



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SANIDADE ANIMAL E SAÚDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

SAMARA DIAS CARDOSO RODRIGUES

**EFEITO DO RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE NA
VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO**

ARAGUAÍNA(TO)
2020

SAMARA DIAS CARDOSO RODRIGUES

EFEITO DO RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE NA VITRIFICAÇÃO DE
TECIDO OVARIANO BOVINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Área de Concentração:

Saúde Pública e Sanidade Animal nos Trópicos

Linha de Pesquisa:

Morfofisiopatologia e Biotecnologias

Orientadora:

Prof^a Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

Comitê de Orientação:

Prof^a Dra. Ana Kelen Felipe Lima

Prof. Dr. Vicente José de Figuerêdo Freitas

ARAGUAÍNA/(TO)
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

R696e Rodrigues, Samara Dias Cardoso .
EFEITO DO RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE NA
VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARINO BOVINO. / Samara Dias Cardoso
Rodrigues. – Araguaina, TO, 2020.
68 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Araguaina - Curso de Pós-Graduação (Mestrado)
em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2020.

Orientadora : Francisca Elda Ferreira Dias

Coorientadora : Ana Kelen Felipe Lima

1. Reprodução Animal. 2. Vitnificação de Tecido Ovariano Bovino. 3.
Antioxidante Natural. 4. Biotecnologia. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

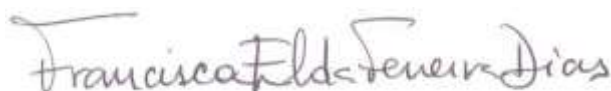
**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

EFEITO DO RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE NA VITRIFICAÇÃO
DE TECIDO OVARIANO BOVINO

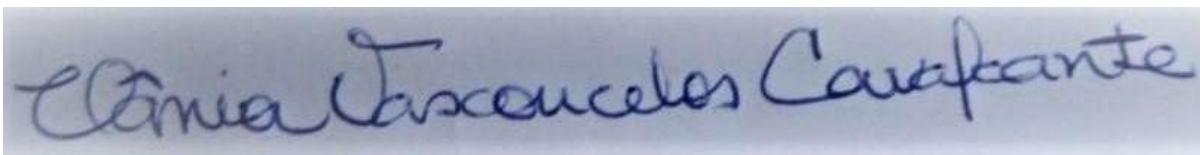
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Data de aprovação: 18/03/2020.

Banca Examinadora




Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias – UFT, Orientadora, UFT



Profa. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante –

UFPI



Prof. Dr. Sandro Estevan Moron – UFT, Examinador, UFT

*“Esperei com paciência no Senhor, e ele se
inclinou para mim e ouviu o meu clamor”*

Salmo 40

AGRADECIMENTOS

Á DEUS, por ter-me concedido, fé, saúde e força, cuidando de todos os detalhes na minha vida e na realização de mais essa etapa na minha jornada profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) /EMVZ/UFT, em nome do Prof. Dr. Marco Giannoccaro (Coordenador) e Prof. Dr^a Helciléia Dias (Vice-coordenadora).

Ao Laboratório de Reprodução Animal (LARA/UFT), na pessoa da técnica e amiga Denise Amorim, onde tive a oportunidade de realizar todo meu experimento de mestrado, grata por toda paciência e carinho, a você minha admiração e respeito.

A todos membros integrantes do grupo do Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da (LMBP/UFT), na pessoa do Prof. Dr. Sandro Estevan Moron, por ter nos recebido e aceitado nosso pedido para realização do processamento histológico. Ainda as amiga e técnicas de laboratório Gilzelle Maria e Liana Lima por todo profissionalismo, ajuda e paciência prestada na realização deste trabalho, a vocês minha admiração e respeito.

A Universidade Estadual do Ceará (UECE), por ter nos recebido em missão ao Laboratório de Manipulação da Fisiologia e Controle da Reprodução Animal (LFCR), na pessoa do Prof. Dr. Vicente José de Figuerêdo Freitas; e ao Laboratório de Morfologia Experimental Compara (LMEC) na pessoa da Prof. Dr^a Janaína Serra Azul, pelo aceite na realização do processamento das nossas amostras.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pelo apoio e suporte financeiro através de bolsa concedida, e ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) pelo apoio na participação em missão de estudos em laboratório em outras instituições.

Ao Frigorífico Aracarnes de Araguaína-TO em nome do presidente Sebastião de Alencar Bastos, por abrir as portas e nos receber para coleta de material.

Aos amigos que contribuíram significativamente para realização desse trabalho: Mayara Cruz, Thiago Habner, Natanael Gustavo, a vocês minha gratidão.

Aos meus queridos companheiros da iniciação científica Aliny Silva e Gabriel Sobreira por toda ajuda e dedicação prestada, a vocês minha gratidão.

A irmandade que Araguaína e o curso de mestrado me deram Mariana Rodrigues e Pâmella Alexandre, a vocês todo companheirismo e amizade.

Aos meus familiares, em memória ao meu querido tio José Carlos que em vida torceu pela minha vitória. Aos meus pais e avós, Carlos e Maria dos Anjos os quais desde a infância, são os meus verdadeiros exemplos de força e perseverança. E em especial, a minha mãe Solange, a qual lutou incansavelmente, superando junto a mim, todas as dificuldades.

A minha querida coorientadora Prof^a Dr.^a Ana Kelen Felipe Lima por todos os ensinamentos, paciência e carinho a mim prestados, a você minha amizade, admiração e gratidão.

A minha querida orientadora Prof^a Dr.^a Francisca Elda Ferreira Dias, uma mãe e amiga por ter dispensado seu tempo, paciência e carinho em me instruir formidavelmente na idealização e execução deste trabalho, e apoio nos demais projetos vindouros, a você minha amizade, admiração e gratidão.

Muito obrigada

RESUMO

Efeito do Resveratrol Associado a Sacarose na Vitriificação de Tecido Ovariano Bovino

Entre as biotecnologias da reprodução animal, a criopreservação de gametas tem se tornado uma biotécnica bem consolidada, embora ainda apresente alguns obstáculos quando se trata da criopreservação de oócitos e tecido ovariano. Nosso objetivo foi avaliar o efeito da associação do antioxidante resveratrol à sacarose na vitriificação de tecido ovariano de novilhas pré-puberes e vacas adultas sobre a morfologia e viabilidade folículos pré-antrais. Foram utilizados 20 ovários obtidos aleatoriamente na linha de abate em frigorífico local, 10 ovários de novilhas pré-puberes e 10 ovários de vacas adultas, estes foram fragmentados e distribuídos aos diferentes tratamentos: controle (Co), toxicidade (T) e vitriificação (V), os tratamentos de toxicidade e vitriificação submetidos as seguintes soluções de vitriificação: Solução base de vitriificação (SBV) com sacarose 0,25M (VS), SBV com resveratrol 10 μ M (VR) e SBV com sacarose e resveratrol (VS+R) nas mesmas concentrações, pós- descongelamento os fragmentos ovarianos foram avaliados quanto a morfologia e viabilidade folicular pela microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão nesta ordem. Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade mediante o Shapiro-Wilk, a porcentagem de folículos normais e degenerados nos grupos experimentais foi analisada pelo teste de Qui-quadrado, já as variáveis que não passaram pelo teste de normalidade submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, considerando ($P < 0,05$) para determinação de diferenças entre os tratamentos (InfoStat Statistical Software INFOSTAT, 2012). Do total de 2.610 folículos pré-antrais avaliados pela microscopia de luz, o percentual médio de normais e degenerados foi 65,51% e 34,49 % respectivamente. E nos diferentes tratamentos de toxicidade e vitriificação e em relação aos grupos adultas e pré-puberes não houve diferença ($p > 0,05$). Já os folículos secundários diferiram ($p \leq 0,05$) no grupo controle quando comparados aos foliculares primordiais e primários, ainda estes se apresentaram em menor proporção nos diferentes tratamentos de vitriificação em ambos os grupos de fêmeas bovinas. Os fragmentos de tecido ovariano vitriificados apresentaram resultados semelhantes ao controle fresco. Pode-se concluir que antioxidante natural resveratrol quando associados a sacarose contribui para a preservação morfológica de folículos pré-antrais de novilhas pré- puberes e vacas adultas quando submetidas ao processo de vitriificação e reaquecimento.

Palavras-chaves: Antioxidante Natural. Criopreservação. Fêmea. Oócitos

ABSTRACT

Effect of Resveratrol Associated with Sucrose on Vitrification of Bovine Ovarian Tissue

Among the biotechnologies of animal reproduction, gamete cryopreservation has become a well established biotechnology, although it still presents some obstacles when it comes to the cryopreservation of oocytes and ovarian tissue. Our objective was to evaluate the effect of the association of the antioxidant resveratrol with sucrose on the vitrification of ovarian tissue of pre-puberty heifers and adult cows on the morphology and viability of preantral follicles. Twenty ovaries obtained randomly from the slaughter line in a local refrigerator, 10 ovaries from pre-puber heifers and 10 ovaries from adult cows were used, these were fragmented and distributed to different treatments: control (Co), toxicity (T) and vitrification (V), the toxicity and vitrification treatments submitted to the following vitrification solutions: Vitrification base solution (SBV) with 0.25M sucrose (VS), SBV with 10 μ M resveratrol (VR) and SBV with sucrose and resveratrol (VS + R) at the same concentrations, after thawing, the ovarian fragments were evaluated for morphology and follicular viability by light microscopy and transmission electron microscopy, respectively. The data of the evaluated variables were submitted to normality tests using the Shapiro-Wilk, the percentage of normal and degenerate follicles in the experimental groups were analyzed by the Chi-square test, since variables that did not pass the normality test submitted to the Kruskal-Wallis test, considering ($P < 0.05$) for determining differences between treatments (InfoStat Statistical Software INFOSTAT, 2012). Of the total of 2,610 preantral follicles evaluated, the average percentage of normal and degenerate was 65.51% and 34.49% respectively. And in the different toxicity and vitrification treatments and in relation to the adult and pre-pubertal groups there was no difference ($p > 0.05$). Secondary follicles differed ($p \leq 0.05$) in the control group when compared to primordial and primary follicles, even though these were presented in a smaller proportion in the different vitrification treatments in both groups of bovine females. The vitrified ovarian tissue fragments showed similar results to the fresh control. It can be concluded that natural antioxidant resveratrol when combined with sucrose contributes to the morphological preservation of pre-antral follicles of pre-puberty heifers and adult cows when subjected to the process of vitrification and reheating.

Keywords: Natural Antioxidant. Cryopreservation. Female. Oocytes.

LISTA DE SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	Estrógeno
EG	Etilenoglicol
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HE	Hematoxilina e eosina
LARA	Laboratório de Reprodução Animal
MOIFOPA	Manipulação de oócito inclusos em folículos pré-antrais
M	Molar
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
P4	Progesterona
SV	Solução de Vitrificação
T	Toxicidade
V	Vitrificação

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Organização do ovário de mamíferos, ilustrando suas principais estruturas..... 18
- Figura 2.** Estruturas químicas de trans-resveratrol e cis-resveratrol..... 26

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Desenho experimental. Demonstrando a fragmentação e divisão dos grupos por tratamentos em: (Co) Controle; (T0) Toxicidade zero/ apenas com solução base de vitrificação (SBV), (TS) Toxicidade com SV mais Sacarose, (TR) Toxicidade com SV mais resveratrol, (TS+R) Toxicidade com SV e Sacarose mais Resveratrol; (VS) Vitrificação com SV e Sacarose, (VR) Vitrificação com SV e Resveratrol, (VS+R) Vitrificação com SV e Sacarose mais Resveratrol. 48
- Figura 2.** Representação esquemática da exposição dos fragmentos ovarianos aos diferentes testes de toxicidade: Toxicidade zero (T0), Toxicidade com Sacarose (TS), Toxicidade com Resveratrol (TR) e Toxicidade Sacarose mais Resveratrol, (TS+R) em exposição por 5 minutos..... 49
- Figura 3.** Representação esquemática do procedimento de vitrificação dos fragmentos ovarianos de novilhas pré-pubescentes e vacas adultas submetidos aos seguintes tratamentos: Vitrificação com Sacarose (VS), Vitrificação com Resveratrol (VR) e Vitrificação com Sacarose mais Resveratrol, (TS+R) em equilíbrio por 5 minutos..... 49
- Figura 4.** Representação esquemática demonstrando a remoção dos crioprotetores dos fragmentos de tecido ovariano de novilhas pré-pubescentes e vacas adultas submetidas a diferentes tratamentos de vitrificação em duas soluções de lavagens contendo: soluções base de vitrificação adicionadas de Sacarose; Resveratrol e Sacarose mais Resveratrol (1ª Lavagem) e Solução Básica de Vitrificação (2ª Lavagem) por 5 minutos em cada tratamento..... 50
- Figura 5.** Representação histológica coloração em HE de folículos primordial, primário e secundários morfológicamente normais (Círculo em traço) e degenerados (seta) envolvidos em fragmentos ovarianos de vacas adultas submetidos a vitrificação com ou sem resveratrol. (A, B) Controle; (C, D) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (G, H) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm..... 55
- Figura 6.** Representação histológica coloração em tricrômico de Mallory de folículos primordial e primário morfológicamente normais (Setas) envolvidos em fragmentos ovarianos de vacas adultas submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com

sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm..... 56

Figura 7. Representação histológica coloração em HE de folículos primordial, primário e secundário morfolologicamente normais (Círculo em traço) e degenerados (seta) envoltos em fragmentos ovarianos de novilhas pré-puberes submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm..... 57

Figura 8. Representação histológica coloração em tricrômico de Mallory de folículos primordial, primário e secundário morfolologicamente normais (setas) envoltos em fragmentos ovarianos de novilhas pré-puberes submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm..... 58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Classificação morfológica de folículos pré-antrais normal e degenerado de tecido ovariano de fêmeas bovinas Pré-puberes e adultos após diferentes tratamentos de vitrificação.....	52
Tabela 2. Comparação de médias (\pm DP) de folículos ovarianos pré-antrais normais de fêmeas bovinas adultas e novilhas Pré-puberes após serem submetidos a diferentes tratamentos: Controle (Co), toxicidade (T0, TS, TR, TS+R)	53
Tabela 3. Comparação de médias (\pm DP) de folículos ovarianos pré-antrais normais de fêmeas bovinas adultas e novilhas Pré-puberes após serem submetidos a diferentes tratamentos: Controle (Co) e vitrificação (VS, VR, VS+R).....	54
Tabela 4. Porcentual médio (\pm DP) de folículos morfológicamente normais das diferentes classes foliculares em ovários de Fêmeas bovinas pré-puberes.....	62

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE SIGLAS.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
 CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Caracterização Ovariana e Morfologia Folicula.....	18
2.2 Maturidade Reprodutiva de Novilhas.....	20
2.3 Criopreservação de Tecido Ovariano.....	21
2.3.1 Congelamento Lento.....	22
2.3.2 Vitriificação.....	22
2.4 Agentes Crioprotetores (ACP).....	23
2.5 Antioxidantes Naturais.....	24
2.6 Resveratrol.....	26
2.7 Técnicas de Análise e Tecido Ovariano Após a Vitriificação.....	28
2.7.1 Microscopia de Luz.....	28
2.7.2 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET).....	28
2.7.3 Fixadores.....	29
2.7.4 Corantes.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 OBJETIVOS.....	32
4.1 Geral.....	32
4.2 Específicos.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
 CAPÍTULO 2 – Aspectos morfológicos de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovarianos bovinos vitrificadas com Resveratrol	
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44

1	INTRODUÇÃO.....	46
2	METODOLOGIA.....	46
2.1	Local do Experimento e Considerações Éticas.....	46
2.2	Coleta de Ovários.....	47
2.3	Processamento das Amostras.....	47
2.4	Exposição.....	48
2.5	Vitrificação.....	49
2.6	Aquecimento.....	50
2.7	Análises Pós-Vitrificação.....	51
2.7.1	Micrósopia de Luz.....	51
2.8	Análise Estatística.....	51
3	RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO.....	52
4	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	62

CAPÍTULO I
- REVISÃO DE LITERATURA –

1 INTRODUÇÃO

A criobiologia tem revolucionado os estudos em reprodução animal pela possibilidade de ter aplicações clínicas na medicina reprodutiva e por permitir a preservação de material genético de animais de raças raras, em vias de extinção e de animais de interesse comercial (RÔLO, 2012). Entre as biotecnologias da reprodução animal, a criopreservação de gametas tem se tornado uma biotécnica bem estabelecida, embora ainda apresente alguns obstáculos a serem vencidos quando se tratando de oócitos, em comparação aos espermatozoides.

A criopreservação é uma biotécnica de grande impacto para a produção bovina, tanto para rebanhos comerciais, quanto para animais de alto valor zootécnico. Haja vista que a lucratividade dessa atividade depende em grande parte pela eficiência reprodutiva dos seus rebanhos, principalmente quando se tratando das fêmeas (LEITE et al., 2011).

Nessa ótica, dentre os métodos de escolha para preservar a fertilidade de fêmeas, a criopreservação do tecido ovariano tem se tornado um dos métodos mais utilizados (FAUSTINO et al., 2011). Assim o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que visam à recuperação e o crescimento *in vitro* de folículos são imprescindíveis para o restabelecimento fisiológico, e a preservação morfológica dos folículos ovarianos (ROCHA et al., 2018).

