

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

DANIEL AMARAL GONTIJO

RESPOSTA DO CÓRTEX OVARIANO BOVINO SUBMETIDO AO CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE APÓS VITRIFICAÇÃO ASSOCIADA AO RESVERATROL

UBERLÂNDIA-MG

2018

DANIEL AMARAL GONTIJO

RESPOSTA DO CÓRTEX OVARIANO BOVINO SUBMETIDO AO CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE APÓS VITRIFICAÇÃO ASSOCIADA AO RESVERATROL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para a
obtenção do título de graduação em
Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina
Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kele Amaral.

UBERLÂNDIA-MG

2018

RESPOSTA DO CÓRTEX OVARIANO BOVINO SUBMETIDO AO CULTIVO *IN VITRO* E XENOTRANSPLANTE APÓS VITRIFICAÇÃO ASSOCIADA AO RESVERATROL

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado para a obtenção do título de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 12 de dezembro de 2018.

Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos.

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut.

M.^a Graciele Freitas Cardoso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, porque sem seu amor eu não iria conseguir e por Ele estar comigo sempre, guiando minha caminhada e me permitindo concluir meus sonhos.

Aos meus pais Oscar e Irene, que sempre me apoiaram em tudo e que são exemplos de determinação, superação, honra e caráter. Agradeço também aos meus irmãos Alberto e Guilherme que me ajudam bastante. À minha namorada Andressa, que além de ser muito companheira, me apoia e me motiva a cada dia. E aos meus tios José Antônio e Lúcia, que me deram a oportunidade de fazer o cursinho para ingressar na faculdade.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora Ricarda, por seus ensinamentos e pelos conhecimentos passados. À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e a todos os professores que foram essenciais na minha formação profissional.

Sou muito grato ao meu pai, por sua paciência e perseverança, ele é uma pessoa que admiro e em quem me espelho muito. Sua persistência na bovinocultura leiteira é um desses exemplos. E foi a partir dele que me interessei em aprender cada vez mais sobre essa atividade, e apesar dos grandes desafios enfrentados, sua complexidade me fez apaixonar por esse ramo.

“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes.”

Albert Einstein

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva de animais de alto valor genético, foram desenvolvidas biotécnicas para a conservação de tecido ovariano, como o cultivo *in vitro*, a vitrificação e o xenotransplante. No entanto, a dificuldade de neovascularização no xenotransplante e a formação de cristais de gelo intracelulares na vitrificação são exemplos de dificuldades enfrentadas por essas biotecnologias. Nesse sentido, objetivou-se com este estudo verificar a viabilidade, a apoptose e a oxidação do córtex ovariano de vacas após vitrificação associada ao resveratrol e posteriormente cultivo *in vitro* ou xenotransplante. Para isso, foram coletados ovários de vacas provenientes de um frigorífico situado no município de Uberlândia-MG, que foram fragmentados e distribuídos em controle fresco, controle vitrificado com resveratrol, cultivo vitrificado com resveratrol, xenotransplante vitrificado com resveratrol, controle vitrificado sem resveratrol, cultivo vitrificado sem resveratrol, xenotransplante vitrificado sem resveratrol, cultivo fresco e xenotransplante fresco. O xenotransplante de tecido ovariano bovino foi feito em camundongos. A viabilidade do tecido ovariano foi avaliada por microscopia confocal, que permite verificar viabilidade, apoptose e oxidação do tecido ovariano. Todos os dados foram analisados utilizando o programa de análise estatística R version 3.0.2. Todos os tratamentos apresentaram redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos níveis de apoptose celular em relação ao controle fresco. Nos tratamentos com cultivo *in vitro*, o grupo vitrificado com resveratrol apresentou redução dos níveis de ROS entre os dias D₁ e D₇ do cultivo. O grupo de fragmentos cultivados após vitrificação com resveratrol apresentou menor nível de degeneração celular comparado aos fragmentos cultivados após vitrificação sem resveratrol no D₁. O grupo xenotransplantado vitrificado demonstrou a menor taxa de apoptose celular. Conclui-se que o resveratrol apresenta efeitos de proteção da viabilidade tecidual durante os processos de vitrificação.

Palavras-chave: antioxidante. confocal. ovário. neoangiogênese.

