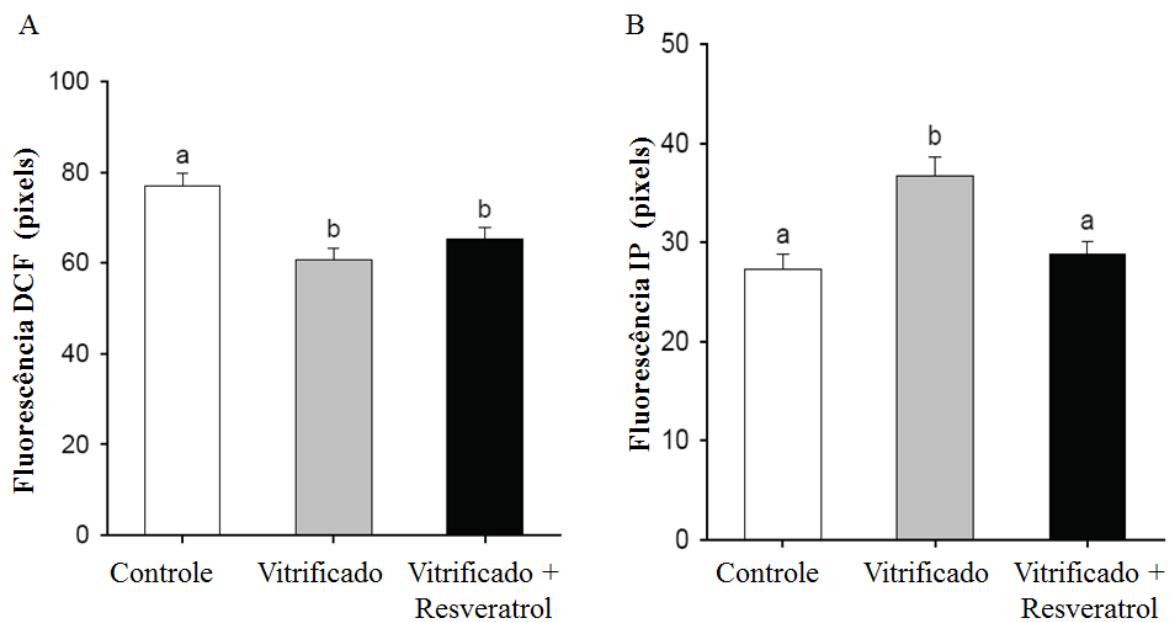


Figura 2 - Níveis de intensidades de fluorescência nos tratamentos: controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol avaliado com as probes diaceto dihlorofluoceína e iodeto de propídeo. (a; b) Diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

A fluorescência emitida nos diferentes níveis de profundidade tecidual utilizando DCF e IP foi avaliada (Figura 3). De maneira geral a análise de regressão linear demonstrou que a intensidade de fluorescência emitida com a utilização de ambas probes diminuiu ( $P < 0,05$ ) com o aumento da profundidade tecidual analisada (Figura A, B)