A criopreservação de tecido ovariano apresenta diversas vantagens em seu emprego. Dentre elas, podemos dar destaque à grande quantidade de oócitos inclusos em folículos ovarianos e ao fato dos folículos ovarianos pré-antrais apresentarem uma maior resistência aos danos causados pela criopreservação se comparados às demais classes de folículos ovarianos (SHAW, 2000). Os principais métodos de criopreservação são a congelação lenta e a vitrificação que diferem entre em si, principalmente, pela redução da temperatura e a concentração dos crioprotetores empregados (MONTE, 2015).

A congelação lenta é o método convencional de criopreservação. Neste, são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores e a curva de congelação é controlada por um congelador programável, havendo a desidratação da célula ou tecido durante a redução gradual da temperatura. No entanto, esta técnica possui como desvantagem a formação de cristais de gelo intracelulares (VAJTA; NAGY, 2006).

A vitrificação é um método que consiste em uma brusca redução da temperatura e substituição da água intracelular pelo crioprotetor, de forma a alcançar rapidamente o estado vítreo, transformando os fluídos do estado líquido diretamente para um sólido amorfo sem a formação de cristais de gelo intracelulares. Para que esta transição ocorra, é necessária a utilização de altas concentrações de agente crioprotetor (DALCIN; LUCCI, 2010; RODRIGUES et al., 2014).

Durante o processo de congelação, os oócitos sofrem alterações morfológicas e de viabilidade celular, através de crioinjúrias como formação de cristais de gelo e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que comprometem a qualidade do tecido (FAUSTINO et al., 2011). Na tentativa de minimizar danos morfológicos e a produção EROs provenientes do processo de criopreservação, estudos têm sugerido a adição de antioxidantes, como o resveratrol, em soluções de vitrificação/reaquecimento (GIARETTA et al., 2013; TAKEO, et al., 2014).

O êxito da técnica de criopreservação depende de inúmeros fatores, que envolve desde questões físicas como o volume do crioprotetor até a sua composição química. Ademais é essencial a adição de substâncias que configurem uma proteção tecidual e celular, quando estes forem expostos a temperaturas criogênicas, as quais são capazes de minimizar os efeitos nocivos das crioinjúrias às células, como a formação de cristais de gelo e/ou choque osmóticos (VAJTA et al., 1998).

Tendo em vista que novilhas pré-puberes, são animais que ainda não entraram em sua atividade cíclica e apresentam grande potencial reprodutivo, uma vez que possuem uma quantidade significativa de folículos primordiais em seus ovários (DAY; ANDERSON, 1998). Faz-se necessário mais pesquisas de criopreservação de tecido ovariano nesta categoria de fêmeas bovinas, permitindo futuramente uma maior exploração do potencial reprodutivo destas. Estudos poderão permitir a elucidação de alguns aspectos da fisiologia ovariana, tais como a atividade folicular e oocitária em animais pré-puberes, contribuindo para aprimorar através de protocolos a biotécnica de vitrificação de tecido ovariano em vacas.

A partir do conhecimento dos danos promovidos nas células e tecidos pelos processos de criopreservação, este estudo foi desenvolvido com base na hipótese de que a adição do resveratrol aos meios de vitrificação atue como um antioxidante e crioprotetor sobre folículos pré-antrais inclusos em tecido ovarianos de novilhas pré-puberes e adultas, mantendo a integridade de membrana plasmática dos folículos, permitindo sua preservação morfológica e a viabilidade celular mesmo após reaquecimento. No entanto, os mecanismos de ação envolvidos não estão totalmente compreendidos.

O resveratrol é um polifenol produzido naturalmente por plantas, que tem apresentado grande destaque por apresentar efeitos benéficos a saúde humana frente a doenças crônicas. Por esse motivo, seus efeitos antiinflamatórios e antioxidativo tem sido estudado expressivamente, e ainda sua atuação nos processos de criopreservação celular (GAMBINI et al., 2015). Porém não há relatos da sua utilização na vitrificação de tecidos ovarianos de novilhas pré-puberes e vacas adultas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização Ovariana e Morfologia Folicular

O ovário é o órgão primário em fêmea, e desempenha duas importantes funções, exócrina na produção dos gametas femininos os oócitos, e endócrina na produção e liberação de hormônios sexuais (E2, P4) e peptídeos (FIGUEREDO et al., 1999). É formado por duas regiões a medular e cortical, onde a região medular é composta por nervos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos, e a região cortical composta por as células germinativas os oócitos inclusos nos folículos ovarianos (Figura 1) (KARLSON et al., 1982).

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário constituído por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais), desempenham funções fundamentais na manutenção da viabilidade oocitária, proporcionando um ambiente ideal assegurando a manutenção da viabilidade, crescimento e a maturação de oócitos imaturos até a liberação dos mesmos pelo processo de ovulação (FIGUEREDO et al., 1999).

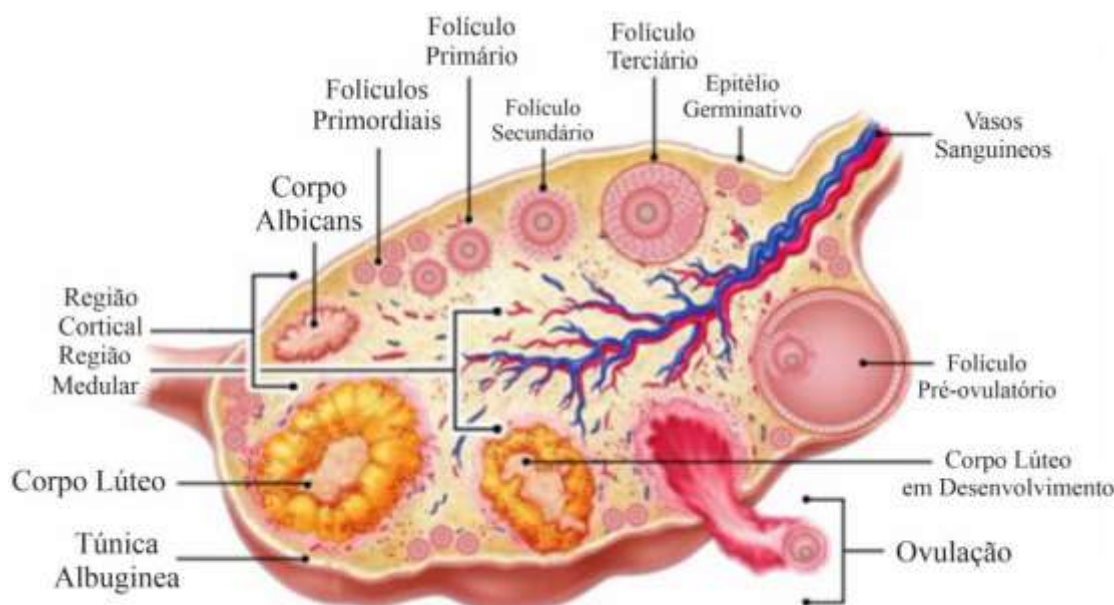


Figura 1: Organização do ovário de mamíferos, ilustrando suas principais estruturas. **Fonte:** (LIMA, 2012).

A população folicular ovariana é bastante diversificada, localizada no córtex do ovário e são classificados de acordo com o grau de evolução, em folículos pré-antrais ou não cavitários (primordial, primário e secundário) e folículos antrais ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios).

O quais os folículos pré-antrais representam em torno de 90 a 95% de toda a população folicular, dotados então da grande maioria dos oócitos (GONÇALVES, et al., 2001).

A formação dos gametas femininos e dos folículos ovarianos é iniciada ainda no período pré-natal (ADONA, et al., 2013). Em mamíferos, o desenvolvimento ovariano inicia-se com as células germinativas primordiais, oriundas do saco vitelínico. Estas migram até a gônada embrionária, a célula germinativa primordial coloniza a gônada primitiva e inicia o processo de gametogênese (LIMA, 2006).

A gametogênese corresponde a dois processos lentos e distintos que ocorrem simultaneamente no interior dos ovários: a oogenese e a foliculogênese (FIGUERESO et al., 1999). A oogenese é um conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) das fêmeas, até a formação do oócito haploide fecundado (RUSSE, 1983). A foliculogênese é processo de formação, crescimento e maturação folicular, que inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981).

Nas diferentes espécies domésticas, os números de oócitos ao nascer variam, sendo que os suínos nascem com 67.599 a 291.898 (ALVES et al., 2012), ovinos nascem com 7.333 a 446.333 (AMORIM et al., 2000), 5.6000 a 75.000 em equinos (ALVES et al., 2015), 2.700 a 79*.600 em humanos (GOUGEON; CHAINY, 1987), e em bovinos *Bos taurus indicus* 8.010 a 94.301 e *Bos taurus taurus* 10.043 a 253.453 (SILVA-SANTOS et al., 2011). Todavia a maior parte dos folículos ovarianos não chega a ovular e se degeneram por um processo chamado de atresia folicular, e cerca de 99,9% destes são perdidos no meio do processo (GONÇALVÉS et al., 2001), havendo um declínio considerável no número de oócito ao longo dos estágios de vida da fêmea.

Dada a essa gama de oócitos perdidos, faz-se necessário a utilização de técnicas que visem maximizar o potencial reprodutivo dessas fêmeas. Estudos relacionados à biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) tem contribuído bastante para redução dessas perdas como os trabalhos desenvolvidos em bovinos (LUNA et al., 2011; TRIANA, 2012; JIMENEZ et al., 2016; ROCHA et al., 2018), cadelas (RÔLO, 2012), gatos (LIMA et al., 2006). Desse modo, a criopreservação do tecido ovariano poderá manter a viabilidade folicular até que seja realizado o cultivo *in vitro* ou transplante do ovário, pois permite a manutenção da integridade estrutural tanto das células somáticas como das células germinativas (FAUSTINO et al., 2011).

2.2 Maturidade Reprodutiva de Novilhas

A maturidade reprodutiva de novilhas possui importante impacto na eficiência reprodutiva e econômica de fêmeas bovinas, determinada pela puberdade e idade ao primeiro parto, e conseqüentemente ao número de bezerros produzidos por essas fêmeas (FREITAS, 2015).

Com relação ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, a maturidade sexual é determinada pela queda do estradiol fazendo *feedback negativo* sobre a secreção de GnRH, desencadeando um aumento significativo na secreção de hormônio luteinizante (LH), resultando na completa ativação do eixo gonadotrófico e validando a capacidade reprodutiva com a primeira ovulação. Assim, o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva de novilhas é importante, determinando os estágios de pré-puberdade e puberdade, o mais cedo possível dentro do manejo reprodutivo, a fim de melhor explorar o potencial dessa fêmea (FREITAS, 2015).

Segundo Day e Anderson (1998), o período que corresponde aos 40-60 dias anteriores à primeira ovulação, onde a maioria dos eventos relacionados ao eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ocorrem é denominado como período peripúbere, que é iniciada entre 10-12 meses em fêmeas *Bos taurus*. O desenvolvimento do trato reprodutivo entre o nascimento e a maturidade sexual em novilhas pode ser dividido em quatro fases: 1ª) Período infantil corresponde do nascimento até aos dois meses de idade; 2ª) Período de desenvolvimento corresponde de dois a seis meses de idade, período em que ocorre aumento da secreção de GnRH hipotalâmico, levando a um aumento da secreção de LH; 3ª) Fase estática corresponde de seis a 10 meses de idade, o eixo hipotalâmico-hipofisário apresenta-se competente, mais ainda não produzem níveis de LH suficientes; 4ª) Momento peripúbere ente 10-12 meses ocorre o declínio da inibição estrogênica e aumento da secreção de LH, levando ao primeiro pico de LH e conseqüentemente da ovulação, determinando a maturidade sexual período em torno aos 24 meses de idade.

Novilhas pré-puberes são animais que ainda não entraram em sua atividade cíclica, no entanto apresentam grande potencial reprodutivo, por apresentarem uma quantidade significativa de folículos primordiais em seus ovários, fazendo necessário uso de biotécnicas que explorem esse potencial (DAY; ANDERSON, 1998). A criopreservação de tecido ovariano é uma excelente ferramenta a ser utilizada com o intuito de melhor exploração do potencial reprodutivo de fêmeas bovinas, haja vista que boa parte do rebanho nacional não é altamente produtivo, a pecuária de corte brasileira por exemplo apresenta baixa eficiência reprodutiva e ocupa apenas o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne (FAOSTAT, 2014).

2.3 Criopreservação de Tecido Ovariano

A criopreservação é uma biotécnica que têm como princípio básico manter através de baixas temperaturas, o metabolismo celular em estado de quiescência, retardando a atividade enzimática e o metabolismo de respiração celular, permitindo o armazenamento e a preservação de materiais biológicos por períodos indeterminados, em nitrogênio líquido (-196°C) (GORRICHIO, 2018).

Um dos princípios mais importantes da criopreservação consiste na remoção do máximo possível de água das células, com o intuito de prevenir a formação de cristais de gelo e danos celulares, ainda que essa retirada de água possa promover alguns danos (VAJTA; NAGY, 2006).

Nesse sentido, independente do método de criopreservação utilizado, há a necessidade do uso de solutos chamados de agentes crioprotetores, que consistem em moléculas com função protetora. Estas substâncias reduzem o ponto de solidificação da solução em 2 a 3°C, o que é benéfico para célula ou tecido por aumentar o tempo de desidratação, diminuindo a formação de cristais de gelo (SEIDEL et al., 1989).

O êxito da técnica de criopreservação depende de inúmeros fatores, que envolve desde questões físicas como o volume do crioprotetor até a sua composição química. Ademais é essencial a adição de substâncias que configure uma proteção tecidual e celular, quando estes forem expostos a temperaturas criogênicas (VAJTA et al., 1998).

A criopreservação de folículos ovarianos pode ser realizada de três formas: inseridos no ovário inteiro, inseridos apenas no tecido ovariano cortical ou na forma de folículos isolados, os quais apresentam diferentes resultados em relação à viabilidade folicular (SANTOS et al., 2010). A criopreservação em tecido ovariano permite a preservação de oócitos presente nos folículos ovarianos que seriam perdidos pelo processo natural de atresia, ou mesmo pelos tratamentos gonadotóxicos em mulheres submetidos a rádio e/ou quimioterapia, pela morte natural ou acidental de animais ameaçados de extinção ou de alto valor genético (RODRIGUES et al., 2016).

Os principais métodos de criopreservação são a congelação lenta e a vitrificação, que diferem entre si, pelos seus princípios de congelamento e ferramentas utilizadas. A congelação lenta consiste em um balanço osmótico em uma máquina de congelação programável. Já a vitrificação consiste em uma brusca retirada de água intracelular pelo crioprotetor, alcançando rapidamente o estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo (MONTE, 2015).

2.3.1 Congelamento Lento

Este é um método convencional de criopreservação e tem sido utilizada em larga escala para a conservação de tecido ovariano em diferentes espécies domésticas como cães (ROLÔ, 2012), caprinos (RODRIGUES et al., 2014), ovinos (SANTOS et al., 2006), bovinos (CELESTINO et al., 2008) e humanos (RODRIGUES, et al., 2016).

Nesse processo de criopreservação, são utilizadas baixas concentrações de agente crioprotetor e a curva de congelação é controlada por um congelador programável. Esse método tem como base tentar criar um balanço entre os fatores responsáveis pela formação dos cristais de gelo, como fratura, estresse osmótico e a toxicidade do meio, fazendo com que o meio intra e extracelular troque os solutos sem promover deformidades celulares (VAJTA; NAGY, 2006).

O material biológico a ser congelado é resfriado lentamente, adicionada ao congelador programável previamente estabelecido á temperaturas de -6°C , seguindo de cristalização manual (*seeding*) com intuito de pré-resfriamento em nitrogênio líquido, seguindo de resfriamento lento de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Até -32°C , onde o material é imerso e estocado em nitrogênio líquido á -196°C (ROCHA, 2017).

No decorrer do processo, a desidratação celular promovida ajuda a prevenir a formação de cristais de gelo intracelular ou mesmo reduzir os danos desencadeados por eles, mantendo o citoplasma resfriado até o congelamento total da célula e tecido (ROCHA, 2017), sob crescentes concentrações de crioprotetores, por um período variando de 5 a 60 minutos (CASTRO et al., 2011).

Segundo Monte (2015) quanto ao descongelamento de embriões, estes devem ser aquecidos rapidamente, impedindo a formação de cristais. Após a descongelação, os embriões são submetidos a banhos em soluções de lavagem em concentrações decrescentes de crioprotetores intracelulares, para remoção dos mesmos.

2.3.2 Vitrificação

Tem se destacado como um método de escolha para criopreservação de tecido ovariano, por permitir menores danos celulares em comparação ao congelamento lento, (ROCHA et al., 2018), por ser uma alternativa prática de criopreservação para a reprodução de animais de produção (TRIANA, 2012).