ABSTRACT

In order to increase the reproductive efficiency of animals of high genetic value, biotechniques were developed for the preservation of ovarian tissue, such as *in vitro* culture, vitrification and xenotransplantation. However, difficulty for neovascularization in xenotransplantation and formation of intracellular ice crystals in vitrification are examples of difficulties faced by these biotechnologies. In this sense, this work intended to evaluate whether vitrification of ovarian cortex associated with resveratrol allows better preservation of the viability and developmental capacity of preantral follicles after xenotransplantation, and if xenotransplanted ovarian tissue after vitrification with resveratrol has a greater angiogenic capacity and lower oxidative stress. For this purpose, cow ovaries were collected from a fridge located in Uberlândia-MG, fragmented and distributed in fresh control, vitrified control with resveratrol, vitrified culture with resveratrol, vitrified xenotransplantation with resveratrol, vitrified control without resveratrol, vitrified culture without resveratrol, vitrified xenotransplantation without resveratrol, fresh culture, and fresh xenotransplantation. The bovine ovarian tissue xenotransplantation was made in mice. The viability of the ovarian tissue was evaluated by confocal microscopy, which allows to verify the occurrence of cellular apoptosis and oxidation of the tissue submitted to various treatments. The aim of this study was to evaluate viability, apoptosis and oxidation of bovine ovarian tissue after *in vitro* culture, vitrification associated with resveratrol, and xenotransplantation. All data were analyzed using the statistical analysis program R version 3.0.2. All treatments presented a reduction in the levels of reactive oxygen species (ROS) and in the levels of cellular apoptosis comparing to the fresh control. In the treatments with *in vitro* culture, the vitrified group with resveratrol showed a reduction in ROS levels between days D₁ and D₇ of the culture. The group of vitrified fragments with resveratrol presented a lower level of cellular degeneration compared to the vitrified fragments without resveratrol in D₁. The xenotransplanted vitrified group demonstrated the lowest rate of cellular apoptosis. It is concluded that resveratrol presents protective effects of tissue viability during vitrification processes.

Key words: antioxidant. confocal. ovary. neoangiogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - Ácido ascórbico.

BSA - Albumina sérica bovina.

CEUA - Comitê de Ética na Utilização de Animais.

CO₂ - Dióxido de carbono.

°C - Graus Celsius.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

EG - Etilenoglicol.

EROs – espécies reativas de oxigênio.

FSH – Hormônio folículo estimulante.

H₂DCFDA - Dichlorodihydrofluorescein diacetate.

ITS – Insulina/Transferrina/Selênio.

LH – Hormônio luteinizante.

MOIFOPA – Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais.

mm – Milímetros.

mM – Milimolar.

M - Molar.

MEM-HEPES - Minimum essential médium.

NK - *Natural killers*.

PBS – Tampão fosfato salino.

PIV - Produção *in vitro* de embriões.

R version - Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

SAC – Sacarose.

TCM – Triglicerídeos de cadeia média.

UFU - Universidade Federal de Uberlândia.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS E MOIFOPA.....	11
2.2. XENOTRANSPLANTE E VITRIFICAÇÃO COM RESVERATROL.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de toda a vida reprodutiva da fêmea, apenas 0,1% de sua produção folicular chega à ovulação e 99,9% é eliminada pelo processo de atresia folicular, levando a uma grande perda de material genético (LIMA; SANTOS, 2010). Assim, os métodos utilizados para a produção *in vitro* de embriões (PIV) são dependentes de poucos oócitos provenientes de grandes folículos antrais ou pré-ovulatórios (TELFER, 1998). Uma alternativa é a utilização de folículos pré-antrais para aumentar o número de ovócitos e, dessa forma, melhorar a eficiência reprodutiva da fêmea bovina (LIMA; SANTOS, 2010).

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* deve ser considerado, destacando-se a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA). Essa biotecnologia baseia-se em isolar, conservar (por meio de resfriamento e criopreservação) e/ou cultivar *in vitro* grande quantidade de folículos ovarianos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2008), evitando a atresia folicular. Destaca-se, entre os objetivos da MOIFOPA na medicina veterinária, a utilização de folículos pré-antrais de fêmeas jovens, reduzindo o intervalo entre gerações e aumentando a produtividade de animais de alto valor zootécnico, permitindo incremento do ganho genético (FIGUEIREDO et al., 2008).

Entre as principais biotecnologias da reprodução utilizadas para a conservação do tecido ovariano, estão o cultivo *in vitro*, a vitrificação e o xenotransplante (transplante entre espécies diferentes), que enfrentam desafios como a formação de cristais de gelo intracelulares e o estresse oxidativo na vitrificação, a neovascularização no xenotransplante e a formulação de um meio ideal para o cultivo *in vitro* (CHANKITISAKUL et al., 2013). Apesar de ser um método de criopreservação barato, rápido e fácil de ser realizado (PEGG, 2007), a vitrificação necessita de altas concentrações de crioprotetores para que a solução de vitrificação comporte-se como um sólido, porém sem cristalização (CHIAN et al., 2004).

O xenotransplante é uma alternativa para a preservação do material genético de fêmeas com alto valor zootécnico após infertilidade adquirida ou morte (BEZERRA et al., 2011). No entanto, os principais entraves para a restauração da fertilidade a partir de transplante de córtex ovariano criopreservado são as aderências e o risco de isquemia até que ocorra a neovascularização (LIU et al., 2002) e o retorno à funcionalidade. Nesse contexto, diversas substâncias antioxidantes estão sendo estudadas para aperfeiçoar essas biotécnicas, como o resveratrol, que possui comprovada ação antioxidante e angiogênica (JUAN, 2005; SIMÃO,

2012). Espera-se que o resveratrol possa contribuir para o sucesso de biotecnologias como cultivo *in vitro*, vitrificação e xenotransplante.

