



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

LUCIANA MASCENA SILVA

Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino: Uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo

FORTALEZA

2017

LUCIANA MASCENA SILVA

Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino: Uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Fisiologia e biotecnologia da reprodução.

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S1a SILVA, LUCIANA MASCENA.

Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino: Uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo / LUCIANA MASCENA SILVA. – 2017.
120 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. ANA PAULA RIBEIRO RODRIGUES.

Coorientação: Prof. Dr. GIOVANNA QUINTINO RODRIGUES.

1. VITRIFICAÇÃO . 2. FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS. 3. ANTIOXIDANTES. 4.
MITOCÔNDRIAS. 5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO. I. Título.

CDD 611

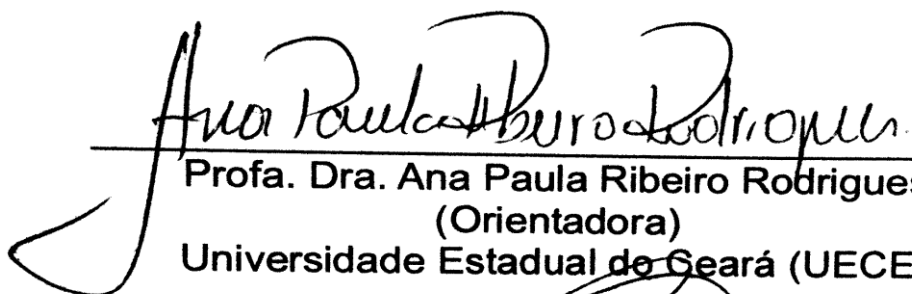
LUCIANA MASCENA SILVA

Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino: Uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo

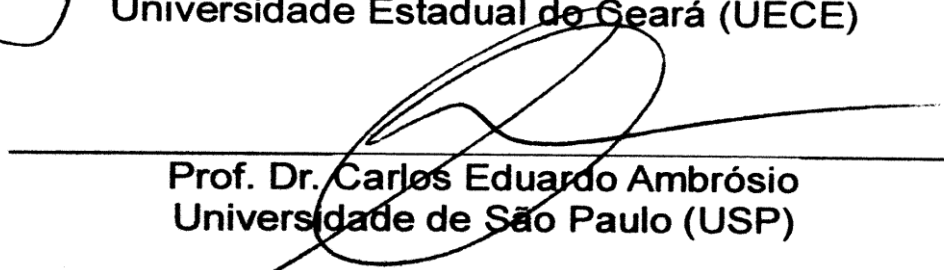
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do Departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução.

Aprovada em: ___/___/___.

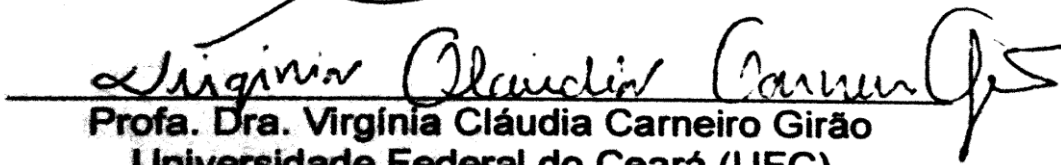
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues
(Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio
Universidade de São Paulo (USP)



Prof. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico a realização desse sonho, primeiramente a Deus, por ter me concedido força, saúde e fé nessa caminhada. À minha família, pois é onde tudo começa, principalmente o incentivo; a minha orientadora, por ter confiado em mim e por sempre ter me tratado com respeito e atenção. Aos meus amigos, por terem tornado o fardo mais leve em muitos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por minha saúde e por estar sempre comigo, me mantendo de pé, me fazendo não desanimar, tornando assim esse meu sonho em realidade.

À minha família que é a base, meu refúgio, é com eles que sempre estive nos poucos momentos de folga e, agradeço a compreensão por vários momentos que estive ausente.

À Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, que além da excelente orientação, reflexões, críticas e sugestões, se fez amiga durante esse tempo. O meu, muito obrigada pelo respeito com que me tratou e pela confiança que depositou em meu trabalho, pois me deu ânimo e me fez ter a certeza que nossa capacidade vai além do que imaginamos.

A Dra. Giovanna Quintino que me co-orientou com seriedade e muito zelo na correção da minha escrita.

Ao Prof. Dr. Ricardo Figueiredo, por ter me recebido em seu laboratório, pelas ótimas contribuições nos workshops e seminários e pelo seu exemplo de sabedoria e mansidão.

Aos participantes da banca examinadora da minha qualificação, professor Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e Dra. Giovanna Quintino Rodrigues, e aos participantes da banca da defesa, Professor Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão e Dra. Jamily Bezerra Bruno pelo tempo disponibilizado e pelas valiosas contribuições.

Ao Sr. João Batista e ao Cesar Camelo pelo carinho que sempre tiveram comigo, me tratando como filha, oferecendo lanches e fazendo eu me sentir cuidada.

À Laritza Lima e Denise Guerreiro, por terem me auxiliado na execução da técnica de imunofluorescência.

Ao amigo, Gildas Mbemya Tetaping, que além de ter me ajudado na execução dos experimentos, pacientemente me ajudou na formatação e tradução deste documento.

