

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

RODOLFO FERNANDES CARRIJO

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL: 10 μ M E 20 μ M**

UBERLÂNDIA

2016

RODOLFO FERNANDES CARRIJO

**VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL: 10 μ M E 20 μ M**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

Coorientadora: Deize de Cássia Antonino

Uberlândia - MG

2016

RODOLFO FERNANDES CARRIJO

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL: 10 μ M E 20 μ M

Trabalho de conclusão de curso aprovado
para obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia (MG) pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, 09 de dezembro de 2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Octávio Jacomini
(Orientador – UFU)

Prof. Dr. João Batista Ferreira dos Santos
(Examinador –UFU)

Deize de Cássia Antonino
(Examinadora – UFU)

Paula Batista Alvarenga
(Examinadora – UFU)

Dedico essa monografia à Deus,
aos meus pais e minha irmã que
tanto me apoiaram, me fazendo
acreditar cada dia mais em mim
e em minhas capacidades,
dedico também a todos os
animais do mundo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelas pedras colocadas em meu caminho, por que somente com elas que eu pude aprender a tomar as melhores decisões pra poder seguir em frente, tomando essas pedras como bênçãos de aprendizado.

Agradeço aos meus pais José Antonio e Ioleide, por tudo que fizeram por mim, por cada palavra dita, por cada quilometro percorrido por meu pai para poder me formar um médico veterinário, e que mesmo distante, nunca me deixou passar despercebido em suas orações e preocupações, também por cada estendida de mão para me tirar do fundo do poço, onde por muitas vezes estive em meios a tantos turbilhões, pelas inúmeras vezes que minhas energias se esgotaram e então como uma fonte viva de luz, me colocaram no colo dizendo que ali eu poderia chorar e que eu estaria acolhido, retomando minhas energias para seguir em frente, sempre prontos para me defender, me ensinando as lições da vida para depois me deixar voar. Jamais poderei deixar de lado, o agradecimento à minha irmã, que com todo seu jeitinho, e dificuldades que tem passado como ser humano, irmã, filha e mãe, nunca deixou de se preocupar comigo.

Agradeço aos meus avós maternos, Brígida e Sebastião (Bica), pelo incentivo que sempre me deram, me dizendo que um dia eu iria ser o melhor veterinário que eles iriam conhecer, por amar o que eu faço.

Aos meus amigos, tios e tias, primos e primas que sempre me apoiaram nas diversas vezes que quando tudo estava o mais difícil possível, nunca saíram do meu lado, segurando minha mão e me dando forças não me deixando cair.

Agradeço a Maria Augusta Okubo pelo apoio que sempre foi me dado desde o inicio deste ciclo; a ela gostaria de agradecer por tudo que tem feito para me ajudar, até mesmo nos problemas de saúde.

Ao prof. Dr. José Octavio Jacomini, por me orientar e acreditar na minha capacidade enquanto aluno e pesquisador.

À mestrande Deize de Cássia Antonino que além de coorientadora, foi amiga e fonte de sustentação, me auxiliando em todos os momentos que foram necessários.

À Prof^ª Dr^ª Kele Amaral Alves que fora referência de sabedoria e humildade. Meus verdadeiros agradecimentos pelos momentos de ascensão ao conhecimento.

Agradeço à Amanda Lima, Carina Rocha, Jairo Melo, Mayara Mafra e Paula Alvarenga, por toda ajuda carinho e tempo dedicado que tiveram comigo durante todo o tempo no laboratório de reprodução FAMEV-UFU.

Agradeço à Aparecida de Castro Rodrigues pela amizade sincera, confiança, companheirismo e fidelidade que sempre teve a mim, tornando os dias acadêmicos mais felizes.

Aos meus irmãos de coração Hellen, Jayslan e Luciano Rodovalho, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos fáceis e difíceis.

Aos professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, minha eterna gratidão pelas aulas enriquecedoras que ministraram durante o meu curso, despertando em mim o amor pela reprodução animal, aumentando minha paixão pela espécie equina e ser cada dia mais apaixonado pelos animais.

Agradeço novamente à Deus por cada animal que tem pusestes em minha vida, sendo por eles que vivo, respiro, trabalho e dedico toda a minha vida.

“Eu sei o que é ter pouco, e também sei
o que é ter muito, em toda e qualquer
situação, eu aprendi o segredo de ser
bem alimentado, e de estar com fome, de
ter muito e de passar necessidade, eu sei
fazer todas as coisas,
“TUDO POSSO NAQUELE QUE ME
FORTALECE.”

Filipenses 4:12

RESUMO

O vigente estudo foi realizado com a finalidade de comparar as diferentes soluções de antioxidante na vitrificação de tecido ovariano equino, uma técnica de criopreservação mais rápida comparada ao congelamento lento, avaliando a morfologia e viabilidade dos folículos vitrificados inclusos no tecido ovariano equino. Para tanto, fragmentos de ovário medindo 3mm x 3mm x 1mm foram vitrificados em palhetas francesas, utilizando duas diferentes soluções de vitrificação (SV), contendo 10 um de resveratrol e 20 um de resveratrol. Após quinze dias, os fragmentos do tecido ovariano foram aquecidos e processados para histologia para análise morfológica dos folículos. A análise histológica mostrou que não houve diferença estatística entre os tratamentos com SV1Res10 e SV1Res20 no percentual de folículos morfológicamente normais após vitrificação, ocorrendo uma considerável retração citoplasmática dos folículos, e que a solução controle, mostrou-se melhor. Em conclusão, a vitrificação contendo resveratrol como antioxidante nas concentrações 10 um e 20 um de resveratrol, não foram suficientes para se obter resultados positivos em relação à normalidade dos folículos ovarianos de eqüinos e integridade destes nos fragmentos, de modo que o tempo de exposição ao agente antioxidante e a temperatura podem não são a mais adequadas para vitrificação de tecido ovariano equino.

Palavras-chave: Criopreservação. Equino. Folículos. Resveratrol. Vitrificação.

ABSTRACT

The present study was carried out to compare the different antioxidant solutions in vitrification of equine ovarian tissue, a faster cryopreservation technique compared to slow freezing, evaluating the morphology and viability of vitrified follicles included in the equine ovarian tissue. For that, ovary fragments measuring 3mm x 3mm x 1mm were vitrified on French vane, using two different solutions of vitrification (SV), containing 10 µm of resveratrol and 20 µm of resveratrol. After 15 days, the fragments of the ovarian tissue were heated and processed for histology for morphological analysis of the follicles. The histological analysis showed that there was no statistical difference between the treatments with SV1Res10 and SV1Res20 in the percentage of morphologically normal follicles after vitrification, with a considerable cytoplasmic retraction of the follicles, and that the control solution was better. In conclusion, vitrification containing resveratrol as an antioxidant for both 10 µm and 20 µm of resveratrol, so that the time of exposure to the antioxidant agent and temperature, are not most suitable for vitrification of equine ovarian tissue.

Key - words: Cryopreservation, equine, follicles, resveratrol and Vitrification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. OVOGÊNESE.....	13
2.2. FOLICULOGÊNESE.....	13
2.3. BIOTÉCNICAS DE MOIFOPA.....	15
2.4. CRIOPRESERVAÇÃO.....	16
2.4.1. Criopreservação na espécie equina	17
2.4.2. Vitrificação geral.....	18
2.4.3. VITRIFICAÇÃO EM EQUINOS.....	19
2.5. AVANÇOS E DIFICULDADES NA VITRIFICAÇÃO EQUINA	20
2.6. USO DE ANTIOXIDANTES.....	22
2.6.1. Resveratrol.....	22
2.6.2. Resveratrol na vitrificação.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. COLETA E PREPARAÇÃO DOS OVÁRIOS EQUINOS.....	25
3.2. PREPARAÇÃO DE MEIOS E VITRIFICAÇÃO.....	25
3.3. MEIOS DE AQUECIMENTO E AQUECIMENTO DOS FRAGMENTOS	26
3.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	26
3.5. DESIGN DO EXPERIMENTO.....	28
4. RESULTADOS.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das biotécnicas ligadas à reprodução animal como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), criopreservação de sêmen, transferência de ovócito (T.O.), fertilização *in vitro* (FIV), manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais (MOIFOPA) e mais recente, vitrificação de tecidos ovarianos. Com o crescimento das biotécnicas reprodutivas *in vitro* grandes pesquisadores como por exemplo Nicosia et al. (1975), Greenwald e Moor (1989), Figueiredo et al. (1993), Nuttink (1993), Amorim et al. (1997), Carambula (1997), estão desenvolvendo novas pesquisas com animais de laboratório, suínos, bovinos, caprinos e ovinos, porém são poucas as pesquisas encontradas com a espécie equina.