A viabilidade do tecido ovariano pode ser avaliada por microscopia confocal, que permite verificar o nível de apoptose celular e de oxidação do tecido submetido a vários tratamentos. Essa técnica possibilita a obtenção de imagens tridimensionais computadorizadas de amostras vivas, permitindo o estudo de estruturas e moléculas marcadas com fluorocromos (PRICE; JEROME, 2011).

O tecido ovariano bovino foi escolhido para o estudo com o intuito de melhorar a eficiência reprodutiva das vacas, tendo em vista a importância da espécie bovina para o agronegócio. A utilização do resveratrol associada à vitrificação aparece como opção inédita para a conservação da viabilidade do tecido ovariano, por permitir a otimização dessas biotecnologias aplicadas a animais de alto mérito genético.

Objetivou-se verificar a viabilidade, a apoptose e a oxidação do córtex ovariano de vacas após vitrificação associada ao resveratrol e posteriormente cultivo *in vitro* ou xenotransplante

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS E MOIFOPA

A unidade morfofuncional dos ovários dos mamíferos é o folículo, onde ocorre o crescimento e a maturação do ovócito. O folículo tem uma função endócrina, que é a de produzir e liberar hormônios, e uma exócrina, que é a produção dos gametas femininos. Os folículos das fêmeas bovinas situam-se no córtex ovariano e podem ser classificados em pré-antrais, que podem ser primordiais, primários ou secundários, e antrais, que são terciários ou ovulatórios (LIMA; SANTOS, 2010).

Os folículos são ativados de forma gradual, com a conversão das pré-células achatadas da pré-granulosa em uma única camada de células cúbicas, marcando a transição de folículos primordiais para folículos primários. Em seguida, quando adquirem mais de uma camada de células cúbicas, os folículos passam a ser denominados como secundários. Após a formação da cavidade antral, que possui líquido e regula o crescimento do ovócito (BEZERRA et al., 2011), os folículos tornam-se terciários.

Os processos de crescimento e atresia de um grupo de folículos antrais ocorrem de forma contínua durante o ciclo estral. O desenvolvimento dos folículos pré-antrais não precisa, necessariamente, dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), porém os folículos antrais são dependentes desses hormônios (MELLO et al., 2014). Tendo em vista a grande perda de folículos pelo mecanismo de atresia, diversos estudos têm sido conduzidos com sistemas de cultivo *in vitro* de folículos antrais e pré-antrais para esclarecer os mecanismos e fatores relacionados aos processos de crescimento e atresia foliculares (MELLO et al., 2014).

Nesse contexto, a MOIFOPA (manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais) tem contribuído para elucidar os fatores envolvidos nesses processos. Além disso, como a quantidade de folículos que chega à ovulação é baixa, a técnica de MOIFOPA tem permitido aproveitar os ovócitos que estão nos folículos pré-antrais. Essa biotécnica pode ser usada para o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico e na reprodução de animais ameaçados de extinção, por proporcionar grande quantidade de oócitos para cultivo e maturação *in vitro*. Outras aplicações dessa biotecnologia incluem a redução do intervalo entre gerações, a obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte e a produção de uma grande quantidade de embriões (LIMA; SANTOS, 2010).

2.2. VITRIFICAÇÃO E XENOTRANSPLANTE COM RESVERATROL

A vitrificação é uma técnica de criopreservação de tecidos que evita a principal desvantagem do congelamento lento, que é a formação intracelular de cristais de gelo, no entanto para que a solução passe do estado líquido para sólido é necessário uma alta concentração crioprotetores e uma rápida diminuição de temperatura (RODRIGUES et al., 2016).

A biotécnica de xenotransplante consiste no transplante de tecido de uma espécie para outra. Entre suas aplicações, pode-se citar o aumento da eficiência reprodutiva de fêmeas de alto valor genético que morreram ou que adquiriram infertilidade, além do seu uso para a preservação da variabilidade genética requisitada para a conservação de espécies em extinção. O uso de camundongos *knockout* para genes ligados à resposta imune do tipo humoral possibilitou que a técnica de xenotransplante fosse uma das formas de maturação de tamanho adequado de ovócitos para a produção *in vitro* de embriões (BEZERRA et al., 2011).

Algumas das dificuldades enfrentadas após o xenotransplante de córtex ovariano criopreservado são as isquemias e adesões que podem ocorrer até a nova vascularização e retorno da função desse tecido (PIMENTEL et al., 2015). De forma geral, após esse tipo de transplante, anticorpos do sangue ligam-se ao tecido transplantado e substâncias como hidratos de carbono e proteínas são liberadas no endotélio do órgão. Em resposta, o endotélio converte o anticoagulante em pró-coagulante, os anticorpos se ligam às proteínas do sistema complemento e ocorre lise das células endoteliais, atraindo outros agentes do sistema imune e provocando a rejeição hiperaguda (PIMENTEL et al., 2015).