A todos os colegas do Lamofopa, a todos mesmo! Pois em algum momento, todos contribuíram para a minha aprendizagem. Em especial a minha querida equipe (Daniele Callado, Denise Guerreiro, Gildas Mbemya

Tetaping, Giovanna Quintino, Jamily Bezerra, Luana Gaudêncio e Nathalie Donfack) que participaram diretamente desse trabalho.

Ao Benner Geraldo, por ter me ajudado com tamanha presteza com as análises estatística.

Aos meus amigos do grupo de oração do Lamofopa (Andrea Moreira, Erika Leal, Daniela Pires Julian Pontes, Kayse Matos, Leo Nascimento, Luana Gaudênio, Marcela Paz e Naiza Arcângela), que em muitos momentos, foram com eles que encontrei conforto com a palavra do Senhor, me fazendo lembrar que Deus é bom o tempo todo e, que não devemos desanimar.

Aos alunos da iniciação científica que nunca hesitaram em ajudar, em especial à Leticia Ferreira que me ajudou na coloração das lâminas e ao Gabriel da Silva, que além disso, me ajudou também a organizar as referências deste documento.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, em especial à professora Gerly Anne Brito, pelo apoio concedido e, à Laísa Albuquerque, pela sua disponibilidade de sempre.

A equipe do Núcleo de estudos em microscopia e processamento de imagem (NEMPI) pela excelente recepção que sempre tiveram para comigo e pela ajuda com a análise histológica.

A minha amiga Josiane Martins, que sempre me incentivou com muito carinho a realizar o mestrado.

Aos meus amigos, dos quais me distanciei devido às atividades do mestrado, o meu muito obrigada, pois também fazem parte da minha caminhada.

À professora Virginia Girão, Rebeca Rocha e Anelise Alves, pela dedicação em tentar realizar a análise ultraestrutural.

À central analítica, pela realização das imagens no confocal, em especial a Rose Freire, técnica responsável.

Aos órgãos de fomento, Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa auxílio e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

O que escrevi acima, ainda não foi suficiente para agradecer com o devido merecimento a todos que me ajudaram nessa intensa caminhada e, isso mostra que ninguém chega a lugar nenhum sozinho.

*"Se não puder voar, corra,
Se não puder correr, ande,
Se não puder andar, rasteje,
mas, continue em frente
de qualquer jeito."*

Martin Luther King

RESUMO

A vitrificação do tecido ovariano antes de tratamentos gonadotóxicos é uma alternativa para a preservação da reserva folicular, visando o reimplante futuro e conseqüentemente, a restauração da fertilidade feminina. No entanto, o processo de vitrificação causa alguns danos que precisam ser minimizados. Desta forma, o objetivo desse estudo foi verificar o efeito da catalase e o ácido alfa lipóico em diferentes concentrações para reduzir geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), visando obter menos danos sobre a morfologia e desenvolvimento folicular, densidade das células do estroma, alterações no DNA dos folículos pré-antrais ovinos, bem como atividade mitocondrial. Para isso, fragmentos de ovários ovinos foram distribuídos em 9 tratamentos: (1) fresco ou controle; (2) incubado por 24h - INC; (3) vitrificados sem antioxidantes (SAA) ou na presença de catalase (CAT) nas concentrações de (4) 10 - CAT10; (5) 20 - CAT20 ou (6) 40 - CAT40 UI/ml ou ainda na presença de ALA nas concentrações de (7) 25 - ALA25; (8) 50 - ALA50 ou (9) 100 ALA100 μ M/ml. Após a vitrificação todos os fragmentos foram aquecidos e também incubados por 24 horas e foram avaliados quanto à morfologia e desenvolvimento folicular, bem como quanto aos níveis de ROS no meio de incubação. Posteriormente, apenas fragmentos dos grupos controle, INC, SAA, CAT40 e ALA100 foram analisados quanto à densidade das células do estroma, danos no DNA (teste TUNEL e fosforilação da H2AX), níveis de ROS e função mitocondrial dos folículos no tecido ovariano. Os dados foram submetidos ao pacote estatístico SAS, e de acordo com o comportamento dos mesmos os testes foram escolhidos e aplicados, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$. Ao contrário de outros tratamentos, a porcentagem de folículos morfológicamente normais no tecido ovariano vitrificado na presença de ALA em todas as concentrações, não diferiu do tecido fresco. A porcentagem de folículos em desenvolvimento foi maior em ALA 100 μ M/mL do que aquelas encontradas no tecido incubado ou vitrificado com catalase (40 UI/mL) e ALA (25 ou 50 μ M/mL). Entretanto, apesar do ALA na concentração de 100 μ M/mL ter mantido a atividade mitocondrial, não foi suficiente para controlar a produção de ROS intracelular. O uso de catalase afetou significativamente os níveis de ROS (10 e 20 UI/mL), a densidade das células do estroma, bem como o dano do DNA revelado por γ H2AX (40 IU/mL). A vitrificação de tecido ovariano ovino na presença de 100 μ M/mL de ALA preservou a morfologia, promoveu o desenvolvimento e causou menos danos ao DNA dos folículos pré-antrais. Apesar dos resultados satisfatórios do presente estudo, é fundamental a realização de novos estudos para definir a concentração ideal de ALA, de modo a favorecer todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Vitrificação, folículos pré-antrais, antioxidantes, mitocôndrias, ROS, ovelha.