A equinocultura brasileira destaca-se perante os demais países (CARMO et al., 2002) pelo grande número de equídeos presente em seu território, sendo 5.541.702 equinos (ALMEIDA; ILVA, 2010). Embora o plantel brasileiro seja consideravelmente grande, apenas um pequeno número de pesquisas é relatado quando se trata da biotécnica MOIFOPA em equinos quando comparadas com demais espécies (ALVES, 2014). A quantidade de folículos ovarianos pré-antrais nos mamíferos possui um número pré-estabelecido ainda na fase fetal nas fêmeas (RÜSSE, 1983). No entanto, apenas uma pequena parte dos folículos chegará a se tornar conceptos, principalmente na espécie equina, onde cada fêmea consegue uma gestação por vez, com raras exceções de gêmeos, devido às condições morfofisiológicas da espécie (NUTTINCK et al., 1993). Esse atraso foi devido às restrições impostas pelas associações das raças que por muito anos das 10 maiores associações do Brasil, apenas 6 aceitavam o uso de biotécnicas para reprodução (PIMENTEL et al., 1998; GALLI et al., 2006). Outro empecilho é a quantidade reduzida de abatedouros no mundo para a aquisição de material biológico para as pesquisas (SQUIRES et al., 2003).

Dentre as biotécnicas da reprodução, a criopreservação é uma técnica que consiste na preservação de tecidos reprodutivos através de congelamento ou vitrificação. Essa técnica é bastante utilizada tanto na reprodução humana quanto na reprodução animal, visando a preservação das linhagens de animais que possuem genética superior aos demais e/ou não possuem as funções endócrinas estabelecidas (BROECKE et al., 2001). Apesar de ser frequentemente usada para mamíferos, a criopreservação na espécie equina ainda tem resultados inferiores quando comparados a outras espécies (SQUIRES 2003; THARASANIT et al., 2006).

Na década de oitenta, os pesquisadores Rall e Fahy, descreveram o uso da vitrificação como uma nova possibilidade à técnica de criopreservação por congelamento lento, baseando-se em uma concentração alta de crioprotetores, aumentando a viscosidade do meio a ser usado para a vitrificação. Assim, é possível diminuir consideravelmente a possibilidade de formação de cristais de gelo pois, o material vitrificado passa para um estado chamado de vítreo ou amorfo (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

A vitrificação de tecido ovariano está sendo uma alternativa para a reprodução, permitindo a preservação de um considerável número de ovócitos imaturos proveniente dos folículos ovarianos pré-antrais (FOPAs), responsáveis por 90% de toda a população folicular (JEWGENOW & PARIS, 2006). Essa técnica permite a preservação de um maior número de ovócitos contidos em FOPAs, onde estes são menos agredidos pelos danos criogênicos por conta do tecido que envolve estes ovócitos (OKTAY et al.,1998; SHAW ET AL., 2000). Portanto, pelos poucos estudos aplicados à reprodução da espécie equina, especialmente em vitrificação de tecido ovariano, os objetivos para o presente trabalho foram verificar a eficiência do resveratrol na vitrificação de tecido ovariano equino nas concentrações de 10 μm e 20 μm , comparando aos tecidos vitrificados sem resveratrol e controle fresco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Ovogênese*

Conforme descrito por RÜSSE (1983), a ovogênese é o processo de formação das ovogônias a partir das células germinativas primordiais (CGP). As CGP migram para as gônadas em desenvolvimento na fase fetal da fêmea, perdendo suas características de motilidade e sofrendo redistribuições das organelas citoplasmáticas tornando-as então estruturas chamadas de ovogônias (SADEU et al., 2006).

As células germinativas se subdividem após divisão meiótica das CGP em dois tipos. Um grupo permanece em interfase e se diferencia posteriormente na formação de novas CGP, e, um segundo grupo se divide imediatamente dando origem a uma linhagem de células ovogônias (RÜSSE, 1983).

Ao iniciar a fase de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, tem-se a primeira divisão meiótica, gerando os ovócitos primários que permanecem nessa fase até que a fêmea entre no período de puberdade. Neste momento, os picos do hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) induzem a maturação dos ovócitos que terminam seu crescimento retomando à meiose e o núcleo evolui de diplóteno para diacinese. (BETTERIDGE et al., 1989). Ao iniciar a segunda divisão meiótica ocorre a evolução para a fase de metáfase II, ocorrendo a interrupção da meiose e permanecendo nesse estágio até ser fecundado, finalizando a meiose II. Após a fecundação ocorre a expulsão do segundo corpúsculo polar (SAUMANDE, 1991).

2.2. *Foliculogênese*

A foliculogênese pode ser definida como processo de formação, desenvolvimento e maturação dos folículos, iniciando-se na fase primordial, chegando até a fase madura, na qual as estruturas são chamadas de folículo dominante ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981). O folículo tem como função, manter um ambiente ideal e seguro para que o ovócito possa concluir seu desenvolvimento, sendo as fases de ovogênese e foliculogênese simultâneas (HIRSHFIELD, 1991).

A reserva de folículos primordiais é formada durante a vida fetal e, durante a vida do animal alguns folículos crescem continuamente. O crescimento ocorre devido à proliferação e as diferenciações induzidas pelos hormônios providos das células da teca e da granulosa. As

fêmeas mamíferas possuem uma quantidade de folículos que ao longo da vida diminui gradativamente (GOSDENET, 1983; GOUGEON et al., 1994). Esses folículos se apresentam em sua maioria na forma quiescentes (CAHILL; MAULÉON, 1981).

Os folículos são classificados em dois grupos de acordo com a ausência de antro (pré-antrais), e com a presença (antrais) (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011). Os folículos pré-antrais são divididos em primordiais, primários e secundários. Em geral, eles se diferenciam pelo número de camadas de células da granulosa e da teca. Já os folículos antrais são divididos em iniciais ou terciários (antro ainda em desenvolvimento) e em ovulatório (antro totalmente formado) (ARAÚJO et al., 2014).

Os folículos primordiais possuem um ovócito imaturo circundado por células da pré-granulosa em formato pavimentoso. Os folículos primários compreendem um ovócito imaturo circundado por uma camada simples de células da granulosa com formato cubóide, tendo sua comunicação formada por endocitose. Em algumas espécies como a bovina e caprina, pode ocorrer à presença de células cubóides juntamente com as pavimentosas, sendo considerados folículos de transição (VAN WEZEL et al., 1996). Já os folículos ovarianos secundários possuem duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides ao redor do folículo, podendo em alguns casos ocorrer a formação da zona pelúcida (ZP). Ainda existem lacunas no conhecimento do desenvolvimento dos folículos, porém alguns estudos mostram que são minimamente influenciados pelas gonadotrofinas e intimamente ligada as ativinas, EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), dentre outros fatores intra-ovarianos (MAYERHOFER et al., 1997).

Na espécie equina, as células primordiais passam pelo processo de mitose, recebendo então o nome de ovogônias por volta dos 50 dias de gestação (DEANSLY, 1978). Após a proliferação mitótica, as ovogônias darão início ao processo de divisão meiótica, em meado dos 75 a 160 dias de gestação, passando a ser ovócitos primários (GINTHER, 1989). Através de ultrassonografia (US) foi observado que os folículos ovarianos equinos crescem em media 3 mm em um período de sete dias antes que ocorra a ovulação, devendo chegar a um tamanho equivalente a 45 mm, um dia antes de ovular. De acordo com Redmer e Reynolds (1996), o folículo ovariano equino se torna dominante por volta de seis dias antes de ocorrer a ovulação, tornando sua morfologia de esférica para cônica devido ao aumento da ação da prostaglandina (PGF 2α). Esta alteração ocorre 3 horas antes da ovulação.

Na espécie equina, o antro é desenvolvido nos folículos quando estes atingem um tamanho de 300 μ m, formando uma camada de células da teca ao redor da granulosa. Após o desenvolvimento folicular, alguns folículos não conseguem atingir a maturidade para ovular

devido a falta de receptores para expressar o seu crescimento. Deste modo, estes folículos restantes sofrem atresia passando por um processo chamado de apoptose (KENNEY et al., 1979; HAFEZ, 1995)

Após passar pela fase de desenvolvimento, o folículo torna-se antral, e então possui em seu antro um fluido que é originado da corrente sanguínea e também dos componentes secretados pelas células da granulosa. Os constituintes que formam o fluido são os esteróides e as glicoproteínas, tornando o folículo um ambiente perfeito para um melhor desenvolvimento dos ovócitos. Esse ovócito é envolvido pelas células do *cumulus*, formando o complexo *cumulus-ovócito* (COC) (HENNET; COMBELLES, 2012).

2.3. Biotécnicas de MOIFOPA

Para um melhor aproveitamento e aumento do rebanho brasileiro e mundial de bovinos e demais animais de produção, está sendo usadas várias biotécnicas ligadas à eficiência reprodutiva, dentre essas biotécnicas podemos incluir a fertilização *in vitro* (FIV), a clonagem, trangênese e mais recentemente podemos evidenciar a manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (RÜSSE, 1983). Além de ser uma biotécnica reprodutiva que tem como foco principal o aumento da produção de animais tanto das espécies ameaçadas de extinção quanto de animais de altos índices zootécnicos esta técnica permite o resgate dos folículos para que possam ser cultivados *in vitro* até a maturação do ovócito, tendo em vista a fertilização e produção *in vitro* de embriões de alto padrão de qualidade. Ultimamente, grupos de pesquisa de todo mundo buscam compreender a foliculogênese e os processos envolvidos na reprodução, mais especificamente sobre os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA). Os primeiros estudos de FOPA realizados em animais domésticos (bovinos) e de laboratórios (camundongos) foram descritos nos anos de 1960 a 1990 utilizando métodos enzimáticos e mecânicos (GROB, 1964; FIGUEIREDO et al., 1992).