Já a rejeição retardada, que está ligada à imunidade celular, está relacionada à ativação de macrófagos e células *natural killers* (NK), agregação de plaquetas e acúmulo de fibrina nesse tecido (PIMENTEL et al., 2015). Portanto, o uso de substâncias que retardam esses processos, como o resveratrol, seria de grande valia para melhorar o desenvolvimento do tecido xenotransplantado. Essa substância é produzida pela interação de plantas com um micro-organismo presente nas raízes de *Polygonum cuspidatum* (bambu mexicano, *knotweed* japonês), *Vitis vinífera* (parreira videira-europeia), uvas vermelhas e amoras, e protege essas plantas contra infecções fúngicas e bacterianas (MUKHERJEE et al., 2014).

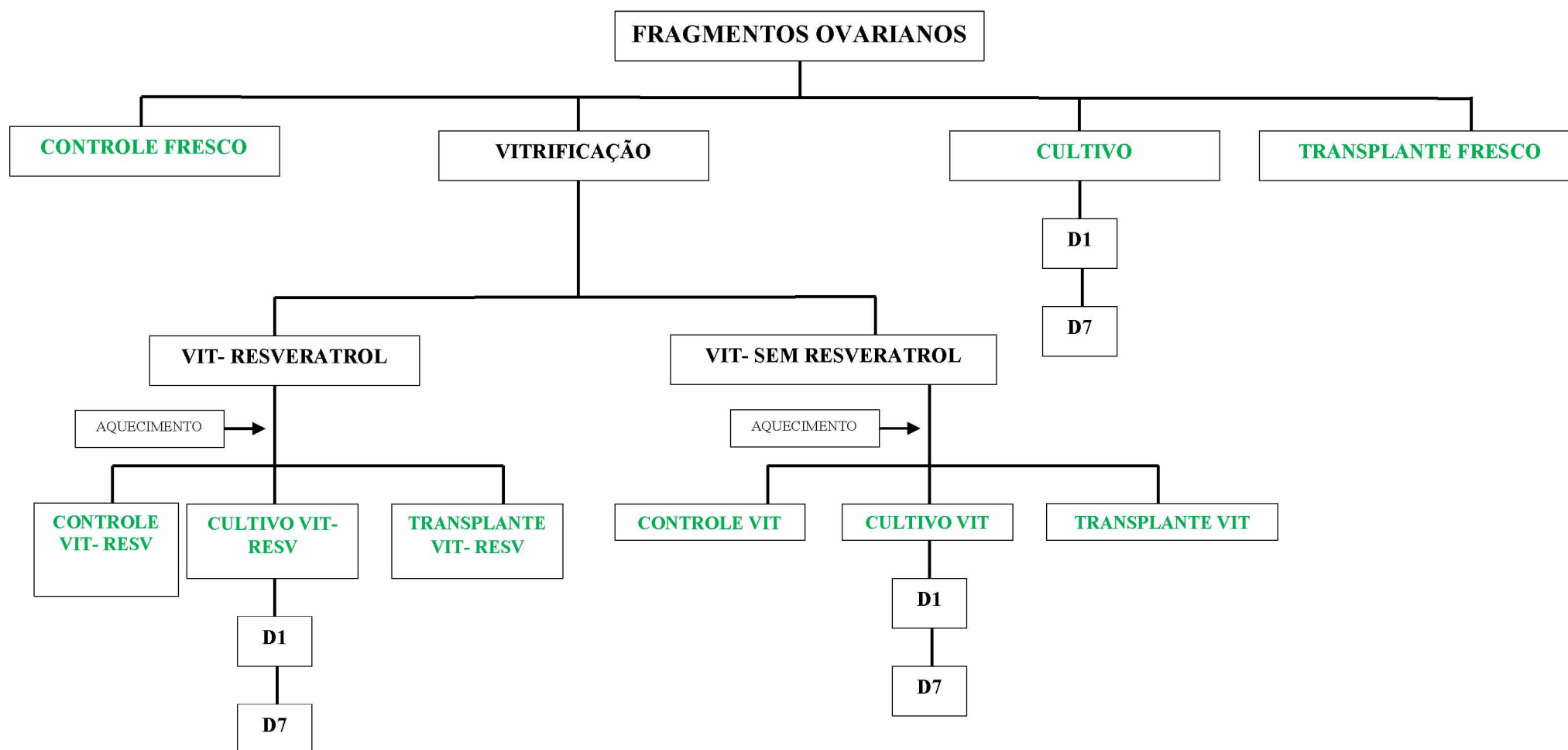
O resveratrol também possui efeitos anti-inflamatórios, cardioprotetores e antitumorais (MUKHERJEE et al., 2014). É um agente antioxidante que atua como quelante de espécies

reativas de oxigênio e regula a expressão de genes que controlam a sobrevivência e a apoptose celular, além de alterar a resposta ao óxido nítrico (ALBERTONI; SCHOR, 2015). Os efeitos desse composto devem-se às suas características químicas e físicas, tendo sido comprovados em hepatócitos, cérebro e células tumorais, reduzindo produção de radicais livres e induzindo a expressão de genes antioxidantes, como catalase, glutathione peroxidase e superóxido de manganês dismutase, entre outros (GAVIRIA et al., 2018).