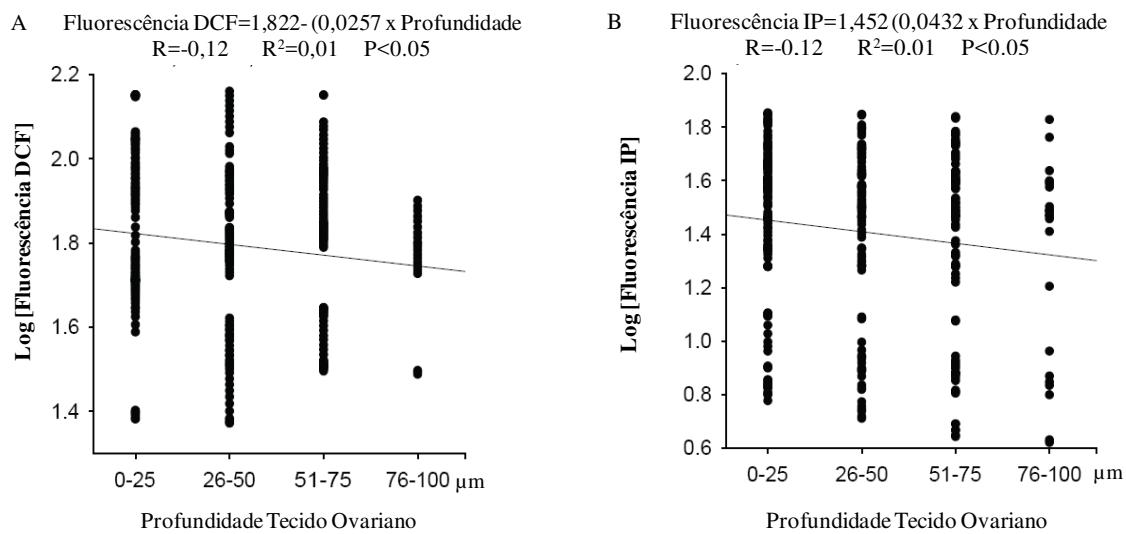


Figura 3 - A análise de regressão linear entre intensidade de fluorescência e a profundidade tecidual. Figuras A e B representam probes DCF e IP, respectivamente.

A associação entre os níveis de células degeneradas e as taxas de EROs produzidas nos tratamentos com diferentes profundidades do tecido ovariano estão apresentadas (Tabela 1). Independente do tratamento e da profundidade tecidual foi observada associação positiva ( $P < 0,01$ ) entre as variáveis analisadas. Adicionalmente, a correlação no grupo de fragmentos vitrificados com adição de resveratrol foi semelhante ao grupo controle ( $P > 0,05$ ). Por outro lado, foi observada menor ( $P < 0,05$ ) correlação no grupo de fragmentos vitrificados quando comparado ao grupo vitrificado com adição de resveratrol.

Tabela 1 – Coeficiente de correlação (r) das probes fluorescentes DCF e iodeto de propídeo em diferentes profundidades de tecido ovariano.

Tratamentos	Coeficiente de correlação (r)				
	Profundidade tecido ovariano ( $\mu\text{m}$ )				
	0 - 25	26 - 50	51 - 75	75 - 100	Acima
Controle	0,46**	0,55**	0,64**	0,81*	0,55** <sup>AB</sup>
Vitrificado	0,41*	0,41*	0,48*	0,58 <sup>+</sup>	0,43** <sup>A</sup>
Vitrificado+ Resveratrol	0,64**	0,68**	0,51*	0,72 <sup>+</sup>	0,64** <sup>B</sup>

Valores diferem (<sup>+</sup>  $P = 0,1$  - \*  $P < 0,01$  - \*\*  $P < 0,001$ ).

<sup>A, B</sup> Diferem entre si, na mesma coluna ( $P < 0,05$ ).

Os parâmetros da intensidade de fluorescência verificada com a probe DCF foram interpretados como níveis proporcionais de espécies reativas de oxigênio (Tabela 2) e estes níveis foram classificados em baixo, médio e alto, nos diferentes grupos de tratamento. Os grupos de tratamento apresentaram similaridade para os baixos níveis de espécies reativas de oxigênio. Entretanto quando os níveis foram considerados medianos o grupo vitrificado com resveratrol foi maior ( $P < 0,05$ ) comparado aos outros tratamentos. A proporção de fragmentos com alto nível de espécies reativas de oxigênio foi superior no grupo controle comparado aos tratamentos de vitrificação. Quando o nível de intensidade foi baixo o grupo vitrificado resveratrol apresentou a menor emissão de intensidade de fluorescência. Já a intensidade fluorescência média este mesmo grupo apresenta maior taxa de intensidade fluorescência de emissão.

Tabela 2 – Diferentes níveis de intensidade de flúorescência relativos à emissão da probe DCF nos tratamentos controle, vitrificado e vitrificado com resveratrol, de acordo com os níveis baixo, médio e alto.

Intensidade de Flúorescência (Pixels)			
Tratamentos	Baixo	Médio	Alto
Controle	47,4 (55/116) <sup>AB</sup>	30,1 (35/116) <sup>A</sup>	22,4 (26/116) <sup>A</sup>
Vitrificado	58,7 (67/114) <sup>A</sup>	33,3 (38/114) <sup>A</sup>	7,8 (9/114) <sup>B</sup>
Vitrificado+ Resveratrol	44,7 (51/114) <sup>B</sup>	45,6 (52/114) <sup>B</sup>	9,6 (11/114) <sup>B</sup>

<sup>A, B</sup> Diferem entre si, na mesma coluna ( $P < 0,05$ ).