Depois de superado o estágio de desenvolvimento da FOPA, o grande desafio por parte dos pesquisadores é desenvolver meios que dê condições especiais de cultivo *in vitro* aos folículos o qual seja mais próximo do que ocorre *in vivo*. Na espécie equina não se tem muitos estudos relacionados à manipulação de ovários. Já em bovinos e caprinos, diversos estudos são publicados anualmente com relação ao cultivo de FOPA (HULSHOF et al., 1995; WANDJI et al., 1996^a; FIGUEIREDO et al., 1994^b).

A biotécnicas de MOIFOPA pode ser aplicada em diferentes áreas sendo elas: 1) pesquisa fundamental ou básica, avaliando a elucidação e regulação da foliculogênese; 2) na biologia

molecular, assegurando condições necessárias para identificar e quantificar expressões gênicas; 3) na indústria farmacêutica testando a ação de fármacos em folículos; 4) na nanotecnologia, onde é feito o teste da inocuidade de nanopartículas; 5) na biossegurança, avaliando o efeito da radioatividade de sobrevivência e capacidade de desenvolvimento folicular. A MOIFOPA contribui da mesma forma para a formação de bancos genéticos de germoplasma humano e animal visando produção *in vitro* de embriões, xenotransplante ou autotransplante auxiliando na reprodução humana assistida com a produção *in vitro* de embriões humanos, de mulheres submetidas a tratamentos quimioterápicos e multiplicação de animais através da produção *in vitro* de embriões de valor zootécnico ou em vias de extinção assim como o desenvolvimento de vacinas de imunoesterilização visando controle populacional de cães e gatos (FIGUEIREDO et al., 2009).

2.4 Criopreservação

A criopreservação é um método que permite ser feito o armazenamento de um grande número de ovócitos, quando ainda inclusos nos folículos pré-antrais, mostrando ter uma boa preservação destes ovócitos (GOSDEN et al., 1994; SHAW et al., 2000).

A criopreservação é uma técnica que oferece vantagens pelo fato de ser independente de fatores como idade, ciclo estral, podendo ser usado até mesmo com materiais coletados de fetos ou de animais que já vieram a óbito (SHAW et al., 2000). Os métodos de criopreservação se tornaram eficazes em diversas espécies e já comprovaram ser uma biotécnica com resultados positivos, porém poucos estudos envolvem a espécie equina. A criopreservação é usada em humanos, principalmente em mulheres que passarão por tratamentos radio e quimioterápicos (BROECKE et al., 2001).

Recentemente as técnicas de criopreservação atingiram de forma positiva o setor industrial onde o congelamento de embriões bovinos já possui um número superior a 823.234 transferências mundiais de embriões provindos de criopreservação em meados de 2007 (THIBIER, 2008).

De acordo com Leibo e Songsasem (2002), nos últimos 35 anos a produção de equinos e bovinos provindos de uso de material genético criopreservado, como o sêmen e o embrião, ultrapassou a casa dos milhões, sendo utilizados recentemente com maior frequência para preservar material genético de espécies em extinção e de zoológicos. Enquanto não se determina uma criopreservação específica para a espécie equina, é feito o uso dos métodos *Standards* de preservação, que também é usado para bovinos, os quais preservam o germoplasma

temporariamente (HEWITT; ENGLAND, 2001; LEIBO; SONGSASEN, 2002). Não há um padrão com relação aos métodos para se obter os fragmentos para criopreservação de tecido ovariano equino nem mesmo as dimensões dos fragmentos, assim como quais os melhores crioprotetores a serem usados para o congelamento e descongelamento (COURBIERE et al., 2006). Sabe-se que a criopreservação do tecido ovariano em formas de tiras finas ou cubo permite uma melhor penetração dos crioprotetores (PARIS et al., 2004).

A criopreservação pode ser dividida em dois tipos de técnicas, sendo a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta age através de uma curva de resfriamento lento e controlado, com diminuição da temperatura de 0,3 a 0,6°C/minuto atingindo -6°C/-7°C, evitando a formação de cristais de gelo dentro das células e, em um segundo momento com taxas similares de resfriamento, faz-se o decréscimo da curva até a temperatura de -32°C/-35°C (DINNYES et al., 2006). Já a vitrificação envolve um complexo de fatores como a temperatura, a viscosidade, a natureza do soluto e a velocidade de resfriamento agindo de forma interdependente, fazendo com que o líquido presente na célula a ser vitrificada passe para o estado vítreo, antes que seja formado cristais de gelo, porém o que determina a vitrificação é a viscosidade da solução acima de 10^{14} pascal em segundo (Pa.s), que é atingida quando se tem baixas temperaturas (LUYET, 1969). O primeiro grupo é considerado o método convencional e a vitrificação que é um processo bastante utilizado para criopreservação de tecido ovariano (SANTOS, 2005). Outros benefícios da vitrificação é a velocidade do processo, o custo consideravelmente baixo, execução fácil do método, que compreende basicamente a exposição dos agentes crioprotetores, resfriamento, armazenamento, aquecimento dos fragmentos de tecido vitrificado e remoção do agente crioprotetor (YEOMAN et al., 2005).

2.4.1 Criopreservação na espécie equina

O uso de biotécnicas cada vez mais avançadas, como por exemplo a criopreservação de tecidos reprodutivos, tem contribuído para a reprodução de várias espécies, dentre elas a espécie equina, possibilitando algumas vantagens, como o deslocamento de sêmen e embriões por longas distâncias sem perder sua capacidade vital (PARKS; GRAHAM, 1992). A IA na espécie equina iniciou-se em meados de 1957 com a utilização de sêmen criopreservado (PICKETT; AMANN, 1993). Apesar da criopreservação do sêmen ter mostrado uma grande eficiência na espécie equina, essa técnica não era muito utilizada devido às restrições que as associações impunham, alegando facilitar um aumento nas fraudes em relação aos registros dos potros (ALVARENGA, 2002).

Atualmente a técnica de criopreservação é bem aceita junto aos proprietários de haras e centrais de reprodução, devido ao uso de poucos garanhões de alto desempenho e alto índice zootécnico, podendo emprenhar um grande número de fêmeas em menor tempo. Squires et al. (1999), mostram que as taxas de prenhez são menores para sêmen criopreservado, quando comparados com sêmen fresco devido aos efeitos deletérios que os crioprotetores exercem sobre os espermatozoides. Para tentar melhorar a taxa de prenhez, utiliza-se uma dose maior, sendo 300 a 500 x 10⁶ de espermatozoides totais, ou seja, cinco a oito palhetas descongeladas por IA (SQUIRES et al., 1999). Em contrapartida Douglas-Hamilton et al. (1984), descreveram uma taxa de prenhez que chegou a 91% utilizando o container adequados para a estocagem e transporte do sêmen criopreservado podendo resultar em maior longevidade e fertilidade dos espermatozoides.

O grande aumento da demanda por animais cada vez melhores em um tempo mais curto, levou à necessidade de uma técnica que possibilitasse um maior aproveitamento individual da espécie. A criopreservação está sendo uma alternativa para impulsionar e otimizar a produção desses animais (BRANDÃO, 2008). Mesmo mostrando que as técnicas de criopreservação dentro da espécie equina como a criopreservação de sêmen, podem maximizar e acelerar o melhoramento genético na espécie, ainda faltam resultados que possam fazer com que as associações implementem o uso dessas técnicas (SQUIRES et al., 1999).

2.4.2 Vitrificação geral

A matéria é encontrada nos estados líquido, sólido e gasoso, porém um novo conceito em estado de matéria está sendo estudado por muitos pesquisadores, o qual é chamado de “estado vítreo”, que é a soma das partículas dos materiais sólidos com as partículas dos materiais líquidos, formando o que temos chamado de estado amorfo (WOLK, 2010).

Dentre os métodos de criopreservação, a vitrificação faz com que o tecido a ser vitrificado apresente-se na forma deste estado amorfo, sendo uma alternativa bastante usada. Essa técnica emprega um índice elevado na concentração de crioprotetores com o intuito de conferir à solução de vitrificação uma alta viscosidade, no qual será imerso o tecido a ser vitrificado (RALL; FAHY, 1985). O primeiro relato de vitrificação foi mencionado por Luyet na década de 40, após ter vitrificado sêmen de sapo depois de ter passado por desidratação em sacarose (LUYET, 1940). Quando ocorre essa alta viscosidade na solução, é formada uma camada amorfa ao redor do tecido a ser vitrificado, o que impede a formação de cristais de gelo intracelular (DOBRINSKY et al., 2000; RUBINSKY, 2003; CHIAN et al., 2004) diminuindo

a lesão que estes poderiam vir a causar ao tecido (SMITH et al., 2010; UBALDI et al., 2010). Portanto, a vitrificação diminui ou anula a concentração de cristais de gelo nos tecidos a serem vitrificados, porém não anula a possibilidade de formação de outros fatores prejudiciais, como um alto nível de toxicidade aos tecidos, somada ao tempo e a temperatura de exposição dos tecidos à solução de vitrificação (BERTOLINI et al., 2005).

A vitrificação pode ser usada como forma de criopreservação de ovócitos, espermatozoides, embriões e tecidos ovarianos, tanto na medicina humana, quanto na veterinária, por ser um processo rápido, simples e também por ter um baixo custo de preparo (VAJTA et al., 1998).