Os efeitos do resveratrol também têm sido estudados em ovócitos e embriões. Em ovócitos de camundongos, essa substância reduziu o efeito negativo do estresse oxidativo, evitando danos ao DNA, diminuindo a distribuição anormal de mitocôndrias e cromossomos, e reduzindo a peroxidação lipídica. Em oócitos suínos, a adição de 2 μ M de resveratrol durante a maturação *in vitro* e/ou vitrificação modularam o processo de apoptose, melhorando a criotolerância de oócitos suínos vitrificados (GIARETTA et al., 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental



Foram utilizados 10 pares de ovários, distribuídos nos 9 grupos experimentais, de maneira que houvesse fragmentos de cada par de ovários em todos os grupos. Os fragmentos foram primeiramente divididos em 9 grupos: controle fresco (G₁), controle vitrificado (G₂), controle vitrificado + resveratrol (G₃), cultivo fresco (G₄), vitrificado cultivado (G₅), vitrificado + resveratrol cultivado (G₆), xenotransplante (G₇), xenotransplante vitrificado (G₈), xenotransplante vitrificado + resveratrol (G₉).

Foram realizadas 4 réplicas, sendo que as 3 primeiras contaram com todos os grupos, incluindo os grupos de xenotransplante, e a réplica 4 contou apenas com grupos sem xenotransplante. As réplicas 1 e 2 foram realizadas com 2 pares ovarianos cada, e as réplicas 3 e 4, com 3 pares ovarianos cada. Todos os fragmentos presentes em todos os grupos passaram por análise de microscopia confocal. Cada par de ovário forneceu 5 fragmentos para cada grupo, totalizando 45 fragmentos por cada par ovariano. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aprovado, sob o protocolo – número 006/17.

Coleta dos ovários

Os ovários das vacas foram obtidos de um frigorífico situado no município de Uberlândia-MG. Após a coleta, os ovários foram lavados com álcool a 70% por imersão 10 segundos e lavados 2 vezes em meio MEM-HEPES suplementado com 100µg/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina e armazenados em tubos contendo meio MEM-HEPES. O transporte foi realizado em caixa isotérmica a temperatura de 4 °C, por até 2 horas.

Preparação dos materiais

No laboratório, os ovários foram fragmentados. O córtex ovariano originou fragmentos de 3mm x 3mm x 1mm.

Vitrificação e aquecimento do tecido ovariano

O procedimento de vitrificação consistiu na exposição dos fragmentos de tecido ovariano às soluções de vitrificação, sendo inicialmente expostos por 4 minutos à uma solução de meio base TCM 199 suplementado com 10 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25 M de sacarose (SAC), 10% de etilenoglicol (EG – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – Dinâmica Química, Diadema-SP, Brasil) e 20 µM de

resveratrol. Em seguida, a solução foi substituída por outra, cuja composição era semelhante, com alteração apenas na concentração dos agentes crioprotetores (20% EG e 20% DMSO) imersos por 1 minuto. Os fragmentos foram envasados em palhetas plásticas seladas e imersos em nitrogênio líquido. Após duas semanas de crioestocagem os fragmentos foram aquecidos e transplantados. Para o aquecimento foi feito à temperatura ambiente (~25°C) por 1 minuto e, em seguida, imersas em banho-maria (37°C) por 30 segundos. Posteriormente, os crioprotetores foram removidos utilizando três lavagens sucessivas, com duração de 5 minutos cada, em meio TCM 199 contendo BSA (10 mg/mL) e concentrações decrescentes de sacarose (0,5; 0,25 e 0 M).

Xenotransplante

Um total de 30 camundongos da linhagem Balb C, com seis semanas de idade foram utilizados no estudo, sendo 9 na réplica 1, 9 na réplica 2 e 12 na réplica 3. Três a quatro camundongos foram alojados em cada gaiola, em sala mantida a temperatura de 22° C, com ciclos de iluminação alternados em claro e escuro a cada 12 horas dentro do biotério da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais tiveram livre acesso a água e alimento esterilizados.

Os animais foram devidamente anestesiados (Xilazina 2% + Quetamina 2%) e a dor foi controlada durante todo o procedimento cirúrgico com uso de Tramadol. Durante os procedimentos de transplante, os camundongos receberam quatro enxertos de fragmentos por animal suturados com fio não absorvível Prolene 5/0 junto ao peritônio na cavidade abdominal. Após três semanas do procedimento de transplante, os enxertos foram recuperados. Os camundongos foram sacrificados por uso de anestésico geral seguido de deslocamento de cervical para a remoção cirúrgica dos enxertos (Donfack et al., 2018).

Cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos

O cultivo *in situ* de folículos pré-antrais bovinos foi realizado por 7 dias utilizando com o meio de base o TCM 199 suplementado com 50 µg/mL de ácido ascórbico (AA), 1% de ITS (10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina e 0,5 ng/mL de selênio), 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina. Os fragmentos foram cultivados individualmente em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo utilizando incubadora a 39°C (5% de CO₂), sendo a troca total de meio realizada a cada 48 horas.

Microscopia Confocal

Os fragmentos podem ser avaliados por microscopia confocal como descrito por CARVALHO et al (2014). No presente estudo os fragmentos destinados para análise de intensidade de fluorescência foram lavados utilizando solução PBS com soro fetal bovino a 5% após passar por cada probe e colocados para corar ao abrigo da luz em solução com 1µl/ml de H2DCFDA por 30 minutos, em seguida corados com 10µM/ml YO PRO 01 durante 30 minutos, seguido de solução com 100µg/ml de iodeto de propídio, incubados por mais 15 minutos. Após este período, foram fixados em paraformaldeído 4% durante 15 minutos e armazenados em PBS a 4 °C ao abrigo da luz. Após esta etapa, as amostras foram levadas para análise da intensidade de fluorescência (pixels) em diferentes profundidades teciduais com a utilização de microscópio de varredura à laser confocal LSM 510 ZEISS® em aumento de 20 vezes de acordo com as faixas de excitação/emissão de cada sonda: DCF 495/519 nm; YOPRO-1 491/509 nm; iodeto de propídeo 543/616 nm.

Na análise confocal, foram avaliadas as condições de viabilidade, apoptose e oxidação do tecido ovariano após os referidos tratamentos. O corante H2DCFDA emite fluorescência que indica o nível de emissão de espécies reativas de oxigênio e detecção de processo oxidativo em células fagocíticas. Já a probe YO PRO 01 indica através da emissão da fluorescência a quantidade de células em processo de apoptose. Finalmente, o corante iodeto de propídio emite a fluorescência adquirida por células degeneradas. A análise foi realizada com dois fragmentos de cada grupo, onde o comprimento de onda para cada corante foi previamente programado e as secções foram realizadas em intervalos de 8 micrômetros com média de 10 secções em Z-Stack (3D). As imagens foram salvas no programa Zen 2.3 lite 2008 instalado ao microscópio, que apresenta os dados numéricos da intensidade de fluorescência utilizados nas análises estatísticas.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o programa de análise estatística R version 3.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Os resultados foram expressos como média + SEM e os testes utilizados para a análise estatística para a comparação de médias foi feito utilizando o ANOVA seguido do teste Student Newman Keuls. Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

Um total de 214 fragmentos ovarianos foram avaliados por microscopia confocal tridimensional para cada probe. De maneira geral, todos os tratamentos apresentaram redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), comparados ao controle fresco. Os tratamentos com vitrificação tecidual foram semelhantes entre si e ao xenotransplante vitrificado com resveratrol. O tratamento controle vitrificado com resveratrol foi semelhante ao xenotransplante fresco e xenotransplante vitrificado com resveratrol. Nos tratamentos com cultivo *in vitro*, o grupo vitrificado com resveratrol apresentou redução dos níveis de ROS nos dias D₁ e D₇ do cultivo. O mesmo comportamento foi observado no grupo de cultivo fresco (Tabela 1).

Tabela 1. Média da intensidade de fluorescência captada com a probe DCF para espécies reativas de oxigênio.

Tratamentos	Emissão de espécies reativas de oxigênio (pixels)	
	D1 (cultivo)	D7 (cultivo)
Controle fresco	50,32 + 2,79 D	
Controle vitrificado	30,43 + 1,46 B	
Controle vitrificado + resveratrol	34,68 + 1,94 BC	
Cultivo fresco	36,30 + 1,97 a A*	24,41 + 1,71 b A*
Vitrificado cultivado	26,56 + 2,06 a B*	23,54 + 1,90 a AB*
Vitrificado + resveratrol cultivado	30,48 + 1,94 a B*	19,72 + 1,11 b B*
Xenotransplante	37,48 + 2,24 C	
Xenotransplante vitrificado	10,24 + 0,85 A	
Xenotransplante vitrificado + resveratrol	28,23 + 2,70 B	

Letras minúsculas a, b na linha (P < 0,05); letras maiúsculas ABCD na coluna (P < 0,05); *difere do cultivo fresco.

A análise estatística para a comparação de médias foi feito utilizando o ANOVA seguido do teste Student Newman Keuls.

Os níveis de fluorescência captados para a apoptose celular estão apresentados na Tabela 2. Todos os tratamentos apresentaram níveis de apoptose celular reduzidos em relação ao controle fresco. O xenotransplante vitrificado com resveratrol apresentou níveis semelhantes de apoptose comparado aos grupos controle vitrificado e controle vitrificado com resveratrol. Adicionalmente, o grupo xenotransplantado vitrificado demonstrou a menor taxa de apoptose celular. Os níveis de apoptose foram semelhantes entre o cultivo fresco e o cultivo vitrificado com resveratrol após 24 h de cultivo. No final do período de cultivo, todos os grupos apresentaram redução da apoptose celular comparado ao D₁ e foram semelhantes entre si.