Esta técnica consiste na utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores, há uma brusca redução da temperatura, promovida pela imersão direta em nitrogênio líquido, o que a torna uma técnica de alta praticidade e menos oneroso (ALI; SHELTON,1993). Em virtude da queda abrupta da temperatura, promove a passagem direta do meio de um estado líquido para um estado

amorfo, sem a formação de cristais de gelo (GONÇALVES et al., 2008). Entretanto, expõe as células a altas concentrações de crioprotetores, que podem levar a lesões nas células por choques osmóticos ou efeitos tóxicos (LUNA et al., 2011; ROCHA et al., 2018).

Diversas técnicas de vitrificação têm sido pesquisadas com o intuito de evitar as crioinjúrias, reduzindo a quantidade de solução de vitrificação, diminuindo o tempo de redução da temperatura, e consequentemente reduzindo os danos celulares, porém ambos proporcionam contato direto com o crioprotetor, que pode resultar na intoxicação (ZHO et al., 2010). A vitrificação pode ser realizada por meio de inúmeros métodos, os quais englobam aqueles que permitem ou não contato direto da célula ou tecido com o Nitrogênio líquido (CARVALHO et al., 2011).

Nesse sentido diversos métodos de vitrificação foram desenvolvidos, tais como: técnica de *cryoloop* que utiliza uma alça de metal presa a um aro de nylon preenchido com solução de vitrificação e este é armazenado dentro de criotubos; vitrificação em espátula onde o tecido fica em gota de solução de vitrificação sob uma extremidade plana; método de superfície sólida de vitrificação, em que o tecido e a solução de vitrificação fica sobre um superfícies de metal pré-resfriada, em cima do nitrogênio líquido e posterior emergida no mesmo em criotubos; técnica de vitrificação convencional que utilizam palhetas francesas, onde são preenchidas com a solução de vitrificação e o tecido a ser vitrificado (CARVALHO et al., 2011); e vitrificação por cobertura direta, que consiste no tecido dentro de um criotubos ou macrotubo e recoberto pelo nitrogênio líquido, que se caracteriza por apresentar brusca redução da temperatura em relação as demais técnicas (ZHO et al., 2010; ROCHA, 2017).

2.4 Agentes Crioprotetores (ACP)

Independentemente do método de criopreservação utilizado, há a necessidade do uso de solutos chamados de agentes crioprotetores, que consistem em moléculas com função protetora. Estas substâncias reduzem o ponto de solidificação da solução em 2 a 3°C, o que é benéfico para célula ou tecido por aumentar o tempo de desidratação, diminuindo a formação de cristais de gelo durante o processo de criopreservação (SEIDEL et al., 1989).

Os agentes crioprotetores são introduzidos com o intuito de aumentar a viscosidade da solução, buscando um maior equilíbrio osmótico entre as soluções e a célula, evitando danos celulares com a formação de cristais de gelo e estresse osmótico. Estas substâncias podem ser divididas em agentes crioprotetores intracelulares ou penetrantes e agentes crioprotetores extracelulares ou não penetrantes (DALCIN; LUCCI, 2010).

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de permear a membrana celular e substituir parcialmente a água presente em seu interior, através da formação de pontes de hidrogênio com moléculas de água livre, reduzindo a temperatura de congelação, impedindo a formação de cristais intracelulares que podem vir a danificar sua estrutura (DALCIN; LUCCI, 2010).

Entre os crioprotetores intracelulares destacam-se o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (EG) e propanodiol por apresentarem uma capacidade de penetração superior ao do glicerol e baixa toxicidade (CASTRO et al., 2011; JARK et al., 2016).

Igualmente necessário, há os crioprotetores extracelulares, que são moléculas grandes, de alto peso molecular, que atuam interagindo com moléculas de água livre da solução influenciando a desidratação celular por efeitos osmótico, e desempenham o papel de remover inicialmente a água intracelular (VAJTA; NGY, 2006).

Os agentes crioprotetores extracelulares são os açúcares como sacarose, glicose, galactose, trealose, estes recobrem a superfície da célula e estabilizam sua membrana, protegendo-a dos danos causados pelo congelamento (GONÇALVES et al., 2001). A sacarose é o crioprotetor mais utilizado por exercer um efeito osmótico significativo, por isso tem sido amplamente utilizado nos processos de criopreservação e descongelamento de embriões (MONTE, 2015).

As duas categorias de agentes crioprotetores podem ser utilizadas em associação ou separadas em diversos protocolos de criopreservação. No entanto, alguns problemas na ação dos crioprotetores são relatados, em decorrência principalmente do seu potencial tóxico que estas substâncias apresentam, que limitam as concentrações a serem utilizadas, reduzindo sua eficácia (AGUIAR, 2015). Ademais, os metabólitos resultantes da degradação dos crioprotetores pelas células também podem ser tóxicos para as mesmas, sendo este outro fator importante a ser considerado no processo de criopreservação (CASTRO et al., 2011).

2.5 Antioxidantes Naturais

Devido à crescente atenção dada aos estudos de doenças degenerativas como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, dentre outras, estudos têm se concentrado em encontrar antioxidantes naturais, que venham a ajudar no tratamento de tais patologias. Dentre os antioxidantes naturais mais estudados, o resveratrol têm sido explorado com profundidade nos últimos anos (GAMMBINI et al., 2015).

Os antioxidantes são frequentemente adicionados aos alimentos para evitar as reações em cadeia de radicais da oxidação. Eles atuam inibindo a etapa de iniciação e propagação do processo de oxidação levando ao término da reação (GÜLÇİN, 2010).

Os antioxidantes podem atuar na célula por intermédio de sistema enzimático e não enzimático. (1) enzimáticos são os primeiros sistemas a agir nas espécies reativas de oxigênio (EROs) (AGARWAL et al., 2005). Este sistema é composto por superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GSH-Rd), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) (RIBEIRO et al., 2005). (2) sistema não enzimático inclui compostos hidrofílicos e lipofílicos, como ácido ascórbico, α -tocoferol, zinco, selênio, carotenoides e resveratrol que reduzem reações em cadeia e as lesões induzidas pelas EROs (RUDER et al., 2008).

Oócitos e embriões no sistema de cultivo *in vitro* são vulneráveis ao estresse oxidativo. Assim, muitos estudos visam reduzir o estresse oxidativo durante essa biotécnica, através de tratamentos com substâncias antioxidantes, com o objetivo de elucidar características reprodutivas e celulares relacionadas a maturação de oócitos e desenvolvimento de embriões. Nesse sentido, a determinação dos níveis de Glutathione (GSH) intracelular e de EROs tem sido utilizada como indicador para avaliar a maturidade citoplasmática de oócitos de mamíferos (KWAK; HYM, 2012).

A GSH intracelular tem sido indicada como um marcador molecular da maturidade oocitária em suínos. No entanto, baixas concentrações de GSH intracelular está associada a uma menor competência do desenvolvimento de oócitos em suínos (BRAD et al., 2003). Em bovinos, a GSH intracelular também tem sido associado a aumento da tolerância a criopreservação (EDWARDS et al., 2001).

O alto nível de EROs pode danificar as membranas celulares, DNA, transcrição de RNA, síntese de proteínas e ainda desempenhar papel no apoptose celular. Estes efeitos danosos das EROs sobre as células são supostos causadores de defeitos durante a maturação embrionária e consequentemente morte precoce (KWAK; HYM, 2012).

Nessa lógica, altas concentrações intracelulares de GSH e baixas níveis de EROs em oócitos e embriões maturados *in vitro* podem melhorar a viabilidade destes e contribuindo para essas biotécnicas.

Como forma de melhorar a competência oocitária e embrionária em processos de criopreservação, lança-se mão do uso de substâncias com ação antioxidantes, as quais são substâncias capazes de converter as EROs em moléculas de água, com o intuito de prevenção da superoxidação (LUZ et al., 2011).

2.6 Resveratrol

O resveratrol é um polifenol natural sintetizado por plantas. É uma fitoalexina ativada sob condições de estresse, como radiação ultravioleta e infecção por fungos, configurando sua capacidade de inibir o progresso de certas infecções, por ação protetora contra agressões nessas plantas. É naturalmente encontrada em cascas de frutos como amendoim, uva e amoras (GÜLÇİN, 2010; GAMBINI et al., 2015).

Os polifenóis representam um vasto grupo de compostos com anel aromático, caracterizado pela presença de um ou mais grupos hidroxila com várias estruturas complexas. O resveratrol apresenta vários efeitos benéficos à saúde humana, atuando contra doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, diabetes, além de exibir ação anti-inflamatória e estar envolvida em processos de envelhecimento celular (VOLOSHYNA et al., 2012).

Esse composto natural apresenta duas formas químicas de isômeros a trans-resveratrol (trans-3, 5, 4' trihidroxiestibeno) e cis-resveratrol (cis-3, 5, 4'trihidroxiestibeno) (Figura 2) (SAUTHER et al., 2005), a forma isomérica trans-resveratrol é a forma mais predominante e estável, a qual é convertida na presença de luz em cis-resveratrol. Estes compostos são capazes de penetrar passivamente as membranas celulares ou de interagir com os receptores de membranas (FILIP et al., 2003; GULCIN, 2010; GAMBINI, et al., 2015).

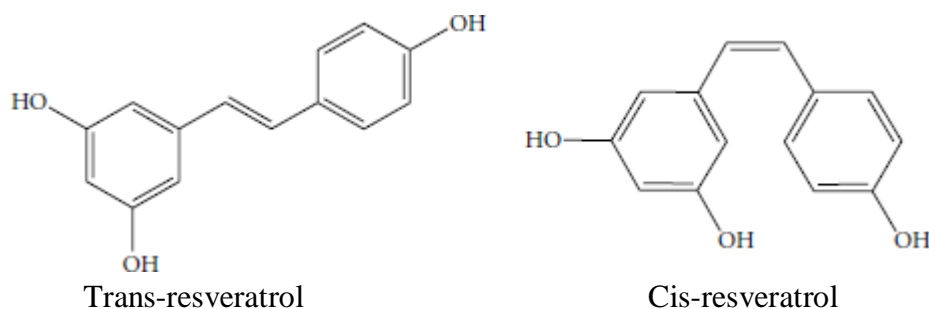


Figura 2. Estruturas químicas de trans-resveratrol e cis-resveratrol.

Fonte: GAMBINI et al., 2015.

O resveratrol atua no controle de espécies reativas de oxigênio por ação direta e pela indução na expressão de genes antioxidante, se destacando por ativar vias relacionadas à ativação mitocondrial a partir do gene SIRT-1, gene dependente de NAD^+ , um dos principais reguladores da biogênese mitocondrial (WANG et al., 2013), que podem estar presentes nas células da granulosa, oócitos e blastocistos em ovários humanos. Mas seu papel fisiológico no ovário ainda não está totalmente elucidado (MORITA et al., 2012), reforçando uma relação do resveratrol na

síntese de GSH, acredita-se que o antioxidante natural auxilia no aumento das suas concentrações intracelulares em oócitos (SILVA, 2015).

Em decorrência das suas características físicas e químicas o resveratrol possui a capacidade de atravessar as membranas celulares passivamente, interagindo com receptores de membrana, configurando sua ação direta como antioxidante. Desta forma pode interagir com moléculas extracelular e intracelulares, assim o mecanismo de ação pode ser desencadeado quer ativando vias de sinalização ao ligar a célula receptora de membrana, ativando mecanismos intracelulares ou mesmo desenvolvendo seus efeitos dentro do núcleo (GAMMBINI, et al., 2015).

No campo da reprodução, Gammbini et al. (2015) relataram que o resveratrol demonstra propriedades fitoestrogênicas. Ele é capaz de ligar-se aos receptores alfa e beta estrogênio (ER- α e ER- β) com afinidades semelhantes, por apresentar estrutura química semelhante ao 17- β - estradiol, modulando talvez a produção de hormônios reprodutivos.

O resveratrol na maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos suínos tem demonstrado efeitos benéficos, na concentração de 2 μ M reduziu os níveis de EROs e aumentou a concentração de GSH em oócitos maduros (KWAK et al., 2012). Em ovinos o resveratrol foi associado ao aumento da motilidade dos espermatozóides e reduzir defeitos acrossomais promovidos durante os processos de criopreservação (SARLOS., 2002).

Em bovinos, nas concentrações de 20 a 40 μ M na MIV reduziu significativamente a porcentagem de oócitos que atingiram estágios avançados na maturação (PARK et al., 2012). Foi relatado por Kwak; Hym (2012) que as concentrações altas de resveratrol (> 25 μ M) no meio de cultivo promoveram efeitos tóxicos para embriões bovinos em desenvolvimento. Portanto altas concentrações superiores a 10 μ M do resveratrol tem efeito prejudicial a oócitos bovinos.

No entanto, Kwak; Hym (2012) relataram que a suplementação de resveratrol na MIV e na criopreservação de sêmen é vantajoso, reduzindo níveis de EROs e aumentando as concentrações de GSH. Já em bovinos, foram observados efeitos positivos contra degeneração folicular durante processos de vitrificação (ROCHA et al., 2018).

2.7 Técnicas de Análise de Tecido Ovariano Após a Vitrificação

2.7.1 Microscopia de Luz

É uma técnica que permite a caracterização do ovário pela avaliação da morfologia citoplasmática e nuclear, incluindo todas estruturas foliculares, células da granulosa, teca e oócito, bem como o estroma do ovário (LUZ et al., 2016).

Considerada uma técnica de baixo custo, pouca demanda de infraestrutura, facilidade e rapidez na execução e padronização nas repetições fez com que a histologia seja uma das técnicas mais utilizadas na caracterização morfológica dos ovários e suas estruturas (LUZ et al., 2016). Permite classificar os folículos através da mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, além de analisar a integridade morfológica dos oócitos e das células da granulosa (MATOS et al., 2007).

No que diz respeito à avaliação pós-vitrificação, imediatamente depois do reaquecimento é pouco precisa, pois algumas alterações das organelas podem vir a se manifestar apenas algumas horas depois do descongelamento. No entanto, permite identificar sinais avançados de atresia, como picnose nuclear, danos citoplasmáticos como retração citoplasmática, ruptura das células da granulosa e danos a membrana basal (FAUSTINO et al., 2011). Porém, a mesma não permite a avaliação da integridade de organelas citoplasmática (MATOS et al., 2007).

2.7.2 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) funciona como um microscópio de fotônico, de luz. O seu emprego é extremamente difundido em estudos com materiais biológicos, por permitir uma boa definição de imagens intracelulares, avaliando de forma mais clara a morfologia celular e aspectos gerais de organelas (GROSS, et al., 2014).

A microscopia eletrônica é uma técnica utilizada para avaliar organelas celulares e das mudanças ultraestruturais, que podem vir a aparecer durante os processos de degeneração celular, como atresia folicular, ocorridas pelos processos de criopreservação e reaquecimento, se mostrando um método mais eficiente do que a microscopia de luz (MATOS et al., 2007).

A MET é eficiente em avaliar os folículos ovarianos logo após o processo de descongelamento do tecido ovariano, por detectar alterações súbitas nas organelas, como o aumento de volume das mitocôndrias (GORDEN, 2000).

Segundo Eppig, (1977), avaliações consideradas morfológicamente normais em microscopia de luz em folículos de camundongos pós-cultivo *in vitro*, foram avaliadas em microscopia eletrônica de transmissão e apresentaram sinais de degeneração citoplasmática no oócito e nas células da granulosa. Matos et al. (2007) utilizaram a técnica de MET para confirmar a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais caprinos após sete dias de cultivo *in vitro*.

2.7.3 Fixadores

No que se refere à rotina de avaliação histológica do ovário, os fixadores mais adequados, para que se obtenha uma boa observação morfológica do tecido ovariano e de suas células ainda não foram totalmente estabelecidos. (SANTOS et al., 2012).

Dentre os principais objetivos da fixação, estão a inibição da autólise tecidual, preservação dos vários componentes celulares e tissulares, e ainda melhorar a diferenciação óptica dos tecidos, e não menos importante facilitando posteriormente a coloração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Para uma boa conduta de fixação alguns fatores devem ser considerados em relação aos diferentes fixadores que podem ser utilizados, como a velocidade de penetração nos diferentes tecidos, características físico-químicas da molécula do fixador, concentração, temperatura de fixação e a textura do órgão a ser fixado. O formaldeído por exemplo penetra de 5 a 10 vezes mais rapidamente de qualquer um dos outros fixadores (GROSS, 2014).

Segundo Santos et al. (2012), o correto processamento e fixação do tecido é muito importante a fim de evitar erros de interpretação quando forem realizadas as avaliações do tecido ovariano, como por exemplo considerar como degeneração folicular devido ao processo fisiológico de atresia folicular um ovário que apresente sinais de degeneração promovidos devido à má fixação do tecido.

Diversos fixadores têm sido empregados na preservação de tecidos, como acetona, metanol, Bouin, formalina a 10%, periodatolisina, paraformaldeído, glutaraldeído, acetona-metil, benzoato exileno e EDTA. Para microscopia de luz a formalina 10% é o fixador mais utilizado, e para microscopia eletrônica o mais utilizado é o glutaraldeído em solução de 2 a 6 % (BAUMGARTNER et al., 1988; FOX et al., 1985)

Dentre os fixadores demonstrados, para protocolos de histologia de tecido ovarino, foi relatado bons resultados na conservação da morfologia folicular o uso de paraformaldeído a 4% (SILVA et al., 2004). No entanto, Santos et al. (2012) demonstraram resultados significativos frente a fixação de folículos pré-antrais bovinos através dos fixadores Carnoy e Bouin, considerando-os potenciais fixadores em conservação morfológica de folículos pré-antrais em ovários bovinos por 24 horas.