Em pesquisas com vitrificação de tecido ovariano de camundongas Hasegawa et al. (2006) obtiveram como resultado final, após estes tecidos serem maturados e fertilizados *in vitro* o nascimento de 2 filhotes. Para isso, foram usados para o processo de vitrificação 15% de etilenoglicol, 15% de dimetilsulfóxido e 0,5 M de sacarose por 30 minutos a 4°C. Em vitrificação de tecido ovariano da espécie ovina, Bordes et al. (2005) e Lornage et al. (2006), obtiveram 6 gestações, com nascimento de cordeiros saudáveis, posteriormente à um autotransplante ortotópico de metade do ovário vitrificado, utilizando como crioprotetor dimetilsulfóxido (2,62 M), acetamida (2,60 M), propanodiol (1,31 M) e polietilenoglicol (0,0075 M). Em cadelas após ter passado por vitrificação e xenotransplante em tecido ovariano de camundongas imunodeficientes, Ishijima et al. (2006), observaram que ocorreu a formação de um tecido ovariano análogo ao tecido fresco, chegando a conclusão que tecidos ovarianos de cadelas possuem a capacidade de restabelecer suas atividades cíclicas e endócrinas após passar por processo de vitrificação.

2.4.3 Vitrificação em equinos

As biotécnicas de reprodução assistida como a IA e a transferência de embrião (TE) têm sido utilizadas na espécie equina, porém são poucos os resultados satisfatórios quando comparados a espécie bovina. Entretanto, em um estudo realizado por Hurtt et al. (2000), mostrou que não houve diferença na taxa de sobrevivência dos ovócitos bovinos e equinos quando vitrificados maduros ou imaturos. Dentre as biotécnicas, a vitrificação de ovócitos tem sido a que mais responde a resultados positivos, porém Tharasanit et al. (2006), mostraram que ovócitos equinos vitrificados na fase de vesícula germinativa (VG) no qual, somente 41% conseguem chegar a meiose II (MII), porém os autores concluíram que a vitrificação de ovócitos em VG apresentam melhores resultados quando clivados 48 horas após a fecundação.

Oberstein et al. (2001), compararam dois métodos para vitrificar embriões da espécie equina, sendo elas palhetas estiradas e abertas- *Open pulled strws* (OPS) aumentando a velocidade de congelamento, diminuindo as lesões no embrião. O *Crioloop* é uma técnica que consiste na utilização de um instrumento constituído por uma alça de metal presa com um laço de *nylon*, este laço é preenchido por solução de vitrificação bastante viscosa. Deste modo, o líquido presente no laço confere uma tensão superficial que mantém o material a ser vitrificado fixo no mesmo para então ser mergulhado em nitrogênio. Utilizou-se embriões menores que 300 µm com grau de qualidade 1 e 2. Portanto, a diferença entre os dois métodos é que o material vitrificado em *cryoloop* é armazenado em tubos, enquanto em OPS tem contato direto com o nitrogênio contendo outros materiais, aumentando o risco de contaminação (EL-GAYAR; HOLTZ, 2001). Após o descongelamento os embriões foram cultivados por 20 horas e corados com iodeto de propídio e Hoechst 33342. Observaram que 51% das células dos embriões que foram vitrificados se mantiveram vivas. Em contrapartida Moussa et al. (2004a, 2005), compararam o método de vitrificação com os métodos convencionais de congelamento para embriões equinos coletados nos dias 6,5 e 7,5, notando que 46% das células dos embriões vitrificados, estavam mortas, avaliando a viabilidade pós-descongelção através da coloração com 4',6' diamino-phenylindole (DAPI). Este resultado foi similar ao de Oberstein et al. (2001), o sucesso na vitrificação de embriões equinos baseia-se no diâmetro dos embriões no momento da vitrificação, sendo que embriões nas fases de mórula e blastocisto inicial que apresentam tamanho menor que 300 µm são mais resistentes à vitrificação por conta do grande volume de fluido na blastocela e a cápsula embrionária pouco desenvolvida, permitindo uma desidratação celular adequada onde irá ocorrer uma preservação de um maior número de células durante o procedimento, resultando em índices positivos de gestação após transferência (ARAUJO, 2010).

Com relação a vitrificação do tecido ovariano de equinos não foram encontrados trabalhos na literatura que elucidasse resultados sobre o assunto.

2.5 Avanços e dificuldades na vitrificação equina

Dentre todas as espécies domésticas, a equina é a que menos se têm estudos na área de vitrificação, pois para vitrificar material genético equino usa-se protocolos adaptados de outras espécies (BASS et al., 2004). Os principais avanços relacionados à espécie equina dão-se com a implantação da técnica de criopreservação de embriões, que consiste no armazenamento destes em uma temperatura de 5°C por até 24 horas, preservando as células, e diminuindo o

metabolismo, fazendo com que diminua também a divisão celular (SEIDEL et al., 1989; SQUIRES et al., 2003).

Dentre essa técnica de criopreservação, pode-se destacar uma das maiores vantagens que é o armazenamento de material genético, podendo ser levado para locais distantes. Portanto, pode-se fazer a coleta de embriões das éguas doadoras, vitrificar os mesmos e transferir em éguas receptoras que estejam em propriedades diferentes (SEIDEL JR et al., 1989; SQUIRES et al., 2003). Desta forma, diminui o risco do transporte desses animais e, conseqüentemente minimizando os custos (MOUSSA et al., 2003). Mesmo sendo de alto mérito, a vitrificação de embriões equinos é uma técnica que ainda possui alguns obstáculos devido à dificuldade de penetração dos agentes crioprotetores na cápsula glicoproteica do embrião (ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005).

Além da falta de resultados para poder melhorar as técnicas de criopreservação na espécie equina, o fator principal para a falta de pesquisas sobre esta espécie, é o baixo número de frigoríficos regulares de abatedores de equinos, onde são encontrados apenas os frigoríficos Óregon em Apucarana-PR, Floresta em São Gabriel-RS, sendo que este último não foi bem aceito pelos produtores rurais alegando que violentava os costumes e tradições locais. Entretanto, com o tempo, os produtores começaram a negociar animais de descarte, tornando o frigorífico um potente exportador da carne equina, responsável por 80% da produção da carne equina exportada. Outro frigorífico no Brasil é Prosperidad em Araguari-MG, que retomou os abates recentemente, após passados dois anos fechado devido ao surto de mormo, que é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria *Burkholderia mallei*.¹

Portanto, o baixo número de estudos em equinos principalmente sobre a vitrificação de tecido ovariano equino fica em prejuízo perante as demais espécies, como bovinos, ovinos e caprinos.

¹ Único frigorífico que abate equideos no estado regularmente está para retomar as atividades. Estado de Minas, 2013. Disponível em: < https://www.em.com.br/app/noticia/economia/2013/03/04/internas_economia,354405/unico-frigorifico-que-abate-equideos-no-estado-regularmente-esta-para-retomar-as-atividades.shtml>. Acessado em: 18/11/2016)

2.6 Uso de antioxidantes

O crescimento dos folículos ovarianos *in vivo* é dependente de nutrientes que chegam ao ovário através da corrente sanguínea (McNATTY et al., 2000) e o crescimento *in vitro* tem resultados positivos quando mimetizam o mais próximo esse ambiente *in vivo*, sendo assim o ambiente *in vitro* produz uma concentração de oxigênio muito maior, levando a um aumento no número de espécies reativas ao oxigênio (ROS), o que leva a efeitos tóxicos e prejudiciais nas células (LUVONI et al., 1996).

Para que ocorra uma diminuição dos ROS nas células vitrificadas são usados agentes antioxidantes, dentre eles o ácido ascórbico (AA) e o ácido alfa lipóico (ALA). Suas atividades podem variar de acordo com a concentração utilizada, pois altas concentrações podem causar efeitos deletérios às células cultivadas *in vitro* de FOPA. Assim, o uso de antioxidantes deve ser cauteloso por causar efeitos indesejáveis em doses extras (ANDRADE et al., 2002; TALEBI et al., 2012), inibindo processos fisiológicos que ocorrem no ovário, levando à degeneração folicular (MURRAY et al., 2001) devido aos danos oxidativos causados ao DNA, principalmente quando em contato com Cu^{2+} e Fe^{2+} , reagindo com peróxido de hidrogênio, formando radicais livres de hidroxil (LI; SCHELLHORN, 2007).

Dentre os tipos de antioxidantes, podem-se ressaltar os flavonoides, que são superiores até mesmo às vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). O uso destes é fundamentado em suas ações de oxirredução, empenhando um papel de grande valor na neutralização dos ROS (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O uso de antioxidantes na espécie equina ainda é um fator que deixa a desejar na literatura, cabendo aos pesquisadores um maior número de pesquisas para maior esclarecimento e o desenvolvimento de um melhor protocolo de vitrificação e cultivo *in vitro* de FOPA.

2.6.1 Resveratrol

Ultimamente, o uso de antioxidantes para combater os efeitos oxidativos nas células congeladas tem se tornado rotina. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro*, mostraram que o resveratrol, um antioxidante, encontrado em uvas, amendoins, amoras, dentre outros (BURNS et al., 2012), possui propriedades anti-inflamatórias, antibióticas e antifúngicas, além de ser uma substância solúvel em compostos orgânicos, como o etanol e o dimetilsulfóxido, que são tóxicos para as células, devem ser utilizados em baixas concentrações (HARIKUMAR; AGGARWALL, 2008). Alguns experimentos mostram uma melhora na qualidade dos

parâmetros seminais de bovinos com o uso do resveratrol como antioxidante. Na vitrificação de embriões equinos e bovinos (BUCAK et al., 2014; BRANCO et al., 2010) e em equinos o uso de flavonóides, vitamina C e E são usadas na criopreservação seminal (PRIOR, 2003; FRANCO et al., 2014).

Existem vários trabalhos com o uso do resveratrol como antioxidantes, entretanto, poucos estudos obtiveram resultados sobre os efeitos das dosagens, protocolos e diferentes concentrações na criopreservação seminal de bovinos e ovinos (BUCAK et al., 2014; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012), tão pouco na espécie eqüina.

Em uma pesquisa feita por Sarlós et al. (2002), para avaliações espermáticas de sêmen de bode, observou-se que o resveratrol é um potente antioxidante, quando usado nas dosagens de 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, incubando o sêmen por 120 minutos a 37°C. O antioxidante foi capaz de inibir a peroxidação lipídica em baixas concentrações, avaliando ao final da pesquisa um alto índice de motilidade espermática e menor defeito acrossomal dos espermatozói-de. Por outro lado, Silva et al. (2012) estudando sêmen de bode, observaram que não houve resultados positivos quanto a motilidade, vigor, integridade do acrossoma e membranas plasmáticas, quando usada a dose de 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Porém Silva et al. (2011), não observaram efeitos benéficos do resveratrol sobre a motilidade do espermatozói-de ovino após a descongelação. Em estudo por (2015), o uso de resveratrol à 0,5 μM na vitrificação de embriões bovinos, resultou em altas taxas de eclosão comparadas ao grupo controle que não havia adição de resveratrol.

O resveratrol possui efeito antioxidante, que serve para manter a qualidade celular e protegendo contra as lesões oxidativas, a suplementação de resveratrol na maturação *in vitro* (MIV) mostra que houve melhora quanto a competência e desenvolvimento de ovócitos, elevando os valores de glutathiona (GSH) e diminuindo os teores de espécies reativas ao oxigênio (EROS) em ovócitos suínos e bovinos (SEONG, 2010; WANG, 2014; LEE et al., 2010).

2.6.2. Resveratrol na vitrificação

De acordo com Giaretta et al. (2013), o uso do resveratrol na MIV de ovócitos suínos, diminuiu a quantidade de células que entraram em processo de apoptose após descongelamento, expondo efeitos positivos quanto ao desenvolvimento embrionário, enquanto em bovinos, o resveratrol aumentou a taxa de sobrevivência e o número embriões eclodidos que foram vitrificados e em seguida descongelados (SALZANO et al., 2014).

Inúmeros fatores podem influenciar a vitrificação de tecidos, citando com exemplo a desorganização do citoesqueleto, estresse oxidativo, comprometimento dos estoques de RNA,

vacuolização do citoplasma e da cromatina e lesões das membranas celulares (MORATO et al., 2008c; CHANKITISAKUL et al., 2013; CHAMAYOU et al., 2011; THARASANIT et al., 2006a; SPRICIGO et al., 2014; HORVATH et al., 2006). Sendo assim, a suplementação com antioxidantes é uma alternativa para minimizar esses fatores, diminuindo os danos morfológicos e funcionais causados pela vitrificação (SEONG et al., 2012).

Com o intuito de melhorar as técnicas criobiológicas e aumentar o conhecimento sobre os princípios da vitrificação, novos estudos estão sendo feitos com a adição de resveratrol aos meios de vitrificação de embriões. Rafaella. A.N., (2015) em um estudo onde foi feita maturação de ovócitos suínos, e posteriormente a vitrificação utilizando o resveratrol como antioxidante, verificou-se que houve uma redução no número de células apoptóticas após o descongelamento e foram observados resultados positivos quanto ao desenvolvimento dos embriões (GIARETTA et al., 2013; LEE et al., 2010).

Já é possível provar que o resveratrol é um grande potencializador na ação antioxidante de embriões e ovócitos bovinos, provavelmente induzindo a secreção da progesterona, aumentando os genes que fazem síntese desse hormônio e reduzindo os genes produtores de estradiol, provando então que o resveratrol pode promover a maturação de ovócitos bovinos através da liberação de progesterona pelas células do *cumulus* (FENG WANG et al., 2014).

Por ser um grande antioxidante usado tanto na vitrificação quanto na MIV de ovócitos de animais domésticos, o resveratrol também é usado na vitrificação de sêmen de animais de alto valor zootécnico por ser um inibidor específico de COX 1 (KENNEDY et al., 2003) que está intimamente ligado ao fator de motilidade dos espermatozoides (FAYED, 1996). De fato, o resveratrol possui uma atividade eliminadora de radicais livres, fator esse que provavelmente é o que protege o DNA dos espermatozoides (SIERENS et al., 2002; AGARWAL, 2004).

O primeiro relato de vitrificação de tecido ovariano foi descrito em camundongas, que desde então obtiveram descendentes férteis e normais, levando a biotécnica a se destacar como algo promissor. Mesmo que essa técnica tenha sido demonstrada positiva em relação aos folículos xenotransplantados (transplante de um fragmento de um tecido ovariano entre diferentes espécies) de bovinos em ovários de camundongas, os folículos se desenvolveram até o estágio antral, mas ainda não há registro de nascimentos a partir dessa metodologia (MATOS et al., 2011).

No entanto, apesar da vitrificação de tecido ovariano ter uma resposta positiva aliada ao processo de xenotransplante em algumas espécies como ovinos e bovinos (MATOS et al., 2011), não foram encontrados relatos no atual momento sobre vitrificação de tecido ovariano equino com o uso do resveratrol.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e preparação dos ovários equinos

Foram coletados 12 ovários equinos, sem raça definida, no abatedouro Prosperidad, localizado no município de Araguari-MG. Os ovários foram transportados em uma caixa térmica na temperatura de 4°C, em um intervalo de 4 horas. Após a coleta, os ovários foram lavados 1 vez em álcool 70% por 10 segundos e 2 vezes em PBS suplementado com 100 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de estreptomicina. Cada ovário foi dividido em 8 fragmentos de 3 mm x 3 mm x 1 mm, totalizando 48 fragmentos. Ao final das 3 réplicas obteve-se um total de 144 fragmentos.

3.2. Preparação de meios e vitrificação

O meio de vitrificação SV1 (solução de vitrificação 1) foi composto de TCM-199 suplementado com 10 mg/mL de BSA, 0,25 M de sacarose, 10% de DMSO e 10% de etilenoglicol. Já o meio SV2 (solução de vitrificação 2) foi composto de TCM-199 suplementado com 10 mg/mL de BSA, 0,25 M de sacarose, 20% de DMSO e 20% de etilenoglicol. Os tratamentos SV1Res10µM (solução de vitrificação 1 com resveratrol na concentração 10 µM) e SV1Res20µM (solução de vitrificação 1 com resveratrol na concentração 20 µM) são similares ao meio SV1, porém, com adição do resveratrol nas concentrações 10 µM e 20 µM respectivamente.

Para elaboração dos meios SV2Res10µM (solução de vitrificação 2 com resveratrol na concentração 10 µM) e SV2Res20µM (solução de vitrificação 2 com resveratrol na concentração 20 µM) foi utilizado o meio SV2 adicionando o resveratrol nas concentrações 10 µM e 20 µM, na devida ordem.

Os fragmentos foram distribuídos individualmente em placas de 24 poços, sendo 5 fragmentos para cada grupo: tratamento 1: CVSRes (controle de vitrificação - fragmentos vitrificação sem resveratrol), tratamento 2: Res10µM (fragmentos vitrificados com 10 µM de resveratrol), tratamento 3: Res20µM (fragmentos vitrificados com 20 µM de resveratrol) e 4 fragmentos para o CF (controle fresco - fragmentos destinados à histologia sem nenhum tratamento logo após a fragmentação do ovário).

Os fragmentos do grupo CVSRes foram vitrificados utilizando os meios SV1 por 4 minutos e SV2 por 1 minuto. Para vitrificar os fragmentos dos tratamentos 2, e 3 foram

utilizados os meios SV1Res10 μ M e SV1Res20 μ M, respectivamente, por 4 minutos. Ao término, os fragmentos foram mantidos por 1 minuto nos meios SV2Res10 μ m e SV2Res20 μ m, respectivamente.

Todos os fragmentos foram envasados individualmente em bainhas francesas de inseminação adaptadas com o devido meio de congelamento (SV2Res10 μ m, SV2Res20 μ m e SV2) e armazenados no nitrogênio líquido.

3.3. Meios de aquecimento e aquecimento dos fragmentos

A solução de aquecimento 1 (SA1) foi composta de TCM-199 suplementado com 3 g/mL de BSA e 0,5 M de sacarose. A solução de aquecimento 2 (SA2) foi composta de TCM-199 suplementado com 3 g/mL de BSA e 0,25 M de sacarose. Já a solução de aquecimento 3 (SA3) foi composta de TCM-199 suplementada com 3 g/mL BSA. Os meios de aquecimento SA1Res, SA2Res e SA3Res foram compostos pelos meios SA1, SA2 e SA3 com adição de 10 μ M e 20 μ M de resveratrol, respectivamente.