Nível EROs (%)
Baixo: < 62,9
Médio: 63 a 103
Alto: > 103,1

#### 4 Discussão

Não há até o momento relatos sobre a vitrificação de fragmentos ovarianos de fetos bovinos nem a associação do resveratrol para este procedimento na espécie. Os sistemas de análises computadorizadas de imagens determinam alta repetibilidade das avaliações e são precisos, rápidos e objetivos. Os métodos fluorescentes têm sido utilizados como método de diagnóstico ou de triagem em tecidos devido a sua alta sensibilidade (SUZUKI et al., 1997) utilizado em folículos pelos pesquisadores (LUNARDI et al., 2015; TAKEO et al., 2014; LUNARDI et al., 2012) e em tecidos ovarianos (FABRI et al., 2014; KAGAWA et al., 2009; SANTOS et al., 2007).

A viabilidade tecidual do grupo vitrificado com adição de resveratrol foram semelhantes ao controle. O corante iodeto de propídeo tem a propriedade de marcar o DNA celular e devido ao seu elevado peso molecular, não atravessa facilmente membranas íntegras (WANG et al., 2008), bem como não marcam células apoptóticas sem que apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática (GAWALITTA et al., 2004), como ocorre nos estágios finais da apoptose (LUNARDI et al. 2012). O acréscimo do antioxidante resveratrol elevou a proteção da membrana celular dos fragmentos vitrificados, impedindo a

entrada do marcador IP, reduzindo os efeitos prejudiciais da peroxidação lipídica da membrana celular provocada pelo estresse oxidativo e processo de criopreservação (FREMONT, 2000).

O resveratrol é um antioxidante natural associado à longevidade, o seu potencial terapêutico vem sendo estudado em muitas áreas como cardiologia, oncologia, infectologia e em biotecnologia celular e, em especial, na reprodução (GIRATTA et al., 2013). Segundo Sato et al. (2014) a adição de 20  $\mu$ M de resveratrol em meio de maturação melhora a qualidade de ovócitos em suínos e ativa a expressão do gene SIRT1 presente em folículos pré-antrais ovarianos, ovócitos, células da granulosa e blastocistos (WANG et al., 2013), além de proporcionar efeitos positivos como renovação e manutenção de mitocôndrias saudáveis.

Os níveis de EROs avaliados pela probe DCF foram semelhantes entre os grupos vitrificados e vitrificados com resveratrol. Além disso, o grupo controle apresentou maior ( $P<0,05$ ) nível de fluorescência com DCF comparado aos demais grupos. Foi o que ocorreu em maior proporção no grupo controle, que não teve contato com resveratrol, que poderia minimizar a formação de peróxido de hidrogênio no tecido.

O grupo diacetato, por ser apolar, se difunde facilmente através da membrana celular e no meio intracelular é hidrolizado por esterases intracelulares, deixando livres as moléculas de DCFH. Estas, por serem polares, proporcionam um excelente substrato ao peróxido de hidrogênio gerado em excesso, provavelmente, devido ao estresse metabólico (SILVEIRA, 2004) e ao processo de criopreservação (TATEMOTO et al., 2004) que se tornam fluorescentes na presença de peróxidos oxidativos. A intensidade de fluorescência está relacionada a quantidade de peróxidos presentes no tecido (CARVALHO 2014; FABRI et al., 2014). Foi o que ocorreu em maior proporção no grupo controle, que não teve contato com o antioxidante resveratrol, que poderia minimizar a formação de peróxido de hidrogênio no tecido.

A intensidade de fluorescência emitida com a utilização de ambas probes diminuiu com o aumento da profundidade tecidual, em todos os grupos avaliados. Segundo Figueiredo et al. (1993) o parênquima de ovários fetais é menos fibroso do que ovários adultos, o que poderia facilitar a permeabilidade do tecido aos agentes crioprotetores intracelulares e permitir redução de choque osmótico na presença de sacarose (TING et al., 2015).