ABSTRACT

Vitrification of ovarian tissue prior to gonadotoxic treatments is an alternative to preserve follicular reserve, with the aim of subsequent reimplantation and consequently, restoration of female fertility. However, the vitrification process causes some damage which should be minimize. Thus, Therefore, the objective of this study was to verify the catalase and alpha lipoic acid in different concentrations to reduce generation of reactive oxygen species (ROS), aiming to obtain less damage on follicular morphology and development, stromal cell density, alterations in the DNA, as well as mitochondrial activity of ovine preantral follicles. To achieved this objective, sheep ovarian fragments were distributed in 9 treatments: (1) fresh or control; (2) incubated for 24h (INC); (3) vitrified without antioxidants (SAA) or in the presence of catalase (CAT) at concentrations of (4) 10 - CAT10; (5) 20 - CAT20 or (6) 40 - CAT40 IU / ml or in the presence of ALA at concentrations of (7) 25 - ALA25; (8) 50-ALA50 or (9) 100 μ M / ml (ALA100). After vitrification, all the fragments were warmed followed by incubation for 24 hours, finally, morphology and follicular development as well as ROS levels in the incubation medium were evaluated. Afterwards, the fragments of control, INC, SAA, CAT40 and ALA100 groups were analyzed for stromal cell density, DNA damage (TUNEL test and H2AX phosphorylation), ROS levels and mitochondrial function. The data were submitted to the statistical package SAS, and according to the behavior of the data and the differences were considered significant different when $P < 0.05$. Unlike the other treatments, the percentage of morphologically normal follicles in the ALA groups with all the concentrations did not differ from the fresh tissue. Moreover, the percentage of developing follicles was higher in ALA100 than those found in the CAT40, ALA25 and ALA50 groups. However, whilst the treatment ALA100 maintained mitochondrial activity, it was not sufficient to control intracellular ROS production. In contrast, the treatments CAT10 and CAT20 significantly affected the ROS levels, stromal cell density as well as DNA damage revealed by γ H2AX (CAT40). Additionally, the ovarian morphology was well preserved ALA100. It also promoted follicular development and caused less damage to the DNA of the preantral follicles. Despite the satisfactory results of the present study, it is fundamental to carry out new studies to define the ideal ALA concentration, in order to improve all the parameters evaluated.

Keywords: Vitrification, preantral follicles, antioxidants, mitochondria, ROS and sheep.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 - Esquema ilustrativo do ovário de mamíferos, destacando os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento..... 22

Figura 2 - Classificação dos folículos ovarianos de acordo com a sua morfologia em pré-antrais (primordiais, transição, primários e secundários) e antrais (terciários e pré- ovulatórios).....24

Figura 3 - Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) com suas três diferentes partes constituintes (a) base, (b) insert, (c) tampa, (D) fechamento do OTC e (E) imersão do OTC no nitrogênio.....28

Metodologia

Figura 4 – Desenho experimental das etapas 1 e 2.....41

Figura 5 – Vitrificação e Aquecimento.....42

Resultados

Figura 6 - Imagens representativas da morfologia dos folículos pré-antrais ovinos, após coloração com ácido periódico Schiff-hematoxilina. Folículos normais são mostrados no controle (A), INC (B), CAT40 (C) e ALA100 (D), enquanto folículos degenerados estão representados em SAA (E), CAT10 (F) e ALA25 (G). Observa-se o oócito retraído com núcleo picnótico e células da granulosa desorganizadas (E), (F) e (G). O: oócito; Nu: núcleo do oócito; Cg: células da granulosa (400 x).....47

Figura 7 - Morfologia normal em tecido ovariano fresco (controle), incubado (INC) ou vitrificado sem (SAA) ou com agentes antioxidantes (CAT ou ALA).....48

Figura 8 – Desenvolvimento folicular em tecido ovariano fresco (controle),

incubado (INC) ou vitrificado sem (SAA) ou com antioxidantes (CAT ou ALA).....50

Figura 9 - Imagens representativas do estroma ovariano ovino (A) Controle, (B) INC, (C) SAA, (D) CAT40 e (E) ALA100. Na imagem (D), CAT40, observa-se uma redução da densidade das células do estroma.....50

Figura 10 - Níveis (Média±SE) de espécies reativas de oxigênio (unidades de fluorescência relativas) produzida por fragmentos de tecido ovariano após vitrificação e incubação durante 24 horas.....51

Figura 11 - Imagens representativas da Imunodeteção da proteína H2AXph139 (cores verdes fluorescentes) em folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de ovelha. (A) Controle negativo, (B) Controle, (C) INC, (D) SAA, (E) CAT40, (F) CAT100. Exceto no controle negativo, é possível observar focos verde fluorescente nos folículos, indicados pela seta branca.....52

Figura 12 - Imagens representativas da análise de morte celular por apoptose em folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano ovino, através da técnica de TUNEL. (A) Controle negativo, (B) Controle positivo, (C) Folículos frescos, (D) Folículos INC (E), Folículos vitrificados SAA, (F) Folículos vitrificados com CAT e (G) Folículos vitrificados com ALA.....53