2.7.4. Corantes

Os corantes mais comumente utilizados nas colorações para histologia ovariana e oocitária são hematoxilina e a eosina, por ser considerada coloração universal em histologia. A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células e outras estruturas ácidas como porções

do citoplasma ricas em RNA. Já a eosina, cora citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tricrômico de Malloy é o método de coloração referência para a visualização do tecido conjuntivo em secções histológicas, possibilitando em particular a observação de colágeno, retículo, cartilagem, ossos e amiloides. Esta técnica emprega fucsina ácida, azul anilina e laranja G, corando em azul a fibra de colágeno, matriz extracelular e ossos; já citoplasma, núcleos e músculo coram em diferentes tons de vermelho, e fibras elásticas e glóbulos vermelhos são corados em amarelo (ELSIVIER ESPAÑA, 2014).

4 JUSTIFICATIVA

A partir do que foi exposto na revisão de literatura sobre os danos promovidos a células e tecidos germinativos pelos processos de criopreservação, admite-se hipoteticamente que o resveratol seja um antioxidante que atue nos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovarianos de novilhas pré-puberes e adultas, desempenhando além do seu efeito antioxidativo, ação como agente crioprotetor mantendo a integridade de membrana plasmática dos folículos pré-antrais permitindo a preservação morfológica e a viabilidade celular após reaquecimento.

O resveratol é um antioxidante de grande aplicabilidade nos processos de criopreservação celular, possui ação intracelular e extracelular. No entanto não há relatos ainda da sua utilização na vitrificação de tecidos ovarianos de novilhas pré-puberes como um potencial agente crioprotetor.

Tendo em vista que as novilhas pré-puberes são animais que ainda não entraram em sua atividade cíclica e apresentam um grande potencial reprodutivo por possuírem uma maior quantidade de folículos primordiais em seus ovários, faz-se necessário o uso de técnicas que venham permitir a exploração do potencial reprodutivo destas fêmeas, tais como a vitrificação.

Ainda, o estudo nessa faixa etária é importante em auxiliar na elucidação de características fisiológicas acerca dos oócitos dessa espécie, a fim de padronizar protocolos de soluções crioprotetoras eficientes, a serem utilizadas nos procedimentos de vitrificação em vacas adultas, que comercialmente tem em maior número, além de possuírem maiores dificuldades em relação a criopreservação dos seus gametas.

Nesse sentido, com base nas hipóteses, acredita-se que o resveratol seja um antioxidante que atue nos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovarianos de novilhas pré-puberes e adultas, desempenhando seu efeito antioxidante e crioprotetor sobre a preservação morfológica e a viabilidade celular.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Analisar o efeito da associação do antioxidante resveratrol a sacarose na vitrificação de tecido ovariano de novilhas pré-puberes e vacas adultas sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais.

5.2 Específico

Analisar a associação ou não do resveratrol a sacarose na vitrificação/reaquecimento de tecido ovariano de novilhas pré-puberes e vacas adultas, por meio de avaliação por microscopia de luz e transmissão.

Analisar a morfologia de folículos pré-antrais de fêmeas bovina pré-puberes e adultas frente a vitrificação/reaquecimento através da avaliação por microscopia de luz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, Paulo Roberto et al. Oogenesis and Folliculogenesis in Mammals. **Journal of Health Sciences**. v.15, n.3, p.245-250. 2013. doi: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2013v15n3p%25p>

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 11, n. 5, p. 641- 650, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409717>>. Acesso em: 23 de maio.2018.

AGUIAR, E. M. Uso de etilenoglicol monometiléter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1042484/1/LigiaTeseElisangelaMadeiraFinal.pdf>> Acesso em: 29 de fev.2020.

ALVES, K.A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology** v.83, n.6, p.1048-1055, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628263>>. Acesso em: 23 de maio.2018.

ALVES, B. G.; ALVES, K.A.; ARAÚJO, V.R.; BELETTI, M. E GAMBARINI, M.I.; JACOMINI, J. O. Quantitative and morphological study of preantral follicles from prepubertal gilts. **Acta Science Veterinary**. v.40, n.7, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/234003552_Quantitative_and_Morphological_Study_of_Preantral_Follicles_From_Prepubertal_Gilts> Acesso em: 13 de maio de maio. 2018.

AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; MARTINI, A.; GONÇALVES, P. B. D. Quantitative and qualitative analysis of the efficiency of the mechanical method for the isolation of preantral Follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v. 53, p. 1251-126, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X00002697>> Acesso em: 21 de maio.2018.

BRAD, A. M.; BORMANN, C. L.; SWAIN, J. E.; DURKIN, R. E.; JOHNSON, A. E.; CLIFFORD, A. L.; KRISHER R. L. Glutathione and adenosine triphosphate content of *in vivo* and *in vitro* matured porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v.64, p.492-498. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrd.10254>> Acesso em: 03 de fev.2020.

BORRÁS, C.; GAMBINI, J.; GOMEZ-CABRERA M. C.; SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; MANN, G. E.; VINÁ, J. 17 β -oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NF κ B cascade. **Aging Cell**. v. 4, p.113–118, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1474-9726.2005.00151.x>> Acesso em: 20 de maio.2018.

BAUMGARTNER, W.; DETTINGER, H.; SCHNEER, N.; HOFFMEISTER, E. Evaluation of different fixatives and treatments for immunohistochemical demonstration of *Coxiella burnetti* in paraffin-embedded tissues. **Journal of Clinical Microbiology**. v.26, n.10, p.2044-2047, 1988. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/26/10/2044.short>>. Acesso em: 18 de jan. 2020.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C M.; CASTRO, S V.; LOPES, C. A.; SANTOS, R. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Novel widecapacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**. v.138, n. (3-4), p. 220-7, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432013000766>> Acesso em: 15 de jun.2018.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, A. P R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2321/0>> Acesso em: 12 jun.2018.

CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/2890/289022024002/> Acesso em: 19 jun. 2018.

DAY, M. L., ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cathe. **Jornal of Animal Science**, v.72, n.sup.3, p.1-15, 1998. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/76/suppl_3/1/4643315> Acesso em: 15 de jan.2019.

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, p.149-159, 2010. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20 pag149-159.pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20pag149-159.pdf)> Acesso em: 19 de jun.2018.

EDWARDS, J. L.; KING, W. A.; KAWARSKY, S. J.; EALY, A. D. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. **Theriogenology**. v.55, p.209-223.2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X00004556>> Acesso em: 04 de fev.2020.

ELSIVIER ESPAÑA, S. L. Histologia da Prática Médica. In: **Técnicas histológicas**. 2014. Disponível em: <http://www.heortiz.net/uvn-estructurayfuncion/Clase_6-18_de_Septiembre-Tecnica_histologica.pdf> Acesso em: 21 de jan.2020.

EPPIG, J. J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. **Developmental biology**. v.60, p.371-388, 1977. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/001216067790135X>> Acesso em: 05 de mar.2020.

FAUSTINO, Luciana Rocha et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.35, n.1, p.3-15, 2011. Disponível em: <<https://cbra.websiteseuro.com/pages/publicacoes/rbra/v35n1/pag3-15.pdf>> Acesso em: 12 jun. 2018.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**. v.9, n., p. 11-25, 1999. Disponível em: <<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo2.1999.1.pdf>> Acesso em: 19 jun. 2018.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31, n.2, p.143- 152, 2007. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/143.pdf>> Acesso em: 15 de jun.2018.

FOX, C. H.; JOHNSON, F. B.; WHITING, J.; ROLLER, P. P. Formaldehyde fixation. **Journal of histochemistry & Cytochemistry**, v. 33, n.8, p.845, 1985). Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/37.1.2491754>> Acesso em: 14 de jan.2020.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. Production/live animals. New York: FAOSTAT, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em 07 de abril de 2020.

FREITAS, Bruno Gonzalez de. Influência do Desenvolvimento Corporal na Resposta aos Programas de sincronização para Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Novilhas Nelore de 14 Meses de Idade. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, São Paulo,

2015. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10131/tde-13112015-143122/en.php>> Acesso em: 08 de jan.2019.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZCABRERA, M. C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1-13, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/837042/abs/>> Acesso em: 20 de maio.2018.

GIARETTA, Elisa et al. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, v.1, p.1-7, 2013. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/920257>

GONÇALVÉS, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F.; Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: 2ª Edição, Editora Varela, p. 340. 2001.

GOUGEON, A.; CHAINY, G. B. Morphometric studies of small follicles in ovaries of Women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, 81, p.433-42, 1987. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/81/2/jrf_81_2_017.xml> Acesso em: 25 de maio.2018.

GORRICHIO, Camila Mario. Vitriificação de Tecido Ovariano de Gatas Domésticas: O Tamanho do Fragmento Influência a Viabilidade Pós Descongelção? **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/154237/gorricho_cm_me_jabo.pdf?sequence=8> Acesso em: 08 de jan2020.

GROSS, E.; PIRES, M.; FERNANDES, V.; Curso Teórico Prático de Técnicas em Microscopia Eletrônica. **Universidade Estadual de Santa Cruz**, 17 a 21 de março de 2014. Disponível em: <http://www.uesc.br/centros/cme/arquivos/apostila_curso_cme.pdf> Acesso em: 12 de jan.2020.

GULCIN, I. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.11, p. 210-218, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856409000745>> Acesso em: 22 de ago.2018.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto/ atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KWAK, SEONG-SUNG; HYM, SANG-HWAN. The Effects of Resveratrol on Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. **Journal. Bem. Trans.** v. 27, p.71-80.

2012. Disponível em: <<http://db.koreascholar.com/article?code=47751>> Acesso em: 16 de out.2019.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. Criopreservação do Sêmen Bovino. **Revista de Ciência da Saúde**. V.13, n.4, p. 279-86, 2011. DOI: < <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p> >. Acesso em 20 de março de 2020.

LIMA, A. K. Determinação da População Folicular, Criopreservação e Cultivo de Oócitos inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais de Gata Doméstica. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual do Ceará-UECE. Fortaleza-CE, 2006. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-8250>> Acesso em 29 de fev.2020.

LIMA, I. M. Desenvolvimento *in vitro* de Folículos Pré-antrais Caprinos na Presença de Kit Ligand (KL) e Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15). **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-CE, 2012. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-8250>> Acesso em 29 de fev.2020.

LUNA, H. S.; SILVA, V. B.; ABREU, F. A. Viabilidade de Folículos Pré-antrais isolados de ovários após vitrificação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.4, p.693 – 698, 2011. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012069109>> Acesso em: 30 de maio.2018.

LUZ, H. K. M.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J.R.; Rodrigues, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-13, 2011. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/2890/289022024001/>>. Acesso em: 12 de set.2018.

LUZ, V.B.; PIRES, C. F.; MARTINS M. C.; AZEVEDO, H. C. Protocolo para Caracterização Histológica do Ovário de Ovinos. **Embrapa Tabuleiros Costeiros - Comunicado Técnico 191 (INFOTECA-E)**, p.14, 2016. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1059215>>. Acesso em: 14 de setem.2019.

MORITA, Y.; WADA-HIRAIKE, O.; YANO1, T.; SHIRANE1, A.; HIRANO, M.; HIRAIKE, H.; KOYAMA, S.; OISHI, H.; YOSHINO, O.; MIYAMOTO, Y.; KENBUN SONE1, ODA, K.; NAKAGAWA, S.; TSUTSUI, K.; YUJI, T. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2012. Disponível em: <<http://www.rbej.com/content/10/1/14>> Acesso em: 10 de nov.2018.

MONTE, Alane Pains Oliveira et al. Addition of sucrose on cryoprotectant solution of vitrification enhances the quality of Dorper sheep embryos produced in vivo. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.36, n.6, p. 4257-4268, 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4257

PARK, S. J.; PHILP, A.; BAAR, K.; WILLIAMS, T.; LUO, H.; KE, H.; REHMANN, H.; TAUSSIG, R.; BROWN, AL. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. **Cell**. v.148, p.421-433, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741200030X>> Acesso em 11 de out.2019.

RÔLO, José Luiz Jivago de Paula. Estudo da População e Criopreservação de Folículos Ovarianos Pré-antrais de Cadelas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas Brasília-DF. 2012. 70 f. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/10931>>. Acesso em: 25 maio.2018.

ROCHA, Carina Diniz. Vitriificação de Tecido Ovariano de Fetos Bovinos Associados ao Resveratrol. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. 2017. 94 f. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18468>> Acesso em: 25 maio.2018.

ROCHA, C. D.; SOARES, M. M. ANTONINO, D. C.; JÚNIOR, J. M.; MOHALLEM, R. F. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BELETTI, M. E.; JACOMINI, J. O.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**. v.114, p. 244-251, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X00004556>> . Acesso em: 10 de maio de 2019.

RODRIGUES, Ana Paula Rodrigues et al. Criopreservação de Tecido Ovariano Visando Restaurar a Fertilidade Humana. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.188-193, 2016. Disponível em: <> Acesso em: 05 de nov.2019.

RODRIGUES, Ana Paula Rodrigues et al. Avanços na criopreservação de tecido ovariano de cabras e ovelhas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, p. 284-291 2014. Anais do VII CONERA. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/download/3941/5412/>>. Acesso em: 05 de nov.2019.

RUDER, E. H.; HARTMAN, T. J.; BLUMBERG, J.; GOLDMAN, M. B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p.345-357, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article/14/4/345/638903>> Acesso em: 23 de maio.2018.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomic** v. 24, p. 77-92, 1983. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/336f/0f74de3297493bdf928f47e69cae41_aadea1.pdf> Acesso em: 03 de fev.2020.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO J.R.; VAN HAEFTEN; T. VAN DEN HURK, R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v.325, p.523-531, 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-006-0240-2>> Acesso em: 30 maio.2018.

SANTOS, R.R., THARASANIT, T., VAN HAEFTEN, T., FIGUEIREDO, J.R., SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**. v.327, p.167-176. 2007. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-006-0240-2>> Acesso em: 30 maio.2018.

SANTOS, R. R.; CELESTINO J.J.H.; LOPES CAP, MELO MAP, RODRIGUES APR, FIGUEIREDO J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.9-15, 2008. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/143.pdf>> Acesso em: 16 de ago.2018.

SANTOS, Raul D. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.122, p.151-163, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432010003830>> Acesso em: 16 de ago.2018.

SANTOS, J.T.; SILVA-SANTOS, K.C.; ANDRADE, E. R.; LISBOA, L.A.; SCHNEIDER, C. L.; CIQUINI, A.; FERREIRA, R.; JUNIOR, J. E. N.; SENEDA, M. M. Efeito do Tipo de Fixador e Tempo de Fixação na Morfologia de Folículos Pré-antrais Ovarianos Bovinos. **Semana de Medicina Veterinária**. Londrina, v. 1, p.297-304, 2012. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744111027.pdf>> Acesso em: 16 de jan.2020.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**. v.50, p. 235-245. Disponível em: <<https://akademai.com/doi/abs/10.1556/AVet.50.2002.2.13>> Acesso em: 10 de jan.2020.

SAUTTER, C. K.; DENARDIN, S.; ALVES, A. O.; Carlos A. MALLMANN C. A.; PENNA, N. G.; HECKTHEUER, L. H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n.3, p. 437- 442, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/cta/v25n3/27008.pdf>> Acesso em: 22 de ago.2018.

SAUMANDE, J. Ovogênese et Folliculogênese. *Recueil Medicine Veterinari*. v. 157, p. 29-38.1981. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000096&pid=S0102-0935200700030000700022&lng=pt>. Acesso em 03 de fevereiro de 2020.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R., NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 273-286, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003002161>> Acesso em 13 de jan.2020.

SILVA, A. R. N. Efeito do Resveratrol na Qualidade e Desenvolvimento de Embriões Bovinos Criopreservados ou Conservados em Meio *Holding*. **Dissertação de Mestrado**. Escola de medicina Veterinária e zootecnia da Universidade Federal do Goiás, Goiânia – GO, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/5447/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Ariany%20Rafaela%20Neto%20Silva%20-%202015.pdf>> Acesso em: 16 de jan.2020.

SILVA-SANTOS, Katia Cristina et al. Estimate of the 52 population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**. v.76, n.6, p.1051-1057. 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

SHAW, J. M. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**. v. 53, p. 59-72, 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-X)

TAKEO, Shun et al. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.60, n.2, p.92-99. 2014. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-102>

TRIANA, E. L.C. Efeito do Resfriamento e da Associação de Crioprotetores Penetrantes, Não Penetrantes e Ácido Ascórbico na Qualidade de Folículos Pré-antrais Bovinos Vitrificados. 2012.52f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. Disponível em: <<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/zootecnia/2012/245687f.pdf>> Acesso em: 22 fev.2019.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751,2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04002687>> Acesso em: 25 maio.2018.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproduction Biomedical Online**. v.12, p.779-796, 2006. doi: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61091-7)

VAJTA, Gabor et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 51, p. 53-58, 1998. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V

VOLOSHYNA, I.; HUSSAINI, S. M.; REISS, A. B. Resveratrol in cholesterol metabolism and atherosclerosis. **Journal of Medicinal Food**, v.15, n.9, p. 763-773, 2012. Disponível: <<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2012.0025>> Acesso em: 16 de out.2018.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213032044>. Acesso em: 15 de jun.2018.