Considerando os níveis percentuais medianos de espécies reativas de oxigênio do grupo vitrificado com resveratrol, notou-se que o antioxidante proporcionou restabelecimento metabólico equilibrado após o aquecimento. A suplementação de meios de maturação *in vitro* e procedimento de vitrificação/ aquecimento com resveratrol pode modular o processo de

apoptose, melhorando a resistência dos ovócitos às espécies reativas de oxigênio (GIRATTA et al., 2013) e aos danos induzidos pela criopreservação (FAUSTINO et al., 2011). O efeito benéfico do resveratrol sobre a vitrificação de tecidos cultivados *in vitro* está relacionado à sua atividade antioxidante, que mantém a viabilidade celular por protegê-las contra lesões oxidativas. Os altos níveis de espécies reativas de oxigênio são o principal fator prejudicial para o desenvolvimento celular *in vitro* (CARVALHO et al., 2013).

Conclui-se que a produção de EROs e viabilidade tecidual por meio de análise de microscopia confocal em fragmentos de tecido ovariano após vitrificação associada ao antioxidante resveratrol preservou melhor os fragmentos ovarianos, permitindo uma menor produção de EROs e maior viabilidade tecidual.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, A. M.; ZULLO, G.; BOCCIA, L.; DE BLASI, M.; LONGOBARDI, V.; ALBERO, G GASPARRINI, B. Resveratrol during *in vitro* culture improves cryotolerance of *in vitro* produced bovine embryos. **Reproduction Fertility and Development**, v.25, p.213-214, 2012.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive Biomedicine Online**, v.11, p.641-650, 2005.

AMORIM, C. A.; DOLMANS, M-M.; DAVID, A.; JAEGER, J.; VANACKER, J.; CAMPONI, A.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.98, n. 5, p.1291-1298, 2012.

BAO, R.; YAMASAKA, E.; MONIRUZZAMAN, M. Developments of vitrified bovine secondary and primordial follicles in xenofrafts. **Theriogenology**, v.74, p. 817-827, 2010.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LUZ, H. K. M.; ROSSETTO, R. LOPE, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P. R. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after *in vitro* culture of caprine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.76, p.933-941, 2011.

DAÍ, J.; WU, C.; MUNERI, C. W.; 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**, v. 71, p. 291-298, 2015.

DODE, M.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de Embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Spermova**, v.4, n.1, p.26 -32, 2014.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; DEMYLLE, D.; JADOU, P.; PIRARD, C.; SQUIFFLET, J.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A. Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet**, v.364, p.1405-1410, 2004.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCHI, M.; MAGNANI, V.; PARADISO, R.; VENTUROLI, S. Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. **Fertility and Sterility**, v.101, n.3, p. 795-804, 2014.

FATHI, R.; VALOJERDI, M. R.; SALEHNA, M. Effects of different cryoprotectant combinantions on primordial follicle survivability and apoptosis incidence after vitrification on whole rat ovary. **Cryo Letters**, v. 34 n. 3, p. 228-238, 2013.

FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.3-15, 2011.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVER, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p. 789-799, 1993.

FREMONT, L. Biological efects of resveratrol, **Life Sciences**, v. 66, n.8, p.663-673, 2000.

GAWLITTA, D.; OOMENS, C. W. J.; BAAIJENS, P. T.; BOUTEN, C. V. C. Evaluation of a continuous quantification method of apoptosis and necrosis in tissue cultures. **Cytotechnology**, v.46, p.139-150, 2004.

GIARETTA, E.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p.1-7, 2013.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal Biochemical Biophysical Methods**, v.65, p.45-80, 2005.

HASEGAWA, A.; MOCHIDA, N.; OGASAWARA, T.; KOYAMA K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, p.1182-1198, 2006.

HASHIMOTO, S.; SUZUKI, N.; AMO, A.; YAMOCHI, T.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y. Good Thermally Conducting Material Supports Follicle Morphologies of Porcine Ovaries Cryopreserved with Ultrarapid Vitrification. **Journal Reproduction Development**, v.59, n.5, p. 496-499, 2013.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; DE BELS, F.; AMEISEN, J. C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal Immunological Methods**, v.185, p.249-258, 1995.

KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Research BioMedicine Online**, v.18,n.4, p.568-577, 2009.