Tabela 2. Média da intensidade de fluorescência captada com a probe YOPRO para apoptose celular.

Tratamentos	Níveis de apoptose celular (pixels)	
	D1 (cultivo)	D7 (cultivo)
Controle fresco	21,01 + 1,15 D	
Controle vitrificado	11,77 + 0,58 B	
Controle vitrificado + resveratrol	13,29 + 0,66 B	
Cultivo fresco	13,24 + 0,60 a A*	9,23 + 0,52 b A*
Vitrificado cultivado	11,22 + 0,60 a B*	8,84 + 0,60 b A*
Vitrificado + resveratrol cultivado	12,28 + 0,61 a AB*	9,31 + 0,44 b A*
Xenotransplante	18,30 + 1,11 C	
Xenotransplante vitrificado	5,05 + 0,21 A	
Xenotransplante vitrificado + resveratrol	12,52 + 1,09 B	

Letras minúsculas a, b na linha ($P < 0,05$); letras maiúsculas ABCD na coluna ($P < 0,05$); *difere do cultivo fresco.

A análise estatística para a comparação de médias foi feito utilizando o ANOVA seguido do teste Student Newman Keuls.

O grupo controle vitrificado com resveratrol apresentou níveis de degeneração celular semelhantes ao controle fresco. Os grupos controle vitrificado e xenotransplantado vitrificado com resveratrol demonstraram as maiores taxas de degeneração celular. Por outro lado, o grupo xenotransplantado fresco apresentou os menores níveis de degeneração. O grupo de fragmentos cultivados após vitrificação com resveratrol apresentou menor nível de degeneração celular comparado aos fragmentos cultivados após vitrificação sem resveratrol no D1. Os grupos de cultivo vitrificado com ou sem resveratrol elevaram seus níveis de degeneração celular comparados ao cultivo fresco após 7 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Média da intensidade de fluorescência captada com a probe IP para degeneração celular.

Tratamentos	Níveis de degeneração celular (pixels)	
	D1 (cultivo)	D7 (cultivo)
Controle fresco	1,95 + 0,21 B	
Controle vitrificado	6,03 + 0,51 D	
Controle vitrificado + resveratrol	2,92 + 0,31 B	
Cultivo fresco	1,53 + 0,12 a A	2,80 + 0,31 b A*
Vitrificado cultivado	7,32 + 0,63 a C*	5,71 + 0,61 a B*
Vitrificado + resveratrol cultivado	4,98 + 0,30 a B*	5,05 + 0,34 a B*
Xenotransplante	0,93 + 0,11 A	
Xenotransplante vitrificado	4,75 + 0,47 C	
Xenotransplante vitrificado + resveratrol	5,89 + 0,49 D	

Letras minúsculas a, b na linha ($P < 0,05$); letras maiúsculas ABCD na coluna ($P < 0,05$); *difere do cultivo fresco.

A análise estatística para a comparação de médias foi feito utilizando o ANOVA seguido do teste Student Newman Keuls.

5. DISCUSSÃO

Dentro do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia os níveis de fluorescência emitidos para espécies reativas de oxigênio (EROs), apoptose e degeneração celular em tratamentos de vitrificação e xenotransplante de tecido ovariano bovino.

Avaliando os níveis de EROs, a adição do resveratrol foi benéfica ao grupo de xenotransplante vitrificado comparado ao grupo xenotransplante vitrificado sem resveratrol, mostrando que o resveratrol possui comprovada ação antioxidante nos tecidos. De modo semelhante, Rocha (2017) observou maior proporção de folículos pré-antrais normais após a vitrificação com resveratrol comparado aos grupos sem resveratrol, comprovando o seu efeito antioxidante.

Gaviria et al (2018) suplementaram o meio de cultura de embriões bovinos com resveratrol e verificaram melhor qualidade e criotolerância sem afetar as taxas de blastocisto. Wang et al (2014) observaram que, ao adicionar resveratrol ao meio de cultivo *in vitro*, houve diminuição da secreção de estrógeno e aumento da secreção de progesterona pelas células do *cumulus*, promovendo a expansão do *cumulus* e a formação do corpúsculo polar em ovócitos bovinos, além de melhorar a produção do blastocisto. De forma semelhante, no nosso estudo o grupo de fragmentos cultivados após vitrificação com resveratrol apresentou menor nível de degeneração celular comparado aos fragmentos cultivados após vitrificação sem resveratrol no D₁.

Giaretta et al (2013), ao usarem resveratrol em oócitos suínos durante a vitrificação, maturação, e antes ou duas horas após o aquecimento, observaram inibição dos prejuízos causados pela criopreservação. De forma semelhante, Carvalho et al (2014) sugerem que, ao adicionar antioxidantes durante qualquer etapa da vitrificação de fragmentos de tecidos ovarianos, pode-se reduzir o estresse oxidativo.