Figura 13 - Imagens representativas obtidas por microscopia confocal do córtex ovariano incubadas com as sondas Mitotracker orange e DCFH-DA. Nas imagens superiores (A-E), observa-se a fluorescência vermelha do mitotracker nos folículos do controle (A), INC (B), SAA (C), CAT40 (D) e ALA100 (E). Nas imagens do meio, observa-se a fluorescência verde do DCF em folículos do controle (F), INC (G), SAA (H), CAT40 (I) e ALA100 (J). Nas imagens inferiores revelaram a colocalização das duas sondas Mitotracker com DCFH-DA (L-P)54

Figura 14 - Quantificação da atividade mitocondrial através da intensidade de fluorescência da sonda Mitotracker (A) e níveis de ROS intracelulares através da intensidade de fluorescência do DCFH-DA (B) nos grupos controle, INC e vitrificado SAA e com CAT ou ALA. Os valores foram expressos como unidades de fluorescência (Média \pm SE); Diferentes letras indicam diferença estatística ($P < 0,05$).....55

Figura 15 - Correlação entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de ROS. Cada ponto do gráfico representa uma amostra de tecido ovariano ($n = 30$), $r = 0,58$; $P = 0,001$56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da associação entre os tratamentos incubado ou vitrificado sem (SAA) ou com agentes antioxidantes (CAT ou ALA).....49

Tabela 2 - Porcentagem de folículos pré-antrais com focos de γ H2AX e sinal positivo para TUNEL (MÉDIA \pm SEM) e densidade das células do estroma (MÉDIA \pm SEM) nos grupos controle, INC e vitrificados na ausência (SAA) ou presença de antioxidants (CAT or ALA).....54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Padrão de distribuição mitocondrial em oócitos e folículos de alguns mamíferos.	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido Alfa Lipóico
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
CGP	Células Germinativas Primordiais
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EG	Etilenoglicol
FOPA	Folículos Ovarianos Pré-antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GPx4	Glutaciona Peroxidase 4
GSH	Glutaciona
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HClO	Ácido Hipocloroso
KL	Kit Ligant
LH	Hormônio Luteinizante
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
mtDNA	DNA mitocondrial
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
O₂⁻	Ânio Superóxido
OH[•]	Radical Hidroxila
OTC	Ovarian Tissue Cryosystem
POF	Premature Ovarian Failure
RNA	Ácido Ribonucleico
RO	Alcoxila
ROO	Peroxila
ROS	Reactive Oxygen Species
SAC	Sacarose
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Arquitetura e função do ovário de mamíferos.....	21
2.2 Oogênese e Foliculogênese	22
2.3 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA.....	24
2.4 Criopreservação do tecido ovariano.....	26
2.4.1 Vitrificação	27
2.5 Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	28
2.6 Agentes Antioxidantes	30
2.6.1 Catalase (CAT)	31
2.6.2 Ácido Alfa Lipóico (ALA)	31
2.7 Mitocôndrias	32
2.8 Proteína sinalizadora de danos (H2AX)	34
2.9 Detecção de apoptose (TUNEL)	35
3. JUSTIFICATIVA	35
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	38
5. OBJETIVOS	39
5.1 Geral.....	39
5.2 Específicos	39
6. MATERIAIS E MÉTODOS	40
6.1 Ovários e desenho experimental.....	40
6.2. Procedimento de vitrificação e aquecimento	41
6.3 Incubação	43
6.4 Morfologia e desenvolvimento folicular	43
6.5 Níveis de ROS no meio de incubação.....	44
6.6 Densidade das células do estroma	44
6.7 Coloração γ H2AX para detecção de danos ao DNA	44
6.8 Análise de fragmentação do DNA para a detecção de células apoptóticas	45
6.9 Atividade mitocondrial e níveis intracelulares de ROS	45
6.10 Análise estatística	46
7. Resultados	47

7.1 Morfologia folicular	47
7.2 Análise de associação entre os tratamentos	48
7.3 Desenvolvimento folicular	49
7.4 Níveis de ROS no meio de incubação.....	50
7.5 Densidade das células do estroma	51
7.6 Detecção de focos Gamma H2AX em folículos pré-antrais.....	52
7.7 Avaliação da fragmentação do DNA pelo TUNEL	53
7.8 Atividade mitocondrial e níveis intracelular de ROS	54
8. Discussão.....	56
9. Conclusão	61
10. Perspectivas.....	62
Referências	63
ANEXO.....	84

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovariano tem ganhado destaque na reprodução assistida, por salvaguardar um grande número de oócitos imaturos (DELA PENA et al., 2002) e preservar a integridade estrutural e funcional do ovário, garantindo a restauração das funções esteroidogênica e gametogênica (POSILLICO et al., 2010). Diferentemente da criopreservação de oócitos maduros ou embriões, cuja recuperação só é possível após tratamento hormonal prévio de mulheres ou animais púberes, a criopreservação do ovário pode ser realizada em qualquer fase da vida da fêmea sem requerer tratamento hormonal. Isso se caracteriza em uma grande vantagem dessa técnica, permitindo, portanto, que o material genético de espécies animais ou mesmo da espécie humana, seja preservado na fase pré-púbere ou impúbere (HUANG et al., 2008) ou mesmo de mulheres que necessitam iniciar imediatamente um tratamento gonadotóxico. A criopreservação de ovário pode ser realizada utilizando um método radical de redução da temperatura na presença de altas concentrações de agentes crioprotetores, sem a formação de cristais de gelo, conhecido como vitrificação.

Diferentemente, da congelação lenta, a vitrificação além de evitar a formação intracelular de gelo, é um método rápido, de fácil execução e de baixo custo. No entanto, como qualquer exposição de um material biológico a temperaturas extremamente baixas, a vitrificação pode levar a um desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS). ROS são moléculas instáveis derivadas do oxigênio e tendem a reagir com inúmeros componentes celulares como proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico (DNA).

Moléculas como os radicais, anion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causam danos às membranas celulares, como a membrana mitocondrial, levando ao processo de apoptose e, conseqüentemente fragmentação do DNA (LARMAN et al., 2007; HUANG et al., 2008; COTICCHIO et al., 2009; TATONE et al., 2010). Em mitocôndrias estrutural e funcionalmente intactas, uma grande capacidade de defesa antioxidante equilibra a produção de ROS, portanto, danos mitocondriais com decréscimo na capacidade de defesa antioxidante é um forte pré-requisito para a produção desses radicais. Uma vez que isso ocorra, um ciclo vicioso pode ser estabelecido, ou seja, as ROS danificam a

membrana mitocondrial, causando mais produção de radicais livres e perda da capacidade antioxidante (LIN e BEAL et al., 2006). *In vivo* a geração de ROS é equilibrada pelo sistema de defesa de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (AGARWAL et al., 2005; 2006), porém, *in vitro*, a falta desse sistema de defesa fisiológica, pode levar ao estresse oxidativo (BEDAIWY et al., 2004; SAJAL et al., 2010). Para reduzir a formação de ROS *in vitro*, estudos utilizando diferentes tipos de antioxidantes vêm sendo realizados (AGARWAL et al., 2006). Dentre os antioxidantes já utilizados antes ou após a criopreservação de células reprodutoras femininas, podemos citar a catalase (DINARA et al., 2001, LUZ et al., 2012, CARVALHO et al., 2014) e o ácido alfa lipóico (HATAMI et al., 2014a,b).

A catalase é uma enzima que, em mamíferos, localiza-se no peroxissomo e, uma de suas funções é catalisar o H_2O_2 em oxigênio molecular e água e ($2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$), reduzindo o risco de formação do radical hidroxila (NORDBERG; ARNER 2001), que pode levar à inativação ou mutação do DNA e inativação de várias proteínas de membrana (HALLIWELL et al., 1986). Um estudo envolvendo a criopreservação de ovário caprino mostrou que a ausência de catalase nas soluções de vitrificação, resultou em uma maior produção de ROS comparado ao tecido ovariano fresco ou não vitrificado. Nesse estudo, para uma melhor preservação do tecido ovariano, os autores recomendaram a utilização desse antioxidante na solução de vitrificação (CARVALHO et al., 2014).

Conforme mencionado acima, o ácido alfa lipóico, também tem sido bastante utilizado em estudos *in vitro* com a finalidade de proteger as células dos efeitos nefastos da produção de ROS. O ácido alfa lipóico, é uma coenzima do complexo multienzimático mitocondrial que possui propriedades antioxidantes que agem diretamente na eliminação de ROS e indiretamente sobre a reciclagem intracelular de outros antioxidantes (PACKER et al., 1995; 1997). Embora, não existam relatos da sua utilização em protocolos de vitrificação de ovário, no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos de camundongos, essa substância foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante (TALEBI et al., 2012). Além disso, quando adicionado no meio de maturação, melhorou a capacidade de desenvolvimento dos oócitos de cabras, através da inibição de ativadores apoptóticos, acelerando a síntese de glutathione (GSH), glutathione peroxidase 4 (GPx4) e superóxido dismutase (SOD), conseqüentemente, reduzindo o estresse oxidativo (ZHANG et al., 2013).

Considerando a importância da criopreservação do tecido ovariano para a

preservação da fertilidade e capacidade reprodutiva de fêmeas, bem como a produção de ROS durante a exposição de materiais biológicos a baixas temperaturas, a revisão de literatura a seguir, poderá auxiliar no entendimento da relevância da execução do presente estudo.

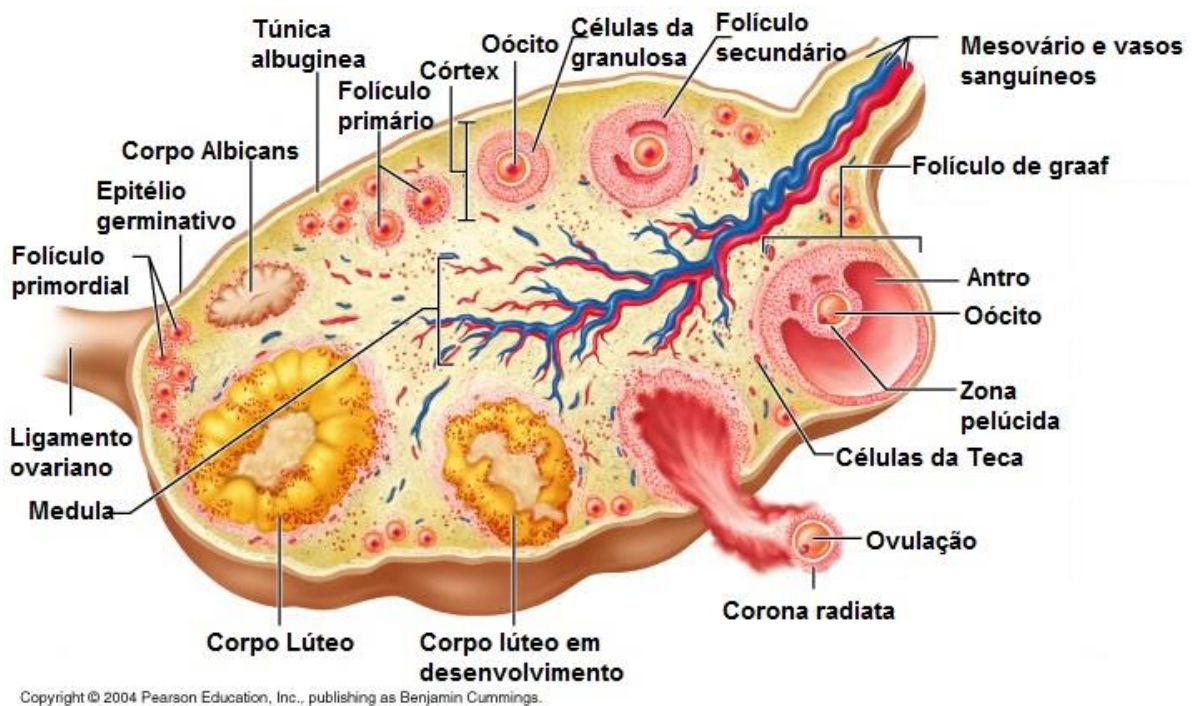
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Arquitetura e função do ovário de mamíferos

Até a descoberta de que os folículos ovarianos são a origem dos óvulos, também conhecidos como oócitos, a importância desse órgão para a reprodução de mamíferos não era reconhecida. Estranhamente conhecido como o “testículo da fêmea”, antes do século XVI, o ovário era considerado meramente como uma estrutura insignificante para a geração de espécies ou uma glândula que produzia “sêmen” feminino. Felizmente, a revelação da habilidade de produção de oócitos e a capacidade endócrina do ovário transformou a visão dos cientistas sobre o seu papel na reprodução. Desde então o ovário se transformou na peça central do sistema reprodutivo (LIU et al., 2010).

Nos mamíferos, o ovário é constituído por duas regiões, cortical e medular, circundado por uma superfície epitelial, chamada epitélio germinativo, como representado na figura 1. A região cortical localizada externamente (com exceção dos equídeos, nos quais é localizada internamente) é composta de tecido conjuntivo (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, albicans e hemorrágicos. A região medular está localizada internamente, sendo constituída por células musculares lisas, nervos, artérias e veias que se estendem para o córtex ovariano, responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A base estrutural e funcional do ovário ou gônada feminina é estabelecida ainda durante o desenvolvimento embrionário, sendo sua principal função a diferenciação e liberação do oócito maturo (função exócrina) para a fertilização e propagação com sucesso das espécies. Adicionalmente, o ovário é responsável pela síntese e secreção de hormônios (função endócrina) que são essenciais para o desenvolvimento folicular; ciclicidade (estral e menstrual); manutenção do trato reprodutivo (McGEE e HSUEH, 2000) e, ainda das características sexuais secundárias da fêmea; suporte da gestação e manutenção de funções metabólicas. As funções exócrina e endócrina do ovário mamífero são integradas em um processo contínuo e repetitivo de desenvolvimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo (ADHIKARI e LIU, 2009) que envolvem os processos de oogênese e foliculogênese, os quais estão resumidamente descritos a seguir.

Figura 1- Esquema ilustrativo do ovário de mamíferos, destacando os folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento.



Fonte: Adaptado de <http://learninghumananatomy.com/reproductive-systems/>

2.2 Oogênese e Foliculogênese

A oogênese consiste no conjunto de eventos compreendidos entre o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea, passando pelo estágio de oogônias até a formação do oócito haplóide fecundado (FIGUEIREDO et al., 2008). Em mamíferos a oogênese inicia-se na vida fetal, ainda quando a gônada indiferenciada contém inicialmente os cordões sexuais primários, que posteriormente degeneram e são substituídos por cordões sexuais secundários, que, posteriormente darão origem às células foliculares que circundarão as oogônias individuais. As oogônias, por sua vez, entram na prófase da meiose I para então se tornarem estruturas conhecidas como oócitos I ou primários, que estacionam na prófase da meiose I após o término da troca entre cromátides não irmãs de cromossomos homólogos. A permanência do oócito nessa fase da meiose I continua até a puberdade, quando os folículos ovarianos são recrutados para iniciar seu desenvolvimento, dando início, portanto ao processo de foliculogênese. O processo de foliculogênese, compreende a formação, crescimento

e maturação folicular, sendo o folículo a unidade morfofuncional do ovário que proporciona um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (FIGUEIREDO et al., 2008). Os folículos ovarianos estão divididos em duas grandes categorias, ou seja, os *folículos pré-antrais* e *folículos antrais*, de acordo com a ausência ou presença, respectivamente, de uma cavidade repleta de líquido denominada, *antro*.

Os folículos pré-antrais são divididos em diferentes estágios, de acordo com a morfologia e o número de células da granulosa em: *primordial*, *transição*, *primário* e *secundário*. Após a formação dos oócitos primários, os mesmos são circundados por uma única camada de células somáticas de formato pavimentoso, conhecidas como células da pré-granulosa, formando os folículos primordiais (Figura 2), os quais permanecem em estágio de quiêscência até iniciarem o seu crescimento e representam a reserva folicular ovariana (VAN DEN HURK et al., 2005).

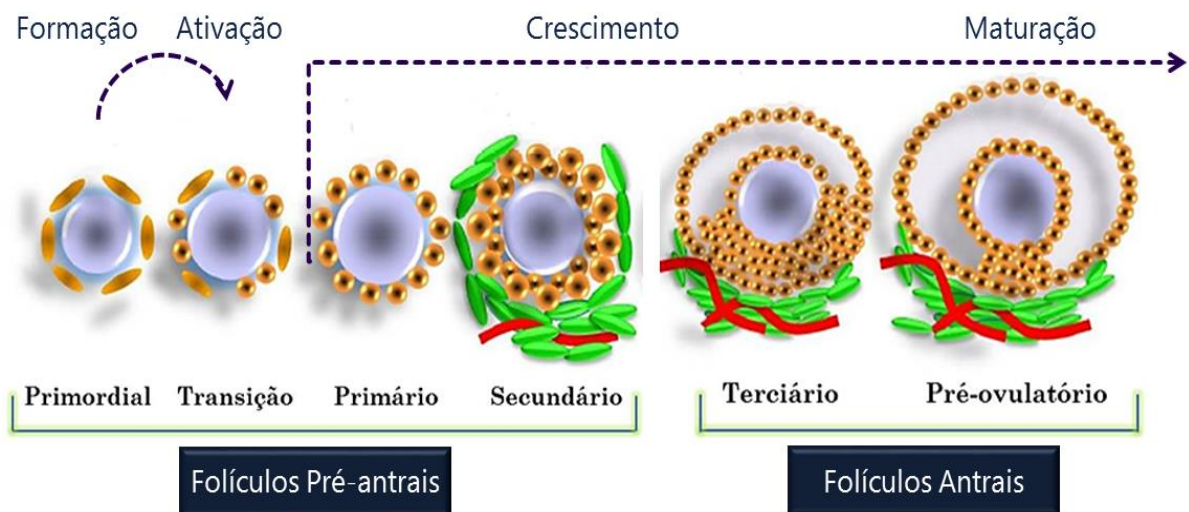
Os *folículos primordiais* estão localizados na região periférica do córtex do ovário, onde se encontram em estágio de quiescência ou repouso (*pool* de reserva) e compreendem 90% da população folicular. Esses folículos possuem um oócito imaturo no centro, circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso, demarcado por uma membrana basal que os separa do estroma ovariano. Quando os folículos primordiais deixam o *pool* de reserva, iniciam seu crescimento e se tornam ativados, os folículos apresentam células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico, sendo este denominado de *folículos de transição* (SILVA, 2005). Os *folículos primários*, por sua vez, são circundados por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico. À medida que o folículo se desenvolve e cresce, ocorre proliferação das células da granulosa e quando há formação de duas ou mais camadas de células de formato cúbico sem formação de antro, os folículos passam a ser denominados de *folículos secundários*.

Dentre as mudanças que caracterizam esta fase do desenvolvimento, além da multiplicação das células da granulosa, observa-se o aumento no diâmetro do oócito, formação da membrana basal e aparecimento das células da teca (KNIGHT & GLISTER 2006; BARNETT et al., 2006). A partir desse estágio, ocorre intensa proliferação das células da granulosa, e com o crescimento intenso do folículo, inicia-se então a formação da cavidade antral. Nesse estágio de desenvolvimento, os folículos são denominados de *folículos antrais* ou *terciários* e caracterizados pela vascularização folicular, porém ainda com um oócito imaturo. Após a formação do

antro, continua a proliferação das células da granulosa e da teca, aumenta a vascularização, o crescimento oocitário, bem como do antro. Por ocasião da puberdade e produção das gonadotrofinas (FSH e LH), os oócitos se tornam maduros e o folículo, finalmente se torna pré-ovulatório (folículo de Graaf) e é destinado à ovulação (BARNETT et al., 2006; DHARMA et al., 2009).

É importante destacar que os folículos pré-antrais, além de constituírem o maior contingente de folículos no ovário, são mais resistentes aos fatores que levam à atresia ou morte folicular. Em função disso, na década de 90, Figueiredo (1995), estabeleceu uma técnica de reprodução assistida, utilizando ovários bovinos, denominada Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), a qual está descrita no tópico a seguir.

Figura 2 - Classificação dos folículos ovarianos de acordo com a sua morfologia em pré-antrais (primordiais, transição, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios). (Figueiredo et al., 2008).