KHOSRAVI, F.; REID, R. L.; ABOLHASSANI, M. F.; VALOJERDIM, R.; KAN, F. W. K. *In vitro* development of human primordial follicles to preantral stage after vitrification. **Journal Assisted Reproduction Genet**, v.30, p.1397-1406, 2013.

LEE, K.; WANG, C.; CHAILLE, J. M.; MACHATY, Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*. **Journal Reproduction Development**, v. 56 p.330-335, 2010.

LUNARDI, F. O.; CHAVES, R. N.; LIMA, L. F.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOUZ, C. E. A. S.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; DINNYES, A.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of *in vitro* culture. **Cell Tissue Research**, v. 362, p.241-251, 2015.

LUNARD, F. O.; ARAÚJO, V. R.; FAUSTITNO, L. R.; CARVALHO, A. A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BÁO, S. N.; NAMEB, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v.107, p.121-130, 2012.

REXOAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crou-rump flength of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.3, p.346-347, 1974.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DENHURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v. 327, p. 167-176, 2007.

SATO, D.; ITAMI, N.; TASAKI, H.; TAKEO, S.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. **PLoS One**. V. 9 n.4, p. 1-8, 2014.

SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA, O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, v. 26, n. 3, p.594-603, 2011.

SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabologia**, v.48, n.6, p. 812-822, 2004.

SUZUKI, N.; HASHIMOTO, S.; IGARASHI, S.; TAKAE, S.; YAMANAKA, M.; YAMOCHI, T.; TAKENOSHITA, M.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y.; ISHIZUKA, B. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. **Human Reproduction**, p.1-10, 2012.

SUZUKI, Y. J.; FORMAN, H. J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulators of signal transduction. **Free Radical Biology Medicine**. v. 22, p. 269-285, 1997.

TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIKI, R.; IWATA, H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction Development**, v. 60, n. 2, p. 94-99, 2014.

TATEMOTO, H.; MUTO, N.; SUNAGAWA, I.; SHINJO, A.; NAKADA, T. Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.1150-1157, 2004.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; LAWSON, M. S. L.; ZELINSKI, M. B. *In vitro* development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2461-2472, 2011.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P. .; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013.

WANG, X. Q.; CATT, S.; PANGESTU, M.; TEMPLE-SMITH, P. Successful *in vitro* culture of preantral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v.141, p.183-191, 2011.

WANG, Y.; XIAO, Z.; LI, L.; FAN, W.; LI, S. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. **Human Reproduction**, v.23, n.10, p. 2256-2265, 2008.

YEOMAN, R. R.; WOLF, D. P.; LEE, D. M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 1248-1254, 2005.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de protocolo de soluções de vitrificação, com intuito de reduzir danos celulares causados pela técnica na criopreservação e aquecimento é de grande relevância para a pesquisa e para o avanço da biotecnologia, bem como para a aplicação prática desta técnica em material genético de fêmeas.

A utilização de fetos bovinos é relevante na pesquisa básica e aplicada com objetivo de aprimorar conhecimentos morfológicos e fisiológicos da reprodução animal. O uso de fetos bovinos na biotecnologia animal permite melhoramento genético, o encurtamento de gerações de descendentes férteis, formação de banco genético e preservação da espécie.

O resveratrol beneficiou a preservação de folículos ovarianos pré-antrais em fases iniciais de desenvolvimento quando submetidas ao processo de vitrificação/ aquecimento, uma vez que estes folículos inclusos em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos apresentaram melhor morfologia celular quando associados ao antioxidante resveratrol, evidenciando seu efeito positivo na manutenção e viabilidade folicular sobre a membrana citoplasmática celular.

A produção de EROs e viabilidade tecidual por meio de análise de microscopia confocal utilizando as probes DCF e IP em fragmentos de tecido ovarianos após vitrificação associada ao antioxidante resveratrol preservou melhor os fragmentos ovarianos, permitindo uma menor produção de espécies reativas de oxigênio e maior viabilidade através da manutenção da membrana citoplasmática celular.

Neste estudo a associação do antioxidante resveratrol às soluções de vitrificação/ aquecimento em fragmentos de tecido ovariano de fetos bovinos apresentou melhor morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais.