

## EFEITO DO RESVERATROL ASSOCIADO A SACAROSE EM PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO DE VACAS

*(Effect of resveratrol associated with saccharosis on ovarian tissue vitrification protocol in cows)*

Samara Dias Cardoso RODRIGUES<sup>1</sup>; Ana Kelen Felipe LIMA<sup>2</sup>; Aliny Silva SOUSA<sup>2</sup>; Gabriel Silva SOBREIRA<sup>2</sup>; Denise Amorin SANTOS<sup>3</sup>; Sandro Estevan Moron SILVA<sup>2</sup>; Francisca Elda Ferreira DIAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Rua Teófilo Condurú, n° 254, Belém/PA. CEP: 66.070-530; <sup>2</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFTO); <sup>3</sup>Laboratório de Reprodução Animal e de Morfofisiologia e Bioquímica de Peixes Neotrópicos (UFTO). \*E-mail: [samaracardosomedvet@gmail.com](mailto:samaracardosomedvet@gmail.com)

### ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the association of the antioxidant resveratrol with sucrose in a vitrification protocol of ovarian tissue in cows, on the morphology of preantral follicles. Ten ovaries of cows were used, collected in local slaughterhouses, fragmented and distributed to the following treatments: fresh control (Co); toxicity (T); (T0) zero toxicity/ only with base vitrification solution (SBV), (TS) toxicity with SBV plus sucrose, (TR) toxicity with SBV plus resveratrol, (TS+R) toxicity with SBV and sucrose plus resveratrol; and for glazing (V); (VS) vitrification with SBV and sucrose, (VR) vitrification with SBV and resveratrol, (VS+R) vitrification with SBV and sucrose plus resveratrol. Preantral follicles were quantified and classified according to morphology into normal and degenerated. The mean percentages between normal and degenerated follicles did not differ ( $p>0.05$ ) in the following percentages, normal 51.4% and degenerated 48.60%. In the toxicity test there was a difference ( $p<0.05$ ) between the fresh control and the toxicity treatments, however regarding the vitrification treatments there was no difference ( $p>0.05$ ), demonstrating that the vitrification technique is efficient, but the concentration of cryoprotectants used needs to be re-evaluated. Concluding that the natural antioxidant association resveratrol to sucrose in vitrification and rewarming protocols contributes with reservations for the morphological preservation of preantral follicles in cows.

**Keywords:** Natural antioxyty, cryopreservation, follicular integrity.

### INTRODUÇÃO

Vitrificação é um método de congelação que consiste em brusca queda da temperatura e substituição da água intracelular pelo crioprotetor, de forma a alcançar rapidamente o estado vítreo, transformando os fluídos do estado líquido 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). Segundo Gambini *et al.* (2015), o resveratol é um antioxidante natural de grande aplicabilidade nos processos de criopreservação celular, possui ação intracelular e extracelular, se caracterizando um potencial agente crioprotetor, além de atuar no controle de espécies reativas de oxigênio durante os processos de descongelamento durante a reintrodução de oxigênio. Acredita-se que o resveratol atue nos folículos pré-antrais inclusive em tecido ovariano de vacas 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 do antioxidante resveratrol à sacarose na vitrificação de tecido ovariano de vacas, sobre a morfologia de folículos pré-antrais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do Experimento e Considerações Éticas

O Trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (EMVZ/UFT), aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA/UFT) sob processo n° 23.101.008727/2018-30.

### Coleta de ovários e Processamento das amostras

Os ovários (n=10) de vacas da raça Nelore com idade igual e/ou superior a 24 meses, foram 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. Os mesmos foram seccionados, originando oito fragmentos do córtex ovariano de aproximadamente 9 mm<sup>3</sup> e distribuídos aos seguintes tratamentos: controle fresco (Co); 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; 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. Os fragmentos do grupo controle fresco, toxicidade e vitrificação (pós-descongelamento) foram posteriormente fixados 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.

### Exposição e Vitrificação

Quatro fragmentos destinados a exposição aos crioprotetores 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 + 0,25M de Sacarose; (TR) SBV + 10µM de Resveratrol e (TS+R) com SBV + 0,25M de Sacarose e 10µM de Resveratrol, por cinco minutos em temperatura ambiente (25 °C) e distribuídos aos procedimentos de fixação (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os três fragmentos de tecido ovarianos destinados a vitrificação foram inicialmente imersos em Solução Base de Vitrificação (SBV) composta de Meio 199 (500mL; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) suplementado com 10mg/mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) (10 mg; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.), 10% de Etileno glicol (EG) (500mL; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (500mL; 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 (500mg/99,5%; Sigma-Aldrich Brasil Ltda.) (VS), Vitrificação com 10µM Resveratrol (20mg; 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). Logo, os fragmentos ovarianos foram colocados em criotubos, imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos a -196 °C.