2.3 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA

A MOIFOPA é uma técnica que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, visando a conservação e estocagem desses folículos por curto (resfriamento) ou longo (criopreservação) período, bem como o cultivo *in vitro*, o qual tem como finalidade promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. Dessa

forma, pode-se dizer que a MOIFOPA é de grande importância, não somente para a pesquisa fundamental, como para as técnicas de reprodução assistida.

No tocante à pesquisa fundamental ou básica, a MOIFOPA tem contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos relacionados à foliculogênese na fase pré-antral. O cultivo de folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano ou *in situ* tem sido importante para o entendimento dos mecanismos relacionados à ativação de folículos primordiais e do crescimento de folículos primários e secundários em várias espécies (bovinos: McLAUGHLIN & TELFER, 2010; ovinos: LIMA et al., 2013; humanos: DING et al., 2010; caprinos: CELESTINO et al., 2009).

O estudo da foliculogênese pré-antral também pode ser realizado através do cultivo de folículos pré-antrais isolados, em especial, dos folículos secundários (LUZ et al., 2012; LUNARDI et al., 2015; LINS et al., 2017), os quais são maiores e mais fáceis de serem extraídos do tecido ovariano. Vários estudos, inclusive em ovelhas (LUNARDI et al., 2016) tem mostrado que folículos secundários cultivados *in vitro* por até 18 dias, formam o antro e são capazes de fornecer oócitos potencialmente maturáveis.

No que se refere aos avanços dessa biotécnica, já foi relatado o nascimento de camundongos após a transferência de embriões produzidos a partir de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (O'BRIEN et al., 2003). Por outro lado, em animais de produção, como bubalinos (GUPTA et al., 2008), caprinos (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011) e ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010), até o presente momento, apenas embriões foram produzidos a partir de folículos pré-antrais, indicando que nessas espécies muitos avanços ainda são necessários para tornar a MOIFOPA uma técnica de aplicação imediata.

No que diz respeito à criopreservação de folículos pré-antrais isolados, isto é, fora do ambiente ovariano, na espécie ovina os resultados mais significativos foram reportados recentemente por uma equipe do Laboratório de Manipulação de Oócitos de Folículos Ovarianos Pré-Antrais (Lamofopa), demonstrando que folículos secundários previamente criopreservados podem se desenvolver até o estágio antral quando cultivados *in vitro* por até 6 dias. No ano seguinte, esses mesmos autores aumentaram o período de cultivo desses folículos de 6 para 18 dias e relataram o crescimento folicular, bem como, oócitos até o estágio de maturação (meiose II). Esses resultados são de grande relevância, pois representam uma alternativa

promissora para aqueles casos em que não é possível ou recomendável a retomada da função reprodutiva, através do transplante do tecido ovariano.

Em contrapartida, a criopreservação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano, já tem sido descrita com muito sucesso tanto em animais domésticos, como na espécie humana. Após o primeiro registro de sucesso no mundo, o qual ocorreu em ovinos (GOSDEN et al., 1994), várias equipes já relataram o nascimento de indivíduos saudáveis após o transplante de ovário previamente criopreservado em humanos, espécie na qual já foram relatados mais de 60 nascimentos de indivíduos normais (DONNEZ & DOLMANS et al., 2015). Esses relatos denotam que, apesar da criopreservação e transplante de tecido ovariano ainda ser considerada como uma técnica experimental, para algumas equipes, já é uma realidade, como poderemos ver nos tópicos a seguir.

2.4 Criopreservação do tecido ovariano

A reserva folicular, ou seja, o capital de folículos ovarianos é substancialmente reduzida ao longo da vida reprodutiva, de forma natural ou mesmo devido a alguns transtornos reprodutivos ou ainda em decorrência da radio e/ou quimioterapia para o tratamento do câncer. No entanto, em alguns casos, a função ovariana e reprodutiva pode ser preservada ou resgatada. Para isso, pode-se lançar mão da criopreservação do tecido ovariano, a qual possibilita preservar a fertilidade, protegendo o ovário de ameaças para a reserva dos folículos. Na espécie humana, existem três principais ameaças para o ovário. A primeira caracteriza-se pelo recrutamento de folículos primordiais antes da ovulação, o que ocorre naturalmente a cada ciclo menstrual reduzindo exponencialmente a população folicular. A segunda é a destruição da reserva folicular observada em algumas condições patológicas como menopausa prematura. A terceira ameaça é a iatrogênica, principalmente para aquelas pacientes recomendadas a tratamentos anticancerígenos, situação na qual a criopreservação pode permitir que a reserva folicular seja protegida antes das pacientes submeterem-se a esses tratamentos (AUBARD et al., 2001).

No caso de animais de produção como os ovinos, a criopreservação de ovário tem sido utilizada como modelo translacional para espécie humana, porém, pode ser utilizada também para salvaguardar o material genético de animais valiosos ou espécies com risco de extinção, visando a sua utilização futura para a obtenção de

crias saudáveis.

A criopreservação pode ser realizada por dois diferentes métodos, isto é, a congelação lenta (SALLE et al., 2003) e a vitrificação (LORNAGE et al., 2006). Atualmente, a vitrificação tem sido amplamente empregada, pois apresenta várias vantagens em relação à congelação lenta, e por essa razão foi escolhida para ser utilizada no presente trabalho.