O processo de vitrificação seguido ou não de cultivo e xenotransplante reduziu os níveis de apoptose celular, e a adição de resveratrol apresentou uma redução menos evidente no grupo de fragmentos xenotransplantados após vitrificação com resveratrol. Os tratamentos propostos após a vitrificação tecidual retornaram a atividade metabólica dos fragmentos ovarianos, e o resveratrol ofereceu um efeito protetor ou preservou o tecido durante a vitrificação. Para que se tenha a homeostasia dos tecidos, vários mecanismos biológicos moduladores são necessários, como a apoptose. Esse mecanismo regula a morfogênese e limita reações imunes (PAROLIN; REASON, 2001).

A apoptose é um mecanismo que ocorre em diferentes episódios fisiológicos e patológicos, sendo uma forma de retirada de células danificadas, de renovação tecidual e celular. É um fenômeno controlado geneticamente, devido à interação celular com o meio externo que leva à produção de uma série de moléculas com funções específicas que causam alterações celulares e funcionais. Este evento de morte celular programada exerce papel fundamental na homeostase do tecido, sendo esta dependente do correto equilíbrio entre proliferação e morte celular (ANAZETTI; MELO, 2007). O aumento do nível de EROs superior à capacidade de tamponamento e atividade enzimática feita para controlar os níveis desses agentes, leva ao estresse oxidativo, com potencial citotóxico. Com isso, radicais de alta reatividade podem levar a danos permanentes no DNA (ANAZETTI; MELO, 2007). Sendo assim, a atividade de apoptose mostra que o funcionamento da maquinaria celular está ocorrendo.

Os níveis de degeneração celular foram reduzidos após o processo de vitrificação com adição do resveratrol. Como o resveratrol foi acrescentado somente na solução de vitrificação, este resultado demonstra o seu efeito protetor na viabilidade celular. Rocha (2017), ao utilizar resveratrol como crioprotetor de tecido ovariano de fetos bovinos, obteve viabilidade desse tecido semelhante ao grupo controle, provando o efeito crioprotetor do resveratrol.

6. CONCLUSÃO

O resveratrol apresenta efeitos de proteção da viabilidade do córtex ovariano durante os processos de vitrificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTONI, G.; SCHOR, N. Resveratrol desempenha importante papel no mecanismo de proteção na doença renal - mini-revisão. **Brazilian Journal of Nephrology**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 106-114, 2015.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

BEZERRA, M. B. et al. Potencial do cultivo in vitro e do xenotransplante na sobrevivência e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 483-489, 2011.

CARVALHO, A. A. et al. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research in Veterinary Science**, London, v. 97, n. 1, p. 140-147, 2014.

CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 4, p. 590-598, 2013.

CHIAN, R. C. et al. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 685-696, 2004.

DONFACK, N. J. et al. Xenotransplantation of goat ovary as an alternative to analyse follicles after vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, Oxford, 2018.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008. p. 303-327.

GAVIRIA, S. M. et al. Resveratrol supplementation promotes recovery of lower oxidative metabolism after vitrification and warming of *in vitro*-produced bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, 2018.

GIARETTA, E. et al. Effects of Resveratrol on Vitrified Porcine Oocytes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, London, v. 1, p. 1-7, 2013.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

JUAN, S. H. et al. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 41-48, 2005.

- LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, p. 36-42, 2010.
- LIU, J. et al. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 605-611, 2002.
- MELLO, R. R. C. et al. Aspectos da dinâmica folicular em bovinos. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, Patos, v. 10, n. 4, p. 1-6, 2014.
- MUKHERJEE, A. et al. Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 31, p. 229-239, 2014.
- NUTTINCK, F. et al. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles - a preliminary study. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 811-821, 1993.
- PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de Lesão nas doenças Hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.
- PEGG, D. E. Principles of Cryopreservation. In: DAY, J. G., STACEY, G. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. 2 ed. Totowa: Humana Press Inc., 2007. p. 39-57.
- PIMENTEL, M. M. L. et al. Xenotransplante de tecidos ovários em animais: Limitações, técnicas e inovações: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 9, n. 3, p. 580-591, 2015.
- PRICE, R. L.; JEROME, W. G. **Basic Confocal Microscopy**, New York: Springer, 2011. 315 p.
- ROCHA, C. D. **Vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.
- RODRIGUES, A. P. R. et al. Criopreservação do tecido ovariano visando restaurar a fertilidade humana. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 4, p. 188-193, 2016.
- SIMÃO, F. et al. Pro-angiogenic effects of resveratrol in brain endothelial cells: nitric oxide-mediated regulation of vascular endothelial growth factor and metallo proteinases. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, New York, v. 32, n. 5, p. 884-895, 2012.
- TELFER, E. E. In vitro models for oocyte development. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, n. 2, p. 451-460, 1998.
- WANG, F. et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, New York, v. 101, n. 2, p. 577-586, 2014.