Após 15 dias, os fragmentos foram aquecidos sendo retirados do nitrogênio líquido, permaneceram por 1 minuto em temperatura ambiente (25°C). Em seguida, os fragmentos foram colocados por 30 segundos em banho maria à 37°C. Foram feitas 3 lavagens de 5 minutos em cada uma das soluções de aquecimento. Portanto, os fragmentos dos tratamentos congelados com resveratrol (SV2Res10 μ M e SV2Res20 μ M) foram lavados por 5 minutos em cada meio de aquecimento (SA1Res e SA2Res) e os fragmentos do tratamento1 foram lavados nos meios SA1, SA2 e SA3.

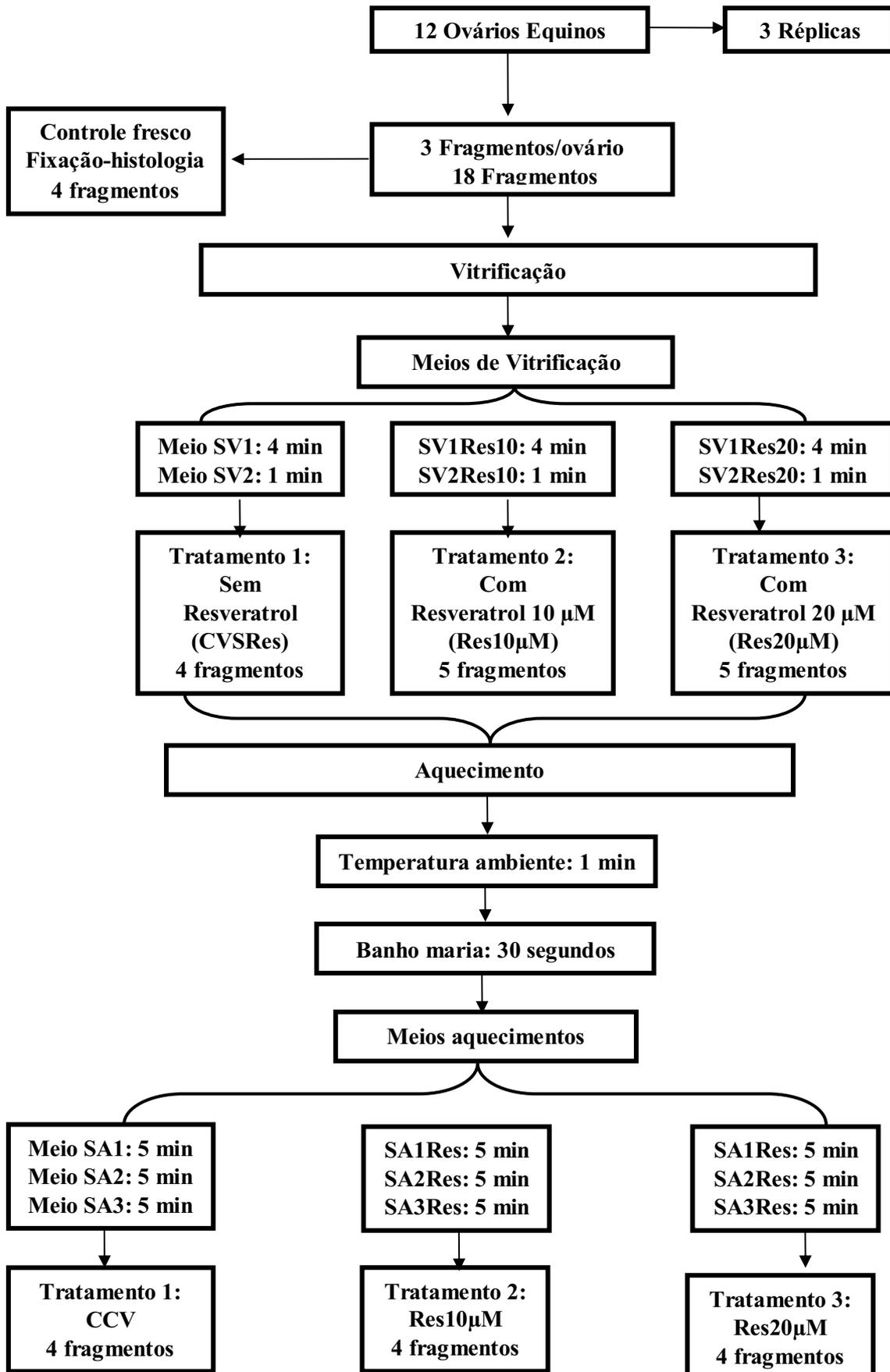
3.4. Análise Histológica

Após a preparação histológica clássica (desidratação e emblocagem em parafina), as amostras serão totalmente seccionadas a 7 μ m de espessura, colocadas em lâminas de vidro, e coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina.

As leituras das lâminas histológicas foram realizadas no microscópio óptico marca Olympus® CH2 em aumento de 400x. Os seguintes parâmetros foram avaliados: o número de folículos por fragmento; classificação quanto ao estágio de desenvolvimento (primordial: folículo com ovócito imaturo localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso; transição folículo com crescimento ovocitário e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para cubóide; primário: folículo com ovócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cuboide, secundário: folículo com ovócito imaturo rodeado por

duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide e presença de células da teca quando em estágio mais avançado), classificação morfológica onde folículos foram considerados normais ou degenerados conforme padrão descrito por Alves et al. 2015, e diâmetro folicular e ovocitário (estruturas normais) em cada estágio de desenvolvimento.

3.5. Design do experimento



4. RESULTADOS

Neste trabalho foram encontrados um total de 73 folículos em 400 secções. Destes folículos 60% estava presente no grupo CF, 8% no CVSRes, 8% no VT10 μ M e 23% no VT20 μ M, sendo que 45%, 6%, 4% e 16% apresentaram folículos anormais (Tabela 1), respectivamente.

Tabela 1- Relação entre folículos normais e anormais de acordo com os tratamentos expostos.

	CF	CVSRes	VT10μM	VT20μM
	NT(%)	NT(%)	NT(%)	NT(%)
NORMAIS	11 (15)	1 (1)	3 (4)	5 (60)
ANORMAIS	33 (45)	5 (6)	3 (4)	12 (16)
TOTAL	44 (60)	6 (8)	6 (8)	17 (23)

CF: controle fresco; CVSRes: controle vitrificado sem resveratrol; VT10 μ M: vitrificado com 10 μ M de resveratrol; VT20 μ M: vitrificado com 20 μ M de resveratrol; NT: número total.

Considerando-os em folículos primordiais, de transição, primário e secundário, de acordo com suas morfologias, adotando a característica normal e anormal para avaliação, foram encontrados 44 no CF, 6 no CVSRes, 6 no VT10 μ M e 17 no VT20 μ M (Tabela 2).

Tabela 2- Relação dos folículos primordial, de transição, primários e secundários de acordo com os tratamentos

TRAT	PRIMORDIAL		TRANSIÇÃO		PRIMÁRIO		SECUNDÁRIO		TOTAL
	NT(%)		NT(%)		NT(%)		NT(%)		
	N	A	N	A	N	A	N	A	
CF	10 (22)	3(6)	0(0)	13(29)	1(2)	14(31)	0(0)	3(6)	44
CVSRes	0(0)	3(50)	0(0)	0(0)	0(0)	1(16)	1(16)	1(16)	6
VT10μM	0(0)	0(0)	2(33)	1(16)	1(16)	1(16)	0(0)	1(16)	6
VT20μM	4 (23)	5(29)	0(0)	4(23)	0(0)	2(11)	1(5)	1(5)	17
TOTAL	14 (19)	11(15)	2(2)	18(24)	2(2)	18(24)	2(2)	6(8)	73

N: normal; A: anormal; CF: controle fresco; CVSRes: controle vitrificado sem resveratrol; VT10 μ M: vitrificado com 10 μ M; VT20 μ M: vitrificado com 20 μ M.

5 DISCUSSÃO

Desde a década de 50, fragmentos de tecido ovariano de animais de laboratório são submetidos à criopreservação e posteriormente autotransplantes (DEANESLY, 1954; GREEN et al., 1956), assim, diversos estudos realizados com estes animais têm demonstrado que folículos pré-antrais apresentaram-se morfológicamente normais após criopreservação (CANDY et al., 1997). Na espécie bovina, alguns autores obtiveram resultados significativos na criopreservação de tecido ovariano, demonstrando que folículos pré-antrais bovinos apresentam altas taxas de sobrevivência, após exposição aos crioprotetores (LUCCI et al., 2004; CELESTINO et al., 2008). E, segundo Gandolfi et al. (2006), a criopreservação em suínos e humanos também obtiveram respostas positivas. Esses dados contradizem os resultados do presente trabalho, mostrando que mesmo o CVSRes apresentou a maioria dos folículos anormais. Além do mais, não foram encontrados estudos que avaliem a vitrificação de tecido ovariano na espécie equina tendo como agente antioxidante o resveratrol.

Borges et al. (2009) observaram que independente da espécie, os processos de vitrificação testados para criopreservação de tecido ovariano causaram grandes danos aos folículos, confirmando o resultado do presente trabalho. Contudo, na espécie equina, ainda não há relatos de criopreservação de tecido ovariano, nem tanto o nascimento de animais após criopreservação deste tecido.

As técnicas de vitrificação que utilizam taxas de resfriamento rápido, têm sido uma grande alternativa que visa minimizar os danos que ocorrem ao tecido vitrificado causados pela técnica de resfriamento lento (SHAW E JONES, 2003). Apesar de ter tido grandes avanços na vitrificação, mostrando até mesmo nascimentos de animais, após esse processo *in vitro*, cultivo e transplante de TO (DELA PEÑA et al., 2002; BORDES ET AL., 2005) as técnicas de vitrificação ainda passam por fase experimental, primeiramente pelas dificuldades em preservar concomitantemente os ovócitos, células da granulosa e da teca e células do estroma (SEGINO et al., 2005) e por último a alta densidade de células e folículos, que varia de acordo com a espécie, raça, estágio fisiológico da reprodução (BAIRD, 1984).

O estudo da vitrificação de tecido ovariano equino com suplementação de resveratrol tem como propósito a preservação de material genético desta espécie por tempo indeterminado através da melhor concentração deste antioxidante, na tentativa de minimizar as injúrias causadas pelas baixas temperaturas criogênicas que os fragmentos são submetidos neste processo. Os resultados das análises de microscopia de luz do estudo, mostraram pouca

diferença entre os tratamentos (SV1Res10 e SV1Res20), sendo que o CF se mostrou com resultados superiores aos demais.

Uma das possíveis causas para não obter um resultado positivo com maior número de folículos ovarianos nos fragmentos que foram tratados com resveratrol é o “burn-out”, que se trata de uma atresia em massa dos folículos menores, por conta da morte dos folículos que apresentaram maior crescimento, sendo mais intensa em tecidos vitrificados que passaram por um processo de preparo refinado e ainda mais em tecidos que foram congelados e descongelados.

Uma outra possível hipótese para os resultados encontrados neste trabalho em relação a grande quantidade de folículos presentes nos fragmentos do grupo CF, é que o resveratrol pode ter causado uma toxicidade aos fragmentos que foram submetidos ao processamento nas soluções que ele estava presente, independente da concentração. Desta forma, ocorreu uma degradação dos folículos por conta da sua ação antioxidante. Entretanto, ao observar os resultados do CF, que apesar de possuir um grande número de folículos, foi apresentado um grande número de folículos anormais acredita-se que as técnicas de vitrificação e/ou de histologia possam ter causado danos as estruturas. Para uma melhor análise dos resultados é necessário aumentar o número amostral da pesquisa.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o resveratrol apesar de apresentar bons resultados na vitrificação tanto de sêmen equino e bovino, como para embriões bovinos não foi possível afirmar se ajudou ou causou danos aos fragmentos e conseqüentemente, aos folículos pré-antrais equinos vitrificados em diferentes concentrações devido ao baixo número amostral da pesquisa e possíveis danos causados pela própria vitrificação e histologia clássica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA FQ, SILVA VP. Progresso científico em equideocultura na 1^a década do século xxi. **Rev bras zootec**, V.39, P.119-129, 2010.
- ALVES K.A, ALVES B.G, ROCHA C.D, VISONNÁ M, MOHALLEM RFF, et al. (2014) Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**
- ANDRADE, E. R.; AMORIM, C. A.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P .R.; SILVA, J.R. V; DODE, M.A .N.; FIGUEIREDO,J. R. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. **Small Ruminant Research**. v.43, n.3, p.235-43,2002.
- AMORIM, C. A., LUCCI, C. M., RODRIGUES, A. P. R. & CARVALHO, F. C. 1997. Development of optimization of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from sheep ovaries: preliminary results. **Ciência anim.**, 7:103.
- ASHWOOD-SMITH MJ, LOUGH P. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with methanol. **Cryobiology**, v.12, p.517-518, 1975.
- BAIRD, D.T. The ovary. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (Ed). *Reproduction in mammals*. Cambridge: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1984, p. 91-114.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123. 2006.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBING, R.B., XU, K.P.; KING, W. A.potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, V.38, P. 87-98, 1989.
- BRANCO,C.S.; GARCEZ, M.E.; PASQUALOTTO, F.F; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M.2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, **60**: 235-237.

BORDES A, LORNAGE J, DEMIRCI B, FRANCK M, COURBIERE B, GUERIN JF, SALLE B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemiovaries into ewes. *Hum Reprod*, v.20, p.2745-2748, 2005.

BORGES EN, SILVA RC, FUTINO DO, ROCHA-JUNIOR CMC, AMORIM CA, BÁO SN, LUCCI CM. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of different cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**, v.59, p.195-200, 2009.

BUCAK, M.N.; ATAMAN, M.B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; OZTURK, C.; GUNGOR, S.; INAÇ. M.E.; AKAL, E. 2014. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, 1-8 .

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol, **Journal Agriculture and Food Chemistry**, **50(11)**: 3337-40

CANDY CJ, WOOD MJ, WHITTINGHAM DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **J Reprod Fertil**, v.110, p.11-19, 1997.

CARAMBULA, S. F. 1997. Resgate de folículos pré-antrais de ovários de fetos bovinos e ovinos. santa maria. **Universidade federal de santamaria**, 56p. (dissertação de mestrado).

CARMO MT, TRINQUECLN, LIMA MM, MEDEIROS ASL, ALVARENGA MA. Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça brasileiro de hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Rev bras reprod anim**, V.26, P.252-254, 2002.

CELESTINO JJH, SANTOS RR, LOPES CAP, MARTINS FS, MATOS MHT, MELO MAP, BÁO SN, RODRIGUES APR, SILVA JRV, FIGUEIREDO, JR. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing ovarian tissue. **Anim Reprod Sci**, v.108, p.309-318, 2008.

CHOI, Y.H., HOCHI, S., BRAUN, J., SATO, K., OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slicing of ovaries. **Theriogenology**, V. 40, P. 959-966, 1993.

COURBIERE B, ODAGESCU V, BAUDOT A, MASSARDIE J, MAZOYER C, SALLE B, LORNAGE J. Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil steril*, V.86, SUPPL.3, P.1243-1251, 2006

DEANESLY R. Immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. **J Endocrinol**, v.11, p.197-200, 1954.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40. 2004.

DELA PEÑA EC, TAKAHASHI Y, KATAGIRI S, ATABAY EC, NAGANO M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.593-600, 2002.

DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae** – Suplemento 1, v. 34, p. 171-190, 2006.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PETRETSKI, M.D.; OHASHI, O.M.; LIMA, J.S.; SANTOS, R.R.; CORDEIRO, M.S.; CASTRO, P.H.G. effects of follicular phase and oocyte-cumulus complexes quality on the protein profile and *in vitro* oocyte meiosis competence in *cebus apella*. **Fertility and sterility**, V.93, PP. 1662-1667 2010.

ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, v.1308–1319, 2005.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S., the role of transcription in *egf*- and *fsh* mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal reproduction science**, (IN PRESS).2007.

FENG WANG, XIUZHI T, ZHANG L, CHANGJIU HE, PENGYUN JI, YU LI, DUNXIAN T, GUOSHI LIU. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**. 2014;101 (2):577-586.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C. J., ECTORS, F. J., FONTES, R. S., NUSGENS, B., LEPOINT, A. & BECKERS, J. F. 1992. Mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries; 8ème reunion aete, lyon, 11-12 SEPTEMBRE, P. 152

FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R. ETAL. 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.

FIGUEIREDO, J. R., HULSHOF, S. C.J., VAN DEN HURK, R., NUSGENS, B., BEVERS, M. M., ECTORS, F. J. & BECKERS, J. F. 1994B. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*.

FIGUEIREDO JR. ISOLEMENT, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. 1995. 113F. THÈSE (PHD)- **Université de liège, liege, belgique**, 1995

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. 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, PP. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: P.B.D. Gonçalves, J. R. Figueiredo, V. J. F Freitas. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 136 p. 303-327, 2008.

FRANCO, J.S.V.; CHAVEIRO, A.; SILVA, F.M. 2014. Effect of freezing Rates and Supplementation of α -tocopherol in the Freezing Extender in Equine Spem Cryosurvival. **Journal of Equine Veterinary Science**. **34(8)**: 992-997

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; Lazzari, G. Developmental Cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal reproduction science**, DOI:10.1016, 2006.

GANDOLFI F, PAFFONI A, BRAMBILLA EP, BONETTI S, BREVINI TAL, RAGNI G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertil Steril**, v.85, p.1150-1156, 2006.

GARCEZ, M.E.; BRANCO, C.S.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservations medium of human semen. **Fertility and Sterility**, **94(6)**: 2018-2021.

GOSDEN RG, DT BAIRD, JC WADE, R. WEBB, restauração da fertilidade ovelhas ooforectomizadas por transplante autólogo de ovário armazenado a -196°C , **hum.reprod.** 9 (1994) 597-603.

GREEN SH, SMITH AU, ZUCKERMAN S. The number of oocytes in ovarian autographs after freezing and thawing. **J Endocrinol**, v.13, p.330-334, 1956.

GREENWALD, G.S., R. M. MOOR, R.M. isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal reproduction & fertility**, V. 87, P. 561-571, 1989.

GROB, H. S. 1964. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**, 146:73-74.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprod Anim**, São Paulo: Ed. Manole, p.21-58, 1995.

HARIKUMAR, K.B.; AGGARWALL, B.B. 2008. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**, **7(8)**:1020-1035

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Manipulation of canine fertility using in vitro culture techniques. **Journal of reproduction and fertility supplement**, V.57, P.111-125, 2001.

HOCHI S, MARUYAMA K, OGURI N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. **Theriogenology**, v.46, p.1217-1224, 1996

HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. F., DIJISKA, G., BEVERS, M. M. & VAN DEN HURK, R. 1995. Effects of human recombinant fsh and 17 β estradiol on bovine preantral follicles *in vitro*. **Theriogenology**, 44:217-226.

HURTT, A. E.; LANDIM-ALVARENGA, F.; SEIDEL, G. E. Jr.; SQUIRES, E. L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v.54, n.1, p.119-128, 2000.

ISHIJIMA T, KOBAYASHI Y, LEE DS, UETA YY, MATSUI M, LEE JY, SUWA Y, MIYAHARA K, SUZUKI H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **J Reprod Dev**, v.52, p.293-299, 2006.

JEWGENOW, K. & PARIS, M.C. preservation of female germ cells from ovaries of cat species. **Theriogenology**, V.66, N.1, PP. 93-100, 2006.

KENNEY, R. M.; CONDON, W.; GARJAN, V. K.; CHANNING, C. P. Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their stage of viability or atresia. **J Reprod Fertil**, v.27, p.163-171, 1979.

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. **Hum Reprod**, v.24, pp.1670-1683, 2009.

KWAK SEONG-SUNG, CHEONG SEUNG-A, JEON Y, LEE E, CHOI KYUNG-CHUL, JEUNG EUI-BAE, HYUN SANG-HWAN. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. **Theriogenology**. 2012; 78:86-101.

LASLEY, B.; LOSKUTOFF, N.; & ANDERSON, G. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species, **theriogenology**, V.41, N.1, PP. 119-132.; 1994.

LEE K, WANG C, CHAILLE J M, MACHATY Z. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. **J. Reprod. Dev.** 2010; 56:330–335.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. **Theriogenology**, V.57, P.303-326, 2002.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of Nutrition**. v.137, p.2171-84, 2007

LUCCI CM, KACINSKIS MA, LOPES LHR, RUMPF R, BAO SN. 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.

LUYET B.J.; GEHENIO P.M. 1940. Life and death at low temperatures. 3^aed. **Biodynamica**, Normandy, p.352.

LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Mol. Reprod. Dev.** v.43, p.437-43, 1996

LUYET, B. On The amount of water remaining amorphous in frozen aqueous solutions. **Biodynamica**, v.218, p 277-291, 1969.

McNATTY, K.P.; FILDER, A E.; JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.163, p.11-20, 2000.

MEIRA C, ALVARENGA MA, PAPA FO, OBA E, LANDOM E, LANDIM-ALVARENGA FC. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. **Equine Vet J Suppl**, n.15, p.64-66, 1993.

MOUSSA M, DUCHAMP G, MAHLA R, BRUYAS JF, DAELS PF. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, EmCare holding solution and Vigro holding plus for the cooled storage of equine embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1615-1625, 2003.

MOUSSA M, BERSINGER I, DOLIGEZ P, GUIGNOT F, DUCHAMP G, VIDAMENT M, BRUYAS JF, MERMILLOD P. Slow freezing vs open pulled straw (OPS) vitrification for equine embryo cryopreservation. In: International Symposium on Equine Embryo Transfer, 6, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: ISEET, 2004a. p.47-49.

MOUSSA M, BERSING I, DOLIGEZ P, GUIGNOT F, DUCHAMP G, VIDAMENT M, MERMILLOD P, BRUYAS JF. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.64, p.1619-1632, 2005.

MURRAY, A.A.; MOLINEK,M.D.; BAKER,D.J.; KOJIMA,F.N.; SMITH,M.F.; HELLIER,S.G.; SPEARS,N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro* . **Reproduction**. V.121,p.89-96,2001

MURUVI W, PICTON HM, RODWAY RG, JOYCEIM. In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. **Theriogenology**, V.64, P.1357-1370, 2005

NEVES, A.R.; LUCIO, M.; LIMA, J.L.; REIS,S. 2012. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. **Current Medical Chemistry**, **19**: 1663-1681.

NICOSIA, S. V., EVANGELISTA, I. & BATTA, S.K. 1975. Rabbit ovarian follicle. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biol. Reprod.**, 13:423-447. nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016, 2006.

NUTTINCK, F., MERMILLOD, P.M., DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, V. 39, P. 811-821, 1993.

OBERSTEIN N, O'DONOVAN MK, BRUEMMER JE, SEIDEL JR GE, CARNEVALE EM, SQUIRES EL. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straws, cryoloop, or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**, v.55, p.607-613, 2001.

OKTAY K.; NEWTON H.; AUBARD Y.; SALHA O.; GOSDENRG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? **Fertil. Steril.** 1998; 354: 1-7.

PARIS MCJ, SNOW M, COX S-L, SHAW JM. XENOTRANSPLANTATION: a tool for reproductive biology and animal conservation? **Theriogenology**, V.61, P.277-291, 2004.

Pegg de. The current status of tissue cryopreservation. **Cryo lett**, V.22, P.105-14, 2001.

PIMENTEL, C. A.; RIBEIRO, D. B.; FERNANDES, C. E.; HAMMES, A. M.; MARTINS, C. F.; FIALA, S. M. E. Impacto da I.A na equideocultura. **Revistabrasileira de reprodução animal**, V.22, N.2, P.91-97, 1998.

POPE, C.E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology**, V.53, P. 163-174, 2000.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, Suppl. 3, v. 78, p. 570S- 578S. 2003.

RASTIJA, V.; NIKOLIC, S.; MEDIC-SARIC, M. 2009. Molecular modeling of wine polyphenols. **Journal of Mathematical Chemistry**, 46(3): 820-830

REDMER, D. A ; REYNOLDS ,L.P. angiogenesis in the ovary. **Reviews of reproductions**, V.1, P 182-192, 1996.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. 117 **Bibliotheca anatomica**, V. 24, P. 77-92, 1983.

SADEU, J.C.; ADIAENSSENS, T.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured frozen-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility sterility**, V.85, SUPPL1, P.1130-1141, 2006.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, V.141, P.1-19, 2011.

SARLÓS, P. MOLNAR, A.; KOKAI, M. GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002

SEGINO, M.; IKEDA, M.; HIRAHARA, F.; SATO, K. In vitro follicular development of cryopreserved mouse ovarian tissue. **Reproduction**, v.130, p.187-192, 2005.

SEIDEL JR GE, SQUIRES EL, MCKINNON AO, LONG PL. Cryopreservation of equine embryos in 1,2-propanediol. **Equine Vet J Suppl**, n.8, p.87-88, 1989.

SHAW JM, A. Oranratnachai, ao trounson, cryobiology fundamental de oócitos de mamíferos e tecido ovariano, **Theriogenology** 53 (2000) 59-72. (SHAW,J .M et AL ., 2000)

SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Hum. Reprod. Update**, v.9, p.583-605, 2003.

SILVA, J.F.P.; CAJUEIRO, S.; S.V.; SILVA,P,C.; SOARES, M.M.P.;GUERRA, E.C.B. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evolution of frozen RAM sperm . **Theriogenology**, 77: 1722-1726

SLADE NP, TAKEDA T, SQUIRES EL, ELSDEN RP, SEIDEL JR GE. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v.24, p.45-58, 1985.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryotechnologies in the horse. **Theriogenology**, V.59, P.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.. Perspectivas para o uso de biotecnologias na reprodução eqüina. **Acta scientiae veterinariae**, V.33 (SUPL 1), P.69-82, 2005.

TALEBI,A.; ZAVAREH,S.; KASHANI,M.H.; LASHGARBLUKI,T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal Assist Reprod Genet.** .v.29, p.175-83, 2012.

THARASANIT, T. et al. Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. **Anim Reprod Sci**, v.94, p.291–293, 2006.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Effect of maturation stage at cryo preservation on post thaw cytoskeleton on quality and fertilizability of equine oocytes. **Molecular and cellular endocrinology**, V.73, P.627-637, 2006.

ULRICH P, NOWSHARI M.A. Successful direct transfer of a frozen-thawed equine embryo. **Dtsch Tierarztl Wschr**, v.109, p.61-62, 2002.

VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T.; CALLESEN H. 1998. Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev.** 51(1):53-58.

WANDJI, S. A., EPPIG, J. J. & FORTUNE, J. E. 1996A. Fsh and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, 45:817-832.

WOLFE, J. ;BRYANT G Freezing drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v 39,p 103 129, 1999

YAMAKI, S. B.; PEDROSO, A. G.; ATVARIS, T. D.Z. o estado vitreo dentro da perspectiva do curso de graduacao em quimica (fisicoquimica). **Química nova**, V.25, P.330-334,2002.