ZHOU, X. H.; WUB, Y. J.; SHIA, J.; YA-XIAN.; ZHENG, S. S. Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparioson of novel direct cover vitrification e conventional vitrification. **Cryobiology**. v.60, p.101-105, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001122400900025X>> Acesso em: 16 de out.2018.

CAPÍTULO II
ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO BOVINO VITRIFICADO COM
RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE

RESUMO

Aspectos Morfológicos de Folículos Pré-Antrais Incluídos em Tecido Ovarianos Bovinos Vitrificadas Com Resveratrol

Os protocolos de vitrificação de tecido ovariano bovino ainda são limitados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da associação do antioxidante resveratrol a sacarose na vitrificação de tecido ovariano de novilhas pré-púberes e vacas adultas sobre a morfologia e viabilidade folículos pré-antrais. Foram utilizados 10 ovários de novilhas pré-púberes e 10 ovários de vacas adultas, estes foram fragmentados e distribuídos aos tratamentos: controle (Co), toxicidade (T) e vitrificação (V), os tratamentos de toxicidade e vitrificação submetidos as seguintes soluções de vitrificação: Solução base de vitrificação (SBV) com sacarose 0,25M (VS), SBV com resveratrol 10 μ M (VR) e SBV com sacarose e resveratrol (VS+R) nas mesmas concentrações. Os folículos pré-antrais foram quantificados e classificados de acordo com a morfologia em normais e degenerados. Os percentuais médios entre os folículos normais e degenerados não diferiram ($p > 0,05$) nos seguintes percentuais normais 65,51% e degenerados 34,49 %. E nos diferentes tratamentos de toxicidade e vitrificação e em relação aos grupos adultas e pré-púberes não houve diferença ($p > 0,05$). Já os folículos secundários diferiram ($p \leq 0,05$) no grupo controle quando comparados às demais classes foliculares primordiais e primários, ainda estes se apresentaram em menor proporção nos diferentes tratamentos de vitrificação em ambos os grupos de fêmeas bovinas. Os fragmentos de tecido ovariano vitrificados apresentaram resultados semelhantes ao controle fresco. Pode-se concluir que antioxidante natural resveratrol quando a sacarose contribuiu para a preservação morfológica de folículos pré-antrais de novilhas pré-púberes e vacas adultas quando submetidas ao processo de vitrificação e reaquecimento.

Palavras-chaves: Antioxidante Natural. Criopreservação. Integridade folicular.

ABSTRACT

Morphological Aspects of Pre-Antral Follicles Included in Bovine Ovarian Tissue vitrification With Resveratrol

Vitrification protocols for bovine ovarian tissue are still limited. The aim of this work was to evaluate the effect of the association of the antioxidant resveratrol with sucrose on the vitrification of ovarian tissue of pre-puberty heifers and adult cows on the morphology and viability of preantral follicles. Ten ovaries of pre-pubescent heifers and ten ovaries of adult cows were used, these were fragmented and distributed to the treatments: control (Co), toxicity (T) and vitrification (V), the toxicity and vitrification treatments submitted to the following solutions of vitrification: Vitrification base solution (SBV) with 0.25M sucrose (VS), SBV with 10 μ M resveratrol (VR) and SBV with sucrose and resveratrol (VS + R) in the same concentrations. The preantral follicles were quantified and classified according to morphology into normal and degenerate. The average percentages between normal and degenerate follicles did not differ ($p > 0.05$) in the following normal percentages 65.51% and degenerate 34.49%. And in the different toxicity and vitrification treatments and in relation to the adult and pre-pubertal groups there was no difference ($p > 0.05$). The secondary follicles differed ($p \leq 0.05$) in the control group when compared to the other primordial and primary follicular classes, even though these were presented in a smaller proportion in the different vitrification treatments in both groups of bovine females. The vitrified ovarian tissue fragments showed similar results to the fresh control. It can be concluded that natural antioxidant resveratrol when combined with sucrose contributed to the morphological preservation of pre-antral follicles of pre-puberty heifers and adult cows when subjected to the process of vitrification and reheating.

Keywords: Natural antioxiy. Cryopreservation. Follicular integrity.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a criobiologia tem conquistado grande destaque na medicina reprodutiva animal por permitir a conservação das características celulares, genéticas e bioquímicas, garantindo a perpetuação de animais de alto valor genético e de interesse comercial e/ou ameaçados de extinção, quanto na reprodução humana seja através da criopreservação de embriões, gametas masculinos e femininos e mais recentemente utilizando a criopreservação de tecido ovariano (CASTRO et al., 2011; RÔLO, 2012).

No que se refere a produção bovina, a utilização de biotécnicas como criopreservação de células germinativas e o uso de substâncias antioxidantes nos meios de congelamento tem apresentado potencial em garantir a eficiência reprodutiva de rebanhos comerciais e de alto valor zootécnico (TRIANA, 2012; ZIMENEZ, 2016; ROCHA et al., 2018). Haja vista que a lucratividade da atividade pecuária depende em grande parte pela eficiência reprodutiva dos seus rebanhos, principalmente quando se tratando das fêmeas (LEITE et al., 2011).

A criopreservação é uma técnica que têm como princípio básico manter através de baixas temperaturas, o metabolismo celular em estado de quiescência, retardando a atividade enzimática e o metabolismo de respiração celular, permitindo o armazenamento e a preservação de materiais biológicos por períodos indeterminados em nitrogênio líquido (-196°C) (GORDON, 1994; GORRICO, 2018). Os principais métodos de criopreservação são o método convencional ou congelamento lento e vitrificação (MONTE, 2015).

A congelamento lento é o método convencional de criopreservação, no qual são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores e a curva de congelamento é controlada por um congelador programável, havendo a desidratação da célula ou tecido pela redução gradual da temperatura. No entanto, possui a desvantagem de formar cristais de gelo intracelulares (VAJTA; NAGY, 2006).

A vitrificação é um método que consiste em uma brusca redução da temperatura e substituição da água intracelular pelo crioprotetor, de forma a alcançar rapidamente o estado vítreo, transformando os fluídos do estado líquido diretamente para um sólido amorfo sem a formação de cristais de gelo intracelulares. Para que esta transição ocorra, é necessária alta concentração de agente crioprotetor (DALCIN; LUCCI, 2010; RODRIGUES et al., 2014).

A técnica de criopreservação por vitrificação é um método substituto ao convencional, por permitir imersão direta em nitrogênio líquido sem a formação de cristais de gelo, tornando-se uma técnica menos onerosa e de maior praticidade do que a congelamento lento (ALI; SHELTON, 1993).

Independente do método de criopreservação utilizado há a necessidade do uso de solutos chamados de agentes crioprotetores, que consistem em moléculas com função protetora, estas

substâncias reduzem o ponto de solidificação da solução em até 2 a 3°C, o que é benéfico para célula ou tecido por aumentar o tempo de desidratação, diminuindo a formação de cristais de gelo (SEIDEL et al., 1989).

Segundo Gambini et al. (2015), o resveratrol é um antioxidante natural de grande aplicabilidade nos processos de criopreservação celular, por possuir ação intracelular e extracelular, se caracterizando como um potencial agente crioprotetor, além de atuar no controle de espécies reativas de oxigênio durante os processos de descongelamento, quando há a reintrodução de oxigênio.

Dados na literatura (FAUSTINO 2011; RODRIGES et al., 2016; GORRICHIO, 2018) demonstraram que o processo de criopreservação em bovinos ainda encontram alguns obstáculos, principalmente quando se tratando de criopreservação de oócitos, sejam inclusos ou isolados dos folículos ovarianos, acreditam-se que isso se deva alterações morfológicas e funcionais durante o processo de congelamento, danos esses causados talvez devido ao alto conteúdo lipídico no citoplasma dos oócitos dessa espécie e pela formação de espécies reativas de oxigênio.

Nesse sentido, estudos sobre protocolos de vitrificação de tecido ovariano bovinos nas diferentes faixas etárias assume um importante papel para elucidar características fisiológicas acerca dos oócitos dessa espécie, bem como padronizar protocolos de soluções crioprotetoras, tornando-os mais eficientes a serem utilizados nos procedimentos de vitrificação.

Acredita-se que o resveratrol seja um antioxidante que atue nos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovarianos de novilhas pré-puberes e adultas, desempenhando seu efeito antioxidante sobre a preservação morfológica e a viabilidade celular.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da associação ou não do antioxidante resveratrol à sacarose na vitrificação de tecido ovariano de novilhas pré-puberes e vacas adultas sobre a morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais.

2 METODOLOGIA

2.1 Local do Experimento e Considerações Ética

O Trabalho experimental foi desenvolvido e executado no Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (EMVZ/UFT), e o processamento histológico foi desenvolvido no Laboratório de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais da EMVZ/UFT, após submissão e

aprovação ao Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA/UFT) sob processo de No 23.101.008727/2018-30.

2.2 Coleta de Ovários

Os ovários (n=10) de novilhas da raça Nelore pré-puberes com idade entre 14-23 meses e (n=10) de vacas adultas com idade igual e/ou superior a 24 meses, coletados aleatoriamente nas linhas de abate em frigorífico local de Araguaína-TO. Após a coleta, os ovários foram transportados em solução fisiológica 0,9% de NaCl a uma temperatura de 4°C até o LARA/UFT/EMVZ. No laboratório, os ovários passaram por 3 sucessivas lavagens em álcool 70% por 10 segundos, e posteriormente mais uma lavagem com solução salina 0,9% de NaCl. O tempo entre a coleta dos ovários e o processamento não ultrapassou três horas de acordo com a recomendação por ROCHA (2017).

2.3 Processamento das amostras

Os ovários foram seccionados ao meio para a fragmentação do córtex ovariano, originando oito fragmentos de aproximadamente 9mm³ (3 mm x 3mm x 1mm) os quais foram distribuídos para os seguintes tratamentos: Controle (Co); para testes de Toxicidade (T); (T0) Toxicidade zero/ apenas com solução base de vitrificação (SBV), (TS) Toxicidade com SV mais Sacarose, (TR) Toxicidade com SBV mais resveratrol, (TS+R) Toxicidade com SBV e Sacarose mais Resveratrol; (VS) Vitrificação com SBV e Sacarose; e para Vitrificação (V) (VS) Vitrificação com SBV e Sacarose, (VR) Vitrificação com SBV e Resveratrol, (VS+R) Vitrificação com SBV e Sacarose mais Resveratrol, conforme demonstração Figura 1.

Os fragmentos do grupo controle, toxicidade e vitrificação (pós-descongelamento) foram novamente seccionados ao meio e distribuídos em duas formas de fixação em paraformaldeído 4% (5g/100%; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) por três horas e em seguida fixadas em álcool 70% para análise de microscopia de luz; e em paraformaldeído 2% + glutaraldeído 2,5% (500 mg/100%; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) para análise em microscopia eletrônica de transmissão.

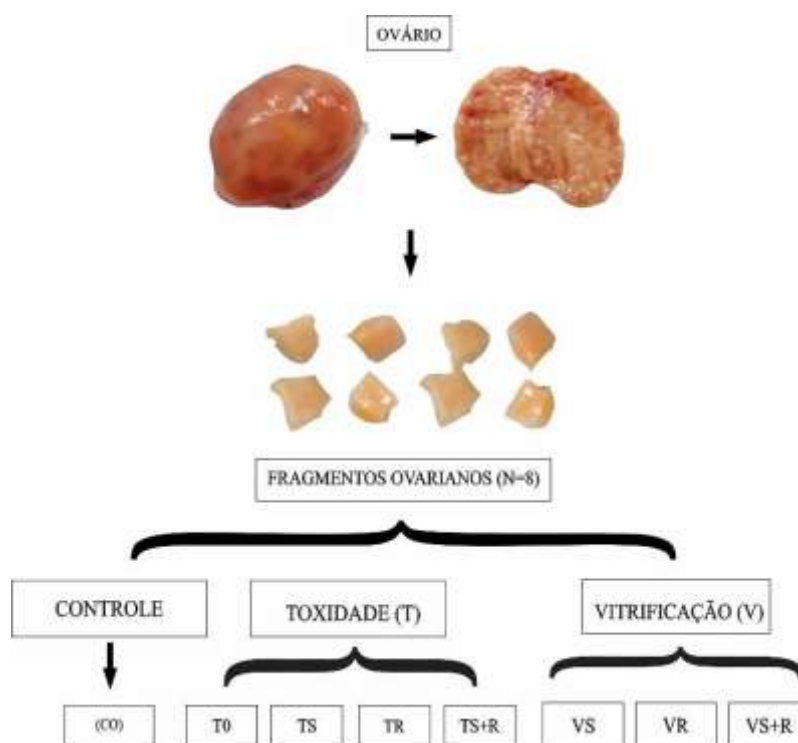


Figura 1. Desenho experimental. Demonstrando a fragmentação e divisão dos grupos por tratamentos em: (Co) Controle; (T0) Toxicidade zero/ apenas com solução base de vitrificação (SBV), (TS) Toxicidade com SV mais Sacarose, (TR) Toxicidade com SBV mais resveratrol, (TS+R) Toxicidade com SBV e Sacarose mais Resveratrol; (VS) Vitrificação com SBV e Sacarose, (VR) Vitrificação com SBV e Resveratrol, (VS+R) Vitrificação com SBV e Sacarose mais Resveratrol. Fonte: Composição do autor.

2.4 Exposição

Com intuito de verificar o possível efeito tóxico dos crioprotetores utilizados nos tratamentos de vitrificação, os quatro fragmentos destinados a exposição grupo de toxicidade foram imersos em diferentes soluções de vitrificação: (T0) com Solução Base de Vitrificação (SBV) composta por TCM-199, BSA, DMSO e EG; (TS) com SBV mais 0,25 M de Sacarose; (TR) SBV mais 10 μ M de Resveratrol e (TS+R) com SBV mais 0,25 M de Sacarose e 10 μ M de Resveratrol, por cinco minutos e em seguida seccionados ao meio e distribuídos conforme o procedimento de fixação já descrito anteriormente (CARVALHO et al., 2014) (Figura 2).

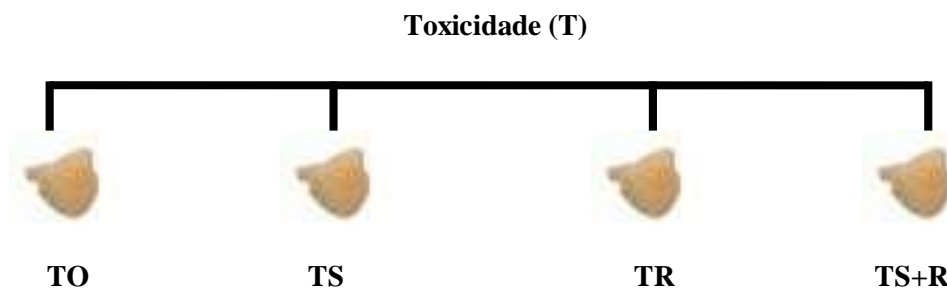


Figura 2. Representação esquemática da exposição dos fragmentos ovarianos aos diferentes testes de toxicidade: Toxicidade zero (TO), Toxicidade com Sacarose (TS), Toxicidade com Resveratrol (TR) e Toxicidade Sacarose mais Resveratrol, (TS+R) em exposição por 5 minutos. Fonte: Composição do autor.

2.5 Vitrificação

Os três fragmentos de tecido ovarianos destinados a vitrificação foram inicialmente imersos em Solução Base de Vitrificação (SBV) composta de Meio 199 (500 mL; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) suplementado com 10 mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) (10 mg; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), 10% de Etileno glicol (EG) (500 mL; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (500 mL; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) adicionados aos tratamentos de vitrificação com e sem Sacarose e Resveratrol por um período de equilíbrio de cinco minutos, em temperatura ambiente (27°C) (ROCHA, 2017).

Os diferentes tratamentos de vitrificação consistiram de: Vitrificação com 0,25M Sacarose (500 mg/99,5%; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) (VS), Vitrificação com 10 µM Resveratrol (20 mg; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) (VR) e Vitrificação com Sacarose e Resveratrol (VS+R) nas mesmas concentrações, estas adicionadas as soluções base de vitrificação (SBV) (TAKEO et al., 2014).

Em seguida, os fragmentos ovarianos foram colocados em criotubos contendo 1,8 mL de Solução de vitrificação de acordo com cada tratamento e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido, armazenadas em botijões criogênicos á (-196°C) pôr uma semana.



Figura 3. Representação esquemática do procedimento de vitrificação dos fragmentos ovarianos de novilhas pré-puberres e vacas adultas submetidas aos seguintes tratamentos: Vitrificação com Sacarose (VS), Vitrificação com Resveratrol (VR) e Vitrificação com Sacarose mais Resveratrol, (TS+R) em equilíbrio por 5 minutos. Fonte: Composição do autor.

2.6 Aquecimento

Uma semana após vitrificação, os criotubos contendo os fragmentos ovarianos foram retirados do botijão criogênico e os fragmentos foram expostas a temperatura ambiente (25°C) por 30 segundos e em seguida imersos em banho-maria a 37°C 1 minuto seguindo recomendação por Carvalho et al. (2014).

Os crioprotetores foram removidos dos fragmentos ovarianos em duas soluções de lavagem, a primeira com a SBV adicionadas as concentrações de 25M de Sacarose e/ou 10 µM de Resveratrol, a segunda apenas com a SBV, por cinco minutos de acordo com cada tratamento de vitrificação, como descrito na Figura 4.

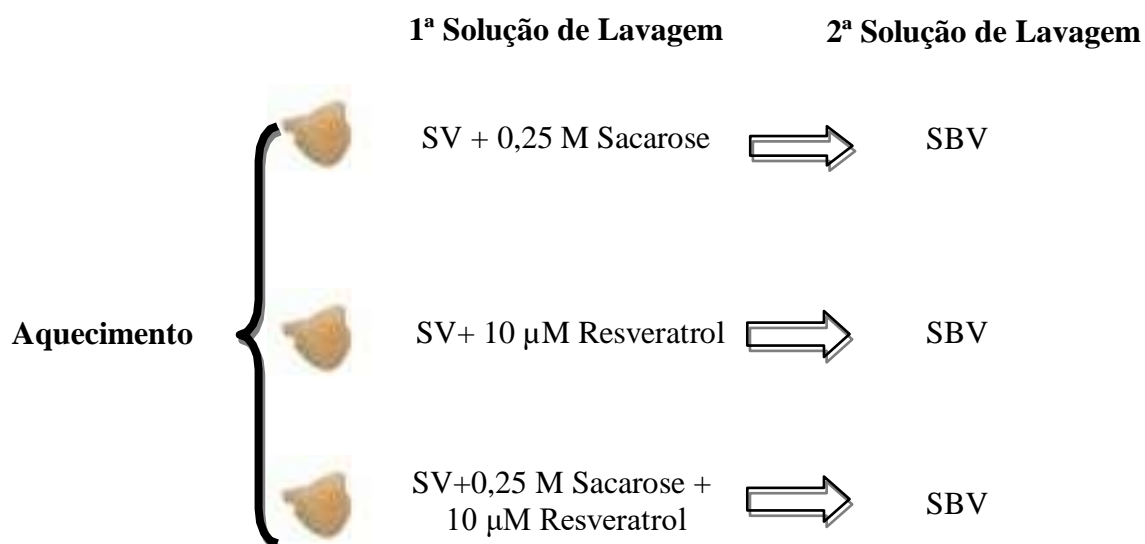


Figura 4. Representação esquemática demonstrando a remoção dos crioprotetores dos fragmentos de tecido ovariano de novilhas pré-puberes e vacas adultas submetidas a diferentes tratamentos de vitrificação em duas soluções de lavagens contendo: soluções base de vitrificação adicionadas de Sacarose; Resveratrol e Sacarose mais Resveratrol (1ª Lavagem) e Solução Básica de Vitrificação (2ª Lavagem) por 5 minutos em cada tratamento. Fonte: Composição do autor.

2.6 Análises Pós-Vitrificação

2.5.1 Microscopia de Luz

Para avaliação da morfologia folicular, os fragmentos dos tecidos ovarianos foram submetidos à histologia clássica, em que se realizou o seguinte protocolo: foram fixados em paraformaldeído a 4% e em álcool 70%, encaminhados posteriormente a desidratação seriada com a utilização de etanol nas concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, esta última constituída de

duas etapas álcool absoluto I e II, passando uma hora em cada concentração. Após processo de desidratação, os fragmentos ovarianos passaram por processo de clarificação e diafanização em solução de xilol absoluto em duas baterias por 1,5 horas cada (SILVA, 2018).

Finalizando o processamento do tecido ovariano, os fragmentos foram imersos em parafina líquida I (pura) por 2 horas e parafina líquida II por mais 2 horas, ambas com temperatura aproximada de 55° a 65°C, para em seguida inclusão em parafina dos tecidos e em para realização dos cortes histológicos em micrótomo, e seccionados serialmente em espaço de 10 giros a 5µm de espessura (ALVES et al., 2015; SILVA, 2018).

As lâminas foram submetidas à coloração com hematoxilina/eosina (HE) e tricrômico de Malloy, e foram analisadas utilizando microscopia de luz (ICC50 HD) em magnificação de 400 vezes. As imagens foram capturadas pelo Leica Software Imaging, Wetzlar, Alemanha.

2.7 Análise Estatística

Os dados das variáveis avaliadas foram submetidos aos testes de normalidade mediante o Shapiro-Wilk. A porcentagem de folículos normais e degenerados nos grupos experimentais adulta e novilhas pré-puberes foram analisados pelo teste de Qui-quadrado.

As variáveis que não passaram pelo teste de normalidade, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, considerando ($p < 0,05$) para determinação de diferenças significativas entre os tratamentos. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico InfoStat Statistical Software (INFOSTAT, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSÃO

Foi avaliado por microscopia de luz um total de 2.610 folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, resultantes de 80 fragmentos do córtex ovariano de fêmeas bovinas pré-puberes (n=10) e adultas (n=10).

Deste total de folículos pré-antrais 1.710 (65,51%) encontraram-se morfológicamente normais, e 900 (34,49%) degenerados, nos dois grupos experimentais de forma geral, não apresentando diferença ($p>0,05$) entre as categorias de fêmeas bovinas (Tabela 1).

O principal entrave durante o processo de vitrificação de oócitos pré-antrais relaciona-se ao movimento de água e do agente crioprotetor intra ou extracelular que podem levar a uma série de danos as células em consequência principalmente pelos cristais de gelo intracelulares (JIMENEZ et al., 2016). Com o intuito de reduzir esses efeitos negativos, protocolos de vitrificação que promovam menos danos tem sido pesquisado, como o presente estudo que avalia a associação ou não do antioxidante natural resveratrol a sacarose na vitrificação de folículos pré-antrais de novilhas pré-puberes e vacas adultas.

A classificação morfológica dos folículos pré-antrais em normais e degenerados foram determinadas segundo Rodgers e Irving-Rodgers (2010), considerando folículos normais os que apresentassem oócitos e núcleos preservados, circundados por células da granulosa organizadas em uma ou mais camadas e degenerados aqueles com citoplasma de oócitos retraídos ou desorganizados com células da granulosa separadas da membrana basal e oócitos apresentado núcleo picnótico. Quanto à quantificação e classificação de acordo com a fase de desenvolvimento dos folículos pré-antrais em primordiais, primários e secundários segundo a classificação Figueiredo et al. (1993).

Tabela 1 – Morfologia ovariana de folículos pré-antrais de fêmeas bovinas pré-puberes e adultas, normal (%) e degenerado (%) após diferentes tratamentos de vitrificação.

Qualitativa %	Normal (n=1710)	Degenerado (n=900)
Adulta	23,91 ^a	22,61 ^a
Pré-pubere	41,61 ^a	11,88 ^a
Total	65,51 ^a	34,49 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferiram ($p>0,05$) com base no teste Qui-quadrado. **Fonte:** Composição do autor.

No tocante aos tratamentos de toxicidade (Tabela 2), os resultados demonstram que os crioprotetores utilizados não apresentaram efeito tóxico ao tecido ovariano no tempo e nas concentrações utilizadas ($p>0,05$), sugerindo que o tratamento contendo o antioxidante resveratrol provavelmente promova menores efeitos tóxicos sobre os folículos pré-antrais de fêmeas adultas e pré-pubescentes, já que os folículos mantiveram sua morfologia normal.

Tabela 2 – Percentual médio (\pm DP) de folículos ovarianos pré-antrais normais de fêmeas bovinas adultas e novilhas Pré-pubescentes após serem submetidos a diferentes tratamentos: Controle (Co), toxicidade (T0, TS, TR, TS+R).

Tratamentos	Adulta (%)	Pré-pubere (%)
Co	18,29 \pm 8,13 ^a	17,13 \pm 6,91 ^a
T0	6,14 \pm 5,33 ^a	18,00 \pm 18,81 ^a
TS	4,42 \pm 3,64 ^a	13,75 \pm 8,08 ^a
TR	3,28 \pm 3,14 ^a	11,13 \pm 11,83 ^a
TS+R	3,28 \pm 3,09 ^a	9,75 \pm 10,22 ^a

Letras iguais nas colunas não diferiram ($p>0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis entre categorias de fêmeas; (Co) = Controle; (T0) = Toxicidade zero/ apenas com solução de vitrificação (SV), (TS) = Toxicidade com SV mais Sacarose, (TR) = Toxicidade com SV mais resveratrol, (TS+R) = Toxicidade com SV e Sacarose mais Resveratrol. **Fonte:** Composição do autor

Dentre os métodos de criopreservação já estudados todos são dependentes do uso de solutos orgânicos conhecidos como agentes crioprotetores, estes consistem em moléculas com função de proteger as células durante o processo de criopreservação, substituindo a água intracelular e estabilizando as membranas, são classificados como intracelulares e extracelulares, tendo o EG, DMSO, Propanodiol e Sacarose respectivamente (SEIDEL et al., 1989; LEIBO, 2008).

Os agentes crioprotetores tem o objetivo de proteger as células e tecidos dos danos causados pelos processos de criopreservação, tais lesões parecem estar potencializadas no gameta feminino, devido ao oócito ser uma célula muito volumosa consequentemente possuir grande quantidade de água o que facilita a formação de cristais de gelo (GONÇALVES et al., 2008; CASTRO, 2011 SPRÍCIGO, 2016).

Dentre os crioprotetores citados acima Rumpf et al. (2004) relatam que o menos tóxico é o EG, seguindo pelo glicerol e propilenoglicol. Ressalva que período de exposição é uma etapa da vitrificação muito importante, pois esta é fortemente influenciada pela concentração dos crioprotetores, tempo de exposição e a temperatura utilizada. Neste estudo foram utilizados 10% dos crioprotetores intracelulares EG e DMSO na SVB em associação ou não a sacarose e

resveratrol na solução e em ambos os tratamentos não houve sinais de toxicidade sobre o tecido ovariano bovino.

O que torna este estudo de extrema importância em definir protocolo de vitrificação de bovinos mais eficientes e com menor ação tóxica aos tecidos e células. Pois Silva (2004) relata a importância da realização de testes de toxicidade das soluções de vitrificação, tornando-o primeiro passo para utilização de uma solução crioprotetora segura que forneça maior viabilidade as células e/ou tecidos.

Além da contribuição do estudo em padronizar protocolos de vitrificação eficientes, há também o uso alternativo de outras substâncias como antioxidante resveratrol atuando como agente crioprotetor, garantindo a viabilidade celular mesmo pós reaquecimento celular. Haja vista que os protocolos atuais de vitrificação de tecido ovariano bovino não se mostraram eficiente até o presente momento.

Na tabela 3 e nas figuras 5, 6, 7 e 8, os diferentes tratamentos de vitrificação (VS, VR, VS+R) e o controle pode-se observar que não houve diferença ($p>0,05$) entre os mesmos, resultados similares aos obtidos por Jimenez et al. (2016), que não observaram diferença significativa na maioria dos tratamentos de vitrificação utilizando o antioxidante Alfa-tocoferol, em folículos pré-antrais bovinos.

O grupo vitrificado apenas com SBV adicionada aos crioprotetores intracelulares DMSO e EG e ao antioxidante resveratrol apresentou média de folículos normais considerável em relação aos demais tratamentos associados ao crioprotetor extracelular sacarose, sugerindo que o antioxidante natural possa ter ação como um crioprotetor, ainda que não tenha tido diferença estatística neste estudo.

Tabela 3 – Percentual médio (\pm DP) de folículos ovarianos pré-antrais normais de fêmeas bovinas adultas e novilhas Pré-puberes após serem submetidos a diferentes tratamentos: Controle (Co) e vitrificação (VS, VR, VS+R).

Tratamentos	Adulta	Pré-pubere
Co	18,29 \pm 8,13 ^a	17,13 \pm 6,91 ^a
VS	13,57 \pm 18,6 ^a	17,00 \pm 7,89 ^a
VR	21,71 \pm 14,95 ^a	30,50 \pm 26,38 ^a
VS+R	18,43 \pm 11,70 ^a	18,50 \pm 5,20 ^a

Letras iguais nas colunas não diferiram ($p>0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis entre categorias de fêmeas; (Co) = Controle; (VS) = Vitrificação com SV e Sacarose, (VR) Vitrificação com SV e Resveratrol, (VS+R) = Vitrificação com SV e Sacarose mais Resveratrol. **Fonte:** Composição do autor

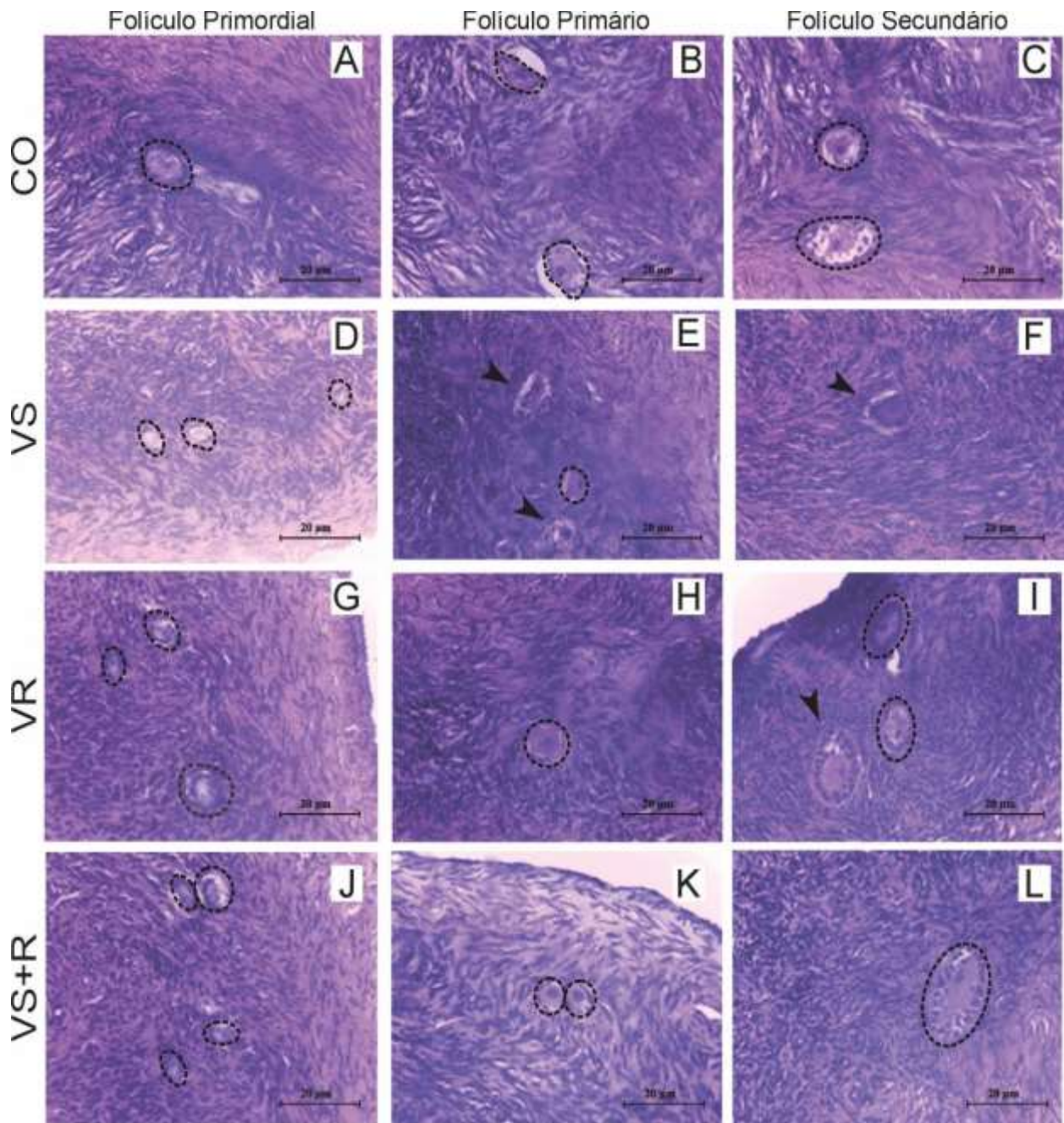


Figura 5. Representação histológica coloração em HE de folículos primordial, primário e secundários morfológicamente normais (Círculo em traço) e degenerados (seta) envolvidos em fragmentos ovarianos de vacas adultas submetidos a vitrificação com ou sem resveratrol. (A, B) Controle; (C, D) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (G, H) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm. **Fonte:** Composição do autor.