### Aquecimento e Análise morfológica

Após sete dias, os criotubos foram retirados do botijão e expostos a temperatura ambiente (25 °C) por 30 segundos e imediatamente imersos em banho-maria a 37 °C por 1 minuto (CARVALHO *et al.*, 2014). Os crioprotetores foram removidos dos fragmentos em duas etapas, uma contendo SBV adicionadas as concentrações de 25 M de Sacarose e/ou 10µM de Resveratrol, e somente SBV por cinco minutos. Para avaliação da morfologia folicular, os fragmentos dos tecidos ovarianos foram submetidos à histologia clássica, as lâminas foram submetidas à coloração com hematoxilina/eosina (HE), e analisadas utilizando microscopia de luz (ICC50 HD) em magnificação de 400 vezes e as imagens capturadas pelo Leica Software Imaging, Wetzlar, Alemanha.

### **Análise Estatística**

A porcentagem de folículos normais e degenerados foram analisados pelo teste de Qui-quadrado. As variáveis que não passaram pelo teste de normalidade, foram submetidos ao teste de Fisher, com  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico InfoStat Statistical Software (INFOSTAT, 2012).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram avaliados, por microscopia de luz, 1.305 folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano, resultantes de 40 fragmentos do córtex ovariano de fêmeas adultas ( $n=10$ ), os quais apresentavam distribuição percentual em normais e degenerados de 51,40% e 48,60 % respectivamente, nos diferentes tratamentos por ovário. No tocante aos tratamentos de toxicidade (Tab. 01), os resultados demonstram que os crioprotetores utilizados apresentaram efeito tóxico ao tecido ovariano no tempo e nas concentrações utilizadas ( $p < 0,05$ ), sugerindo que o tratamento contendo o crioprotetores sacarose e antioxidante resveratrol promova danos sobre a morfologia de folículos pré-antrais de fêmeas adultas, uma vez que os folículos expostos não seguiram um padrão morfológico semelhante ao controle.

Considerando os diferentes tratamentos de vitrificação (VS, VR, VS+R) e o controle fresco observou-se 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. Ainda os resultados deste trabalho corroboram aos obtidos por Rocha *et al.* (2018), que ressaltam a importância de se realizar mais estudos utilizando resveratrol e/ou outras substâncias antioxidantes sobre a vitrificação de folículos pré-antrais bovinos, atribuindo a necessidade mais pesquisas sobre seus efeitos protetores, afim de consolidar sua ação com um agente crioprotetor.

No entanto, os resultados aqui apresentados demonstram que a técnica de congelamento por vitrificação é eficiente em manter a integridade morfológica dos folículos pré-antrais de vacas, mas as concentrações dos crioprotetores utilizados precisam ser reavaliados. O que conclui que a associação antioxidante natural resveratrol a sacarose em protocolos de vitrificação e reaquecimento contribuem com ressalvas na criopreservação morfológica de folículos pré-antrais de vacas.

**Tabela 01:** Percentual médio ( $\pm$ DP) de folículos ovarianos pré-antrais normais de fêmeas

bovinas após serem submetidos a diferentes tratamentos: controle fresco (Co), toxicidade (T0, TS, TR, TS+R).

Tratamentos	Folículos pré-antrais (%)
Co	41,97±10,54 <sup>a</sup>
T0	14,10±3,54 <sup>b</sup>
TS	12,86±2,55 <sup>b</sup>
TR	8,19±1,89 <sup>b</sup>
TS+R	7,14 ± 1,89 <sup>b</sup>

Letras diferente nas colunas =  $p < 0,05$  pelo teste de Fisher entre toxicidade; (Co) = Controle fresco; (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.

## REFERÊNCIAS

- 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, n.30, p.140-147, 2014.
- DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.3, p.149-159, 2010.
- 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, n.13, p.1-13, 2015.
- 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  $\alpha$ -tocopherol. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.3, p.209-215, 2016.
- 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, n.7, p.244-251, 2018.
- 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 Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.40, n.4, p.188-193, 2016.
- TAKEO, S.; SATO, D.; KIMURA, K.; MONJI, Y.; KUWAYAMA, T.; KAWAHARA-MIKI, R.; IWATA, H. Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization outcome of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, v.60, n.2, p.92-99. 2014.