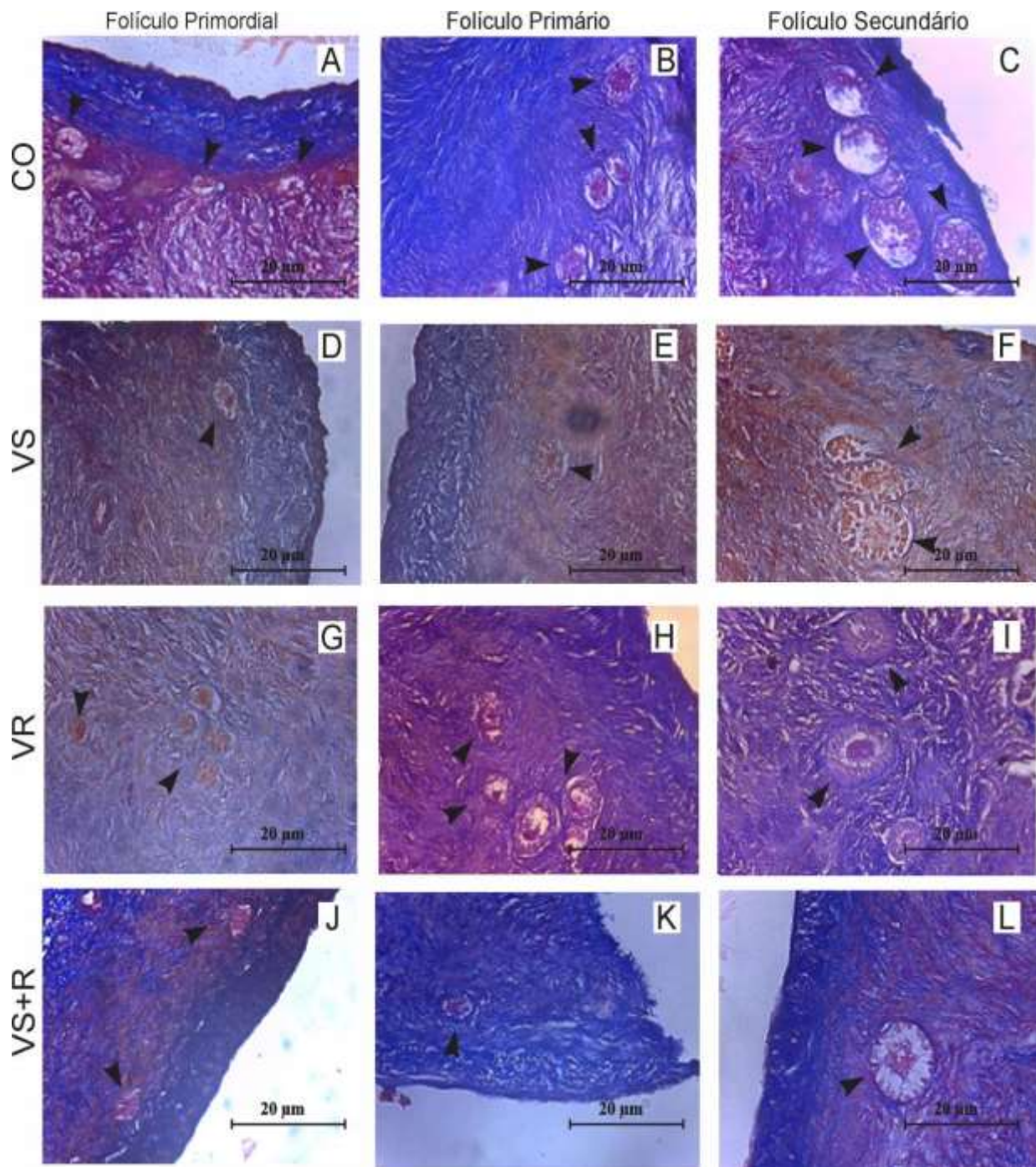


Figura 6. Representação histológica coloração em tricrômico de Mallory de folículos primordial, primário morfologicamente normais (Setas) envolvidos em fragmentos ovarianos de vacas adultas submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm. **Fonte:** Composição do autor.

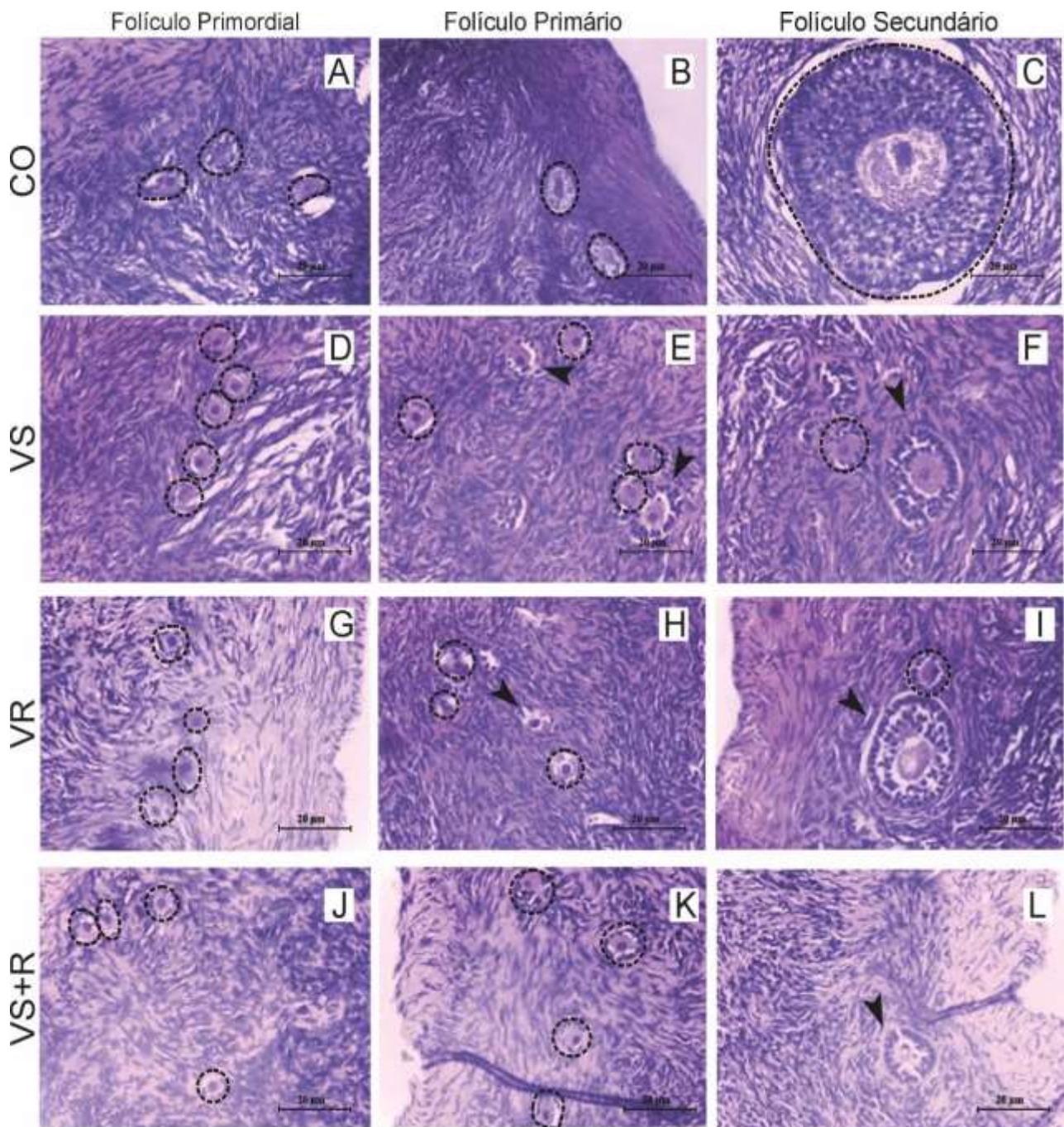


Figura 7. Representação histológica coloração em HE de folículos primordial, primário e secundário morfologicamente normais (Círculo em traço) e degenerados (seta) envolvidos em fragmentos ovarianos de novilhas pré-puberes submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm. **Fonte:** Composição do autor.

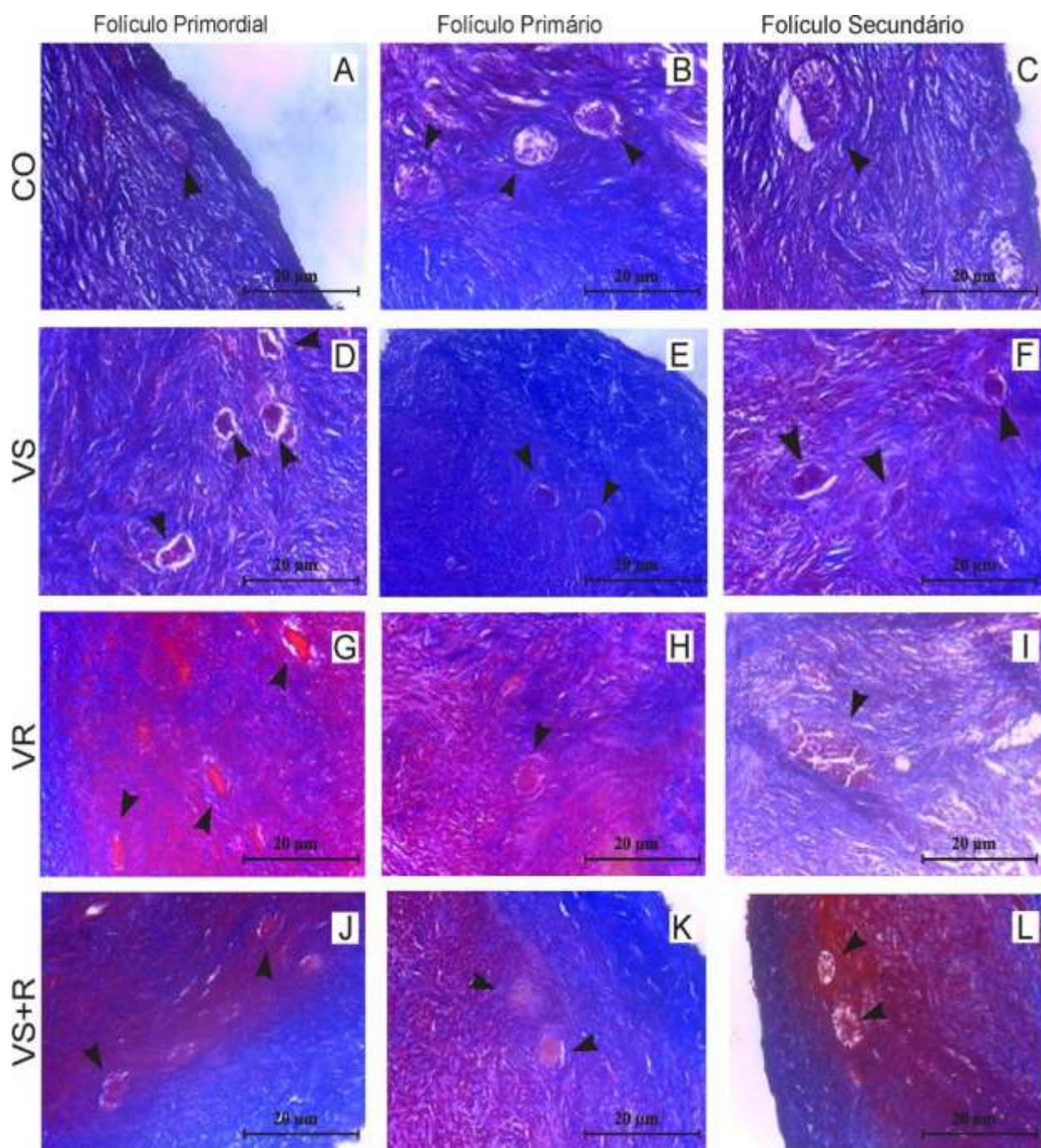


Figura 8. Representação histológica coloração em tricrômico de Mallory de folículos primordial, primário e secundário morfologicamente normais (setas) envolvidos em fragmentos ovarianos de novilhas pré-puberes submetidos a vitrificação associado ou não ao resveratrol. (A, B, C) Controle; (D, E, F) fragmentos ovarianos vitrificados com sacarose (VS); e (G, H, I) fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol (VR); (J, K, L) fragmentos ovarianos vitrificados com associação de sacarose e resveratrol (VS+R), escala barra 20µm. **Fonte:** Composição do autor.

Segundo Gambini et al. (2015), a estrutura química do resveratrol apresenta baixa solubilidade em água, afetando sua absorção. Ainda segundo os mesmos autores, a associação do resveratrol a solventes orgânicos, como etanol, pode aumentar sua solubilidade nos tecidos. Neste estudo houve a associação do resveratrol ao DMSO, um solvente orgânico que se caracteriza como um carreador de substâncias para o meio intracelular sugere que o resveratrol possa ter tido alguma ação crioprotetora intracelular conjunta.

Este trabalho surge como pioneiro utilizando o antioxidante natural resveratrol avaliando seu efeito antioxidante e crioprotetor em folículos pré-antrais de vacas pré-puberes e adultas, resultados similares aos encontrados por Rocha et al. (2018), que avaliaram a associação de agentes crioprotetores intracelulares DMSO e EG com o antioxidante resveratrol, constatando que houve a preservação da morfologia após os processos de vitrificação/reaquecimento de folículos pré-antrais ovarianos de fetos bovinos.

De acordo com a necessidade de aumentar a produtividade dos rebanhos nacionais e a conservação da diversidade genética, o uso de biotécnicas eficientes como a vitrificação capazes de acelerar a multiplicação e possibilitar o armazenamento de gametas femininos com menores custos é importante para o sucesso da atividade pecuarista. Tendo em vista que o potencial reprodutivo das fêmeas nos rebanhos bovinos na sua maior totalidade é desperdiçado.

Neste estudo, os fragmentos vitrificados com SBV adicionados à sacarose apresentaram percentual médio de folículos morfologicamente normais, semelhante ao controle. Ainda avaliando a associação da sacarose ao antioxidante resveratrol nos processos de vitrificação, mostram uma proteção sobre os folículos pré-antrais de novilhas pré-puberes e adultas, apresentando-se normais. A Sacarose é um crioprotetor extracelular consolidado e um dos mais utilizados na a criopreservação de gametas masculinos e femininos, por exercer um efeito osmótico significativo (GONÇALVES et al., 2008; BORGES et al., 2009).

O resveratrol é um antioxidante natural que pode ser utilizado em alternativa a sacarose em protocolos de vitrificação, devido as suas características estruturais e composição química, que permitem alta permeabilidade aos tecidos interagindo com receptores de membrana desempenhando ação direta como antioxidante (GAMBINI ET AL., 2015). Além de poder atuar como um crioprotetor intra e extracelular, diminuído o uso de agentes crioprotetores na solução de vitrificação, reduzindo assim os riscos com ação tóxica.

Observou-se através da microscopia de luz que os fragmentos ovarianos vitrificados apresentaram morfologia normal de folículos pré-antrais, semelhante ao controle fixado imediatamente pós-fragmentação, demonstrando que a vitrificação de tecido ovariano é uma técnica de criopreservação importante por garantir a viabilidade celular mesmo pós-descongelação,

apresentando qualidade morfológica similar ao observado em ovário fresco, independente da faixa etária da fêmea (Figura 5, 6, 7 e 8).

Inúmeros trabalhos têm mostrado a utilização do método de vitrificação para a criopreservação de tecido ovariano em diferentes espécies de animais domésticos: bovino (JIMENEZ, 2010); caprinos (SANTOS et al., 2007); suínos (MONIRUZZAMAN et al., 2005); caninos (ISHIJIMA et al., 2006) e camundongos (DELA PEÑA et al., 2002). No entanto, na maioria dos trabalhos, a viabilidade folicular pós-descongelamento ainda permanece inferior à observada no tecido fresco, limitando o sucesso dessa técnica em tecido ovariano.

Segundo Sprícigo (2016) as lesões promovidas pelo processo de vitrificação aos oócitos bovinos são na sua maioria severos e irreversíveis e que essa baixa eficiência da se deva pelas próprias características do oócitos desta espécie, como tamanho celular, quantidade de água no citoplasma, composição da membrana e a grande reserva de ácidos graxos que prejudicam o processo de congelamento. Isto demonstra a importância deste estudo, o qual contribui significativamente na elaboração de protocolos de vitrificação de tecidos ovarianos mais eficientes em bovinos.

Para Vajta et al. (1998) e Triana (2012), a vitrificação é uma alternativa prática a ser utilizada na reprodução de animais de produção, devido à simplicidade na execução, rentabilidade econômica e velocidade do procedimento de preservação.

Segundo Tatone et al. (2010), durante a descongelamento do tecido ocorre a reintrodução do oxigênio no momento do reaquecimento celular, havendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), e a retomada das reações de oxidação e redução, destacando a importância do aumento das defesas antioxidantes após a descongelamento dos fragmentos vitrificados. Carvalho et al. (2014) demonstraram que a adição de antioxidantes como o resveratrol em qualquer estágio da vitrificação/reaquecimento de fragmentos de tecido ovarianos pode prevenir a produção de espécies reativas de oxigênio promovidas pela criopreservação.

Observou-se quantidade relevante de folículos pré-antrais na faixa etária de novilhas pré-pubescentes, o que pode ser justificado pela não ocorrência ainda de eventos fisiológicos que suportam os mecanismos endócrinos, sofrendo menor influência hormonal logo sem picos ovulatórios e morte celular por processo natural de atresia (DAY; ANDERSON, 1998; FREITAS, 2015).

Segundo Shaw et al. (2000) os folículos pré-antrais são folículos menos diferenciados conseqüentemente mais resistentes as crioinjúrias. Nesse sentido as fêmeas bovinas pré-pubescentes que ainda não entraram em sua atividade cíclica, apresentam um grande potencial reprodutivo por possuir um número significativo de folículos pré-antrais em seus ovários que por sua vez são mais resistentes aos danos promovidos pelo processo de criopreservação, em comparação a vacas

adultas, tendo em vista que as novilhas ainda não ovularam e não perderam folículos pelo processo natural de atresia (DAY; ANDERSON, 1998; GONÇALVES et al., 2001).

Neste estudo foi possível observar que as categorias mais jovens apresentaram melhores resultados frente à vitrificação do que as categorias mais tardias. No entanto, as vacas adultas possuem uma maior propensão a danos causados pela criopreservação, devido às suas características senis, mas a associação dos crioprotetores intracelulares e extracelulares ao antioxidante resveratrol contribuiu para a proteção dos folículos também nessa classe de fêmeas, sugerindo que o uso do antioxidante resveratrol contribuiu para a vitrificação de oócitos pré-antrais nas duas categorias de fêmeas bovinas (Tabela 3).

Segundo Shaw et al. (2000) e Luna (2011) oócitos imaturos presentes em folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, principalmente primordiais são mais resistentes ao processo de vitrificação/reaquecimento em comparação a oócitos maduros, por apresentarem um menor tamanho do oócito, está fase celular de prófase I, com poucas organelas e ausência de zona pelúcida e grânulos corticais, permitindo talvez uma maior permeabilidade aos agentes crioprotetores e reduzindo a formação dos radicais livres.

Acredita-se que o bom resultado obtido no presente estudo quanto a manutenção da morfologia dos folículos pré-antrais se deva ao uso do TCM-199 na composição da solução base (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). De modo geral, como descrito por Monte, (2015) os crioprotetores são diluídos em solução salina tamponada (PBS) ou, com menor frequência em meios ricos, como o TCM-199, que vai de acordo com o utilizado como constituinte do meio base neste estudo.

Rocha et al. (2018) concluíram que o resveratrol beneficiou a preservação de folículos pré-antrais de fetos bovinos, que são menos diferenciados, durante o processo de vitrificação, evidenciando efeito positivo sobre a viabilidade mesmo após reaquecimento. O efeito benéfico do resveratrol também foi observado por Santos et al. (2012) na criopreservação da célula espermática de ovinos, no qual o tratamento com resveratrol aumentou a motilidade dos espermatozoides e reduziu os defeitos acrossomais após reaquecimento na criopreservação de sêmen.

Na tabela 4 pode-se constatar que os folículos primordiais foram os que apresentaram maior proporção de folículos pré-antrais normais no grupo controle e nos demais tratamentos de vitrificação. No entanto os folículos secundários ($p < 0,05$) no grupo controle, quando comparados às demais classes foliculares primordiais e primários se apresentaram em menor proporção em ambos os grupos de fêmeas bovinas.

Tabela 4. Porcentual médio (\pm DP) de folículos morfolologicamente normais das diferentes classes foliculares em ovários de Fêmeas bovinas pré-puberes e adultas após serem submetidos a diferentes tratamentos de vitrificação.

Trat.	Adulta			Pré-puberes		
	Primordial	Primário	Secundário	Primordial	Primário	Secundário
Co	7,3 \pm 3,0 ^{ab}	8,8 \pm 6,2 ^{ab}	2,1 \pm 1,0 ^{abc}	8,8 \pm 4,3 ^{ab}	6,6 \pm 4,1 ^{ab}	1,6 \pm 1,3 ^{abc}
VS	8,1 \pm 10,5 ^{ab}	3,3 \pm 5,0 ^{ab}	2,1 \pm 3,7 ^{ab}	7,0 \pm 3,9 ^{ab}	7,6 \pm 6,2 ^{ab}	2,3 \pm 1,5 ^{ab}
VR	11,6 \pm 8,9 ^{ab}	6,7 \pm 5,9 ^{ab}	3,4 \pm 3,1 ^{ab}	17,6 \pm 18,8 ^{ab}	10,2 \pm 10,5 ^{ab}	2,6 \pm 2,8 ^{ab}
VS+R	9,6 \pm 5,9 ^{ab}	6,0 \pm 4,4 ^{ab}	2,8 \pm 1,9 ^{ab}	9,5 \pm 8,1 ^{ab}	5,5 \pm 6,1 ^{ab}	3,5 \pm 5,2 ^{ab}

As letras iguais na mesma coluna não diferiram, e as letras diferentes na mesma linha diferiram ($p \leq 0,05$) com base no teste Kruskal-Wallis. **Fonte:** Composição do autor.

Foi observado também maior número de folículos pré-antrais normais nos diferentes tratamentos de vitrificação, principalmente no grupo de vacas adultas, reafirmando que folículos menos diferenciados são mais resistentes aos danos celulares provocados pela vitrificação, assim como demonstrou Vajta et al. (1998). Como o esperado o número de folículos morfolologicamente degenerado foi maior na classe de fêmeas adultas, devido as suas características senis e por já terem passado por sucessivos picos ovulatórios.

Este estudo mostrou que a adição de 10 μ M de resveratrol ao meio de vitrificação proporcionou uma boa proteção de folículos pré-antrais aos danos provocados pela vitrificação, como mostrado nas figuras 2, 3, 4 e 5. Wang et al. (2013) também obtiveram excelentes resultados na maturação de oócitos bovinos, com uso de resveratrol nas concentrações 0,1 – 1 e 10 μ M no meio de maturação.

Outras concentrações do resveratrol também foram utilizadas em procedimentos de maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) em diferentes espécies. Kwak e Hym, (2012) demonstraram que 2 μ M de resveratrol apresentou efeitos positivos na maturação de oócitos e no desenvolvimento embrionário de suínos. Já em bovinos o tratamento com 20 μ M e 40 μ M durante a MIV reduziu significativamente a porcentagem de oócitos que atingiram estágios avançados na maturação dos mesmos. Estes resultados corroboram as afirmações de Park et al. (2012) que afirmaram que concentrações ≥ 20 μ M podem ter um efeito prejudicial na maturação de oócitos.

Os resultados deste trabalho aos obtidos por Jimenez et al. (2016) e por Rocha et al. (2018), que ressaltam a importância de realizar mais estudos utilizando resveratrol e/ou outras substâncias antioxidantes sobre a vitrificação de folículos pré-antrais bovinos, principalmente de novilhas pré-puberes, necessitando de mais pesquisas sobre seus efeitos para consolidar sua ação

com um agente crioprotetor, visando contribuir para uma maior exploração do potencial reprodutivo destas fêmeas.

4 CONCLUSÃO

O antioxidante natural resveratrol quando associado sacarose contribuiu para a preservação morfológica de folículos pré-antrais de novilhas pré-pubescentes e vacas adultas quando submetidas ao processo de vitrificação e reaquecimento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, J.; SHELTON J. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal Reproduction Fertility**, v.99, p.471-477, 1993. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/99/2/jrf_99_2_025.xml> .Acesso em: 19 de jun. de 2018.

ALVES, K.A.; ALVES, B. G.; ROCHA, C. D.; VISONNÁ, M.; MOHALLEM, R. F. F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E.; FIGUEIREDO, J. R.; GAMBARINI, M. L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology** v.83, n.6, p.1048-1055, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628263>>. Acesso em: 23 de maio 2018.

BORGES, E. N.; SILVA, R. C.; FUTINO, D. O. Cryopreservation of swine ovarian tissue: effect of diferente cryoprotectants on the structural preservation of preantral follicle oocytes. **Cryobiology**. v. 59, p. 195-200. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224009000984>>. Acesso em: 19 de jan. de 2020.

CASTRO, S. V. CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e ovócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/2890/289022024002/> Acesso em: 19 jul. 2018.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; SANTOS, F. W.; SANTOS, R. R.; CAMPELLO, C. C.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. **Research Veterinary**, v. 97, p. 140-147, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528814001532>>. Acesso em: 01 de jun.2018.

DALCIN, L.; LUCCHI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.34, p.149-159, 2010. Disponível em: <[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20 pag149-159.pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20pag149-159.pdf)> Acesso em: 19 de jun.2018.

DELA PENÃ, E. C.; TAKAHASCHI, Y.; KATAGIRI, S. Birth of pups after transfer of mouse embryos derivd from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v. 123, p.593-600, 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Masashi_Nagano/publication/11450633_Birth_of_pups_after_transfer_of_mouse_embryos_derived_from_vitrified_preantral_follicles/links/5a00124daca272347a2b1ed7/Birth-of-pups-after-transfer-of-mouse-embryos-derived-from-vitrified-preantral-follicles.pdf> Acesso em: 20 de jan. de 2020.

FAUSTINO, Luciana Rocha et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.35, n.1, p.3-15, 2011. Disponível em: <<https://cbra.websiteseuro.com/pages/publicacoes/rbra/v35n1/pag3-15.pdf>> Acesso em: 12 jun. 2018.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**. v.9, n., p. 11-25, 1999. Disponível em: <<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo2.1999.1.pdf>> Acesso em: 19 jun. 2018.

GAMBINI, J.; INGLÉS, M.; OLASO, G.; LOPEZ-GRUESO, R.; BONET-COSTA, V.; GIMENO-MALLENCH, L.; MAS-BARGUES, C.; ABDELAZIZ, K.M.; GOMEZCABRERA, M. C.; VINA, J.; BORRAS, C. Properties of resveratrol: in vitro and in vivo studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2015, p.1-13, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/837042/abs/>> Acesso em: 20 de maio 2018.

GONÇALVÉS, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F.; Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: 2ª Edição, Editora Varela, p. 340. 2001.

GORRICO, Camila Mario. Vitriificação de Tecido Ovariano de Gatas Domésticas: O Tamanho do Fragmento Influência a Viabilidade Pós Descongelção? **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/154237/gorricho_cm_me_jabo.pdf?sequence=8> Acesso em: 08 de jan. 2020.

GORDON, I. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, **UK: CAB international**, 1994. p.293-328. Disponível em:

<<https://cbra.websiteseuro.com/pages/publicacoes/rbra/v34n3/RB264%20pag149-159.pdf>>
Acesso em: 14 de jun. 2018.

ISHIJIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; LEE, D. S.; Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. **Journal of Reproduction and Development**. v.52, p. 293-299, 2006. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080615300939>> Acesso em: 20 de jan. 2020.

JIMENEZ, C. R.; PENITENTE-FILHO, J. M.; TORRES, C. A. A.; MEDEIROS, A. M.; SILVA, L. S. Vitrification of bovine preantral follicles with dimethylsulfoxide and sucrose plus α -tocopherol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36, n.3, p. 209-215. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-X2016000300209&script=sci_abstract&tlng=pt>
Acesso em: 19 de nov. 2020.

KWAK, SEONG-SUNG; HYM, SANG-HWAN. The Effects of Resveratrol on Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. **J. Bem. Trans**. v. 27, p.71-80. 2012. Disponível em: <<http://db.koreascholar.com/article?code=47751>>. Acesso em: 16 de out. 2019.

LEIBO; S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, v.69, p.37-47, 2008. Disponível em:
<<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>>. Acesso em: 05 de nov. 2019.

LUNA, H. S.; SILVA, V. B.; ABREU, F. A. Viabilidade de Folículos Pré-antrais isolados de ovários após vitrificação. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia - GO, v.12, n.4, p. 693– 698, 2011. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012069109>> Acesso em: 30 de maio.2018.

MONTE, Alane Pains Oliveira et al. Addition of sucrose on cryoprotectant solution of vitrification enhances the quality of Dorper sheep embryos produced in vivo. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.36, n.6, p. 4257-4268, 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Sup12p4257

MONIRUZZAMAN, M.; BAO, R.M.; TAKETSURU, H. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. v.72, p. 280-288, 2009. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X09001277>> Acesso em: 18 de jan.2020.

PARK, S. J.; PHILP, A.; BAAR, K.; WILLIAMS, T.; LUO, H.; KE, H.; REHMANN, H.; TAUSSIG, R.; BROWN, AL. Resveratrol Ameliorates Aging-Related Metabolic Phenotypes by Inhibiting cAMP Phosphodiesterases. **Cell**. v.148, p.421-433, 2012. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741200030X>> Acesso em 11 de out.2019.

RÔLO, José Luiz Jivago de Paula. Estudo da População e Criopreservação de Folículos Ovarianos Pré-antrais de Cadelas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas Brasília-DF. 2012. 70 f. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/10931>>. Acesso em: 25 maio.2018.

ROCHA, C. D. Vitriificação de Tecido Ovariano de Fetos Bovinos Associados ao Resveratrol. 2017. 94 f. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18468>> Acesso em: 25 maio.2018.

ROCHA, C. D.; SOARES, M. M. ANTONINO, D. C.; JÚNIOR, J. M.; MOHALLEM, R. F. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BELETTI, M. E.; JACOMINI, J. O.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**. v.114, p. 244-251, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X00004556>> . Acesso em: 10 de maio de 2019.

RODRIGUES, A. P. R.; DONFACK, N. J.; BRUNO, J. B.; RODRIGUES, G. Q.; SOUSA F. G. C. Criopreservação de Tecido Ovariano Visando Restaurar a Fertilidade Humana. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.188-193, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Nathalie_Donfack/publication/317796229_Evaluation_of_vitrified_goat_ovarian_tissue_after_autotransplantation/links/59a44eeaa6fdcc773a373c2e/Evaluation-of-vitrified-goat-ovarian-tissue-after-autotransplantation.pdf> Acesso em: 05 de nov. 2019.

RODRIGUES, Ana Paula Rodrigues et al. Avanços na criopreservação de tecido ovariano de cabras e ovelhas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, p. 284-291 2014. Anais do VII CONERA. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/download/3941/5412/>>. Acesso em: 05 de nov.2019.

RODGES, R. J.; IRNING-RODGES, H. F. Morphological Classification of Bovine Ovarian Follicles. **Society for Reproduction and Fertility**. 2016. V. 139, p. 309-318. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Helen_Irving-Rodgers/publication/26853345_Morphological_classification_of_bovine_ovarian_follicles/links/569f1bfc08ae2c638eb5ac1d.pdf> . Acesso em: 10 de fev. de 2020.

RUMPF, R.; BRANDÃO D.; PEREIRA, D. et al.; Vitriificação de embriões produzidos in vitro [Workshop], **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2004. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1000991/1/CA02743.pdf>> Acesso em: 20 de nov.2019.

SANTOS, J.T.; SILVA-SANTOS, K.C.; ANDRADE, E. R.; LISBOA, L.A.; SCHNEIDER, C. L.; CIQUINI, A.; FERREIRA, R.; JUNIOR, J. E. N.; SENEDA, M. M. Efeito do Tipo de Fixador e Tempo de Fixação na Morfologia de Folículos Pré-antrais Ovarianos Bovinos. **Semana de Medicina Veterinária**, Londrina, v. 1, p.297-304, 2012. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744111027.pdf>> Acesso em: 16 de jan.2020.

SANTOS, R.R., THARASANIT, T., VAN HAEFTEN, T., FIGUEIREDO, J.R., SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v.327, p.167-176. 2007.
Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-006-0240-2>> Acesso em: 30 maio 2018.

SEIDEL, G. E. Jr.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; LONG, P. L. Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanodiol. **Equine Veterinary Journal**. Suppl.8, p.87-88, 1989. doi: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1989.tb04688.x>

SOUZA JUNIOR, J. C. de. Controle de Qualidade de Lâminas Histológicas: Importância da Metodologia de H/E no Diagnóstico Médico. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)** - Faculdade Integradas FAFIBE, Bebedouro, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistabiologia/sumario/15/02032011082618.pdf>> > Acessado em: 19 de nov. de 2019.

SILVA, M. da. L. S. Ocorrência da Espécie e Estimativa de População Folicular Ovariana de *Bradypus varigatus* (Shinz 1825) Nos Municípios de Pacojá-PA e Araguaína-TO. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Tocantins, UFT, Araguaína, TO, 2018.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R., NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 273-286, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432003002161>> Acessado em 13 de jan. 2020.

SHAW, J. M. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**. v. 53, p. 59-72, 2000. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00240-X)

SPRÍCIGO, J. F. W. Alternativa para Aumentar a Resistência do ovócito Bovino a criopreservação. **Tese (Doutorado)** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília-DF, 2016.

TAKEO, Shun et al. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.60, n.2, p.92-99. 2014. doi: <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-102>

TATONE, C. EMIDIO, G. D.; MARILENA VENTO, M.; ROSANNA CIRIMINNA, R.; ARTINI, P. G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, v.26, n. 8, p.563-567, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09513591003686395>> Acesso em: 26 de ago.2018.

TRIANA, E. L.C. Efeito do Resfriamento e da Associação de Crioprotetores Penetrantes, Não Penetrantes e Ácido Ascórbico na Qualidade de Folículos Pré-antrais Bovinos Vitricados. 2012.52f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG. Disponível em: <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/zootecnia/2012/245687f.pdf>> Acesso em: 22 fev. 2019.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproduction Biomedical Online**. v.12, p.779-796, 2006. doi: [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61091-7)

VAJTA, Gabor et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. v. 51, p. 53-58, 1998. doi: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199809\)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V)

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028213032044>>. Acesso em: 15 de jun. 2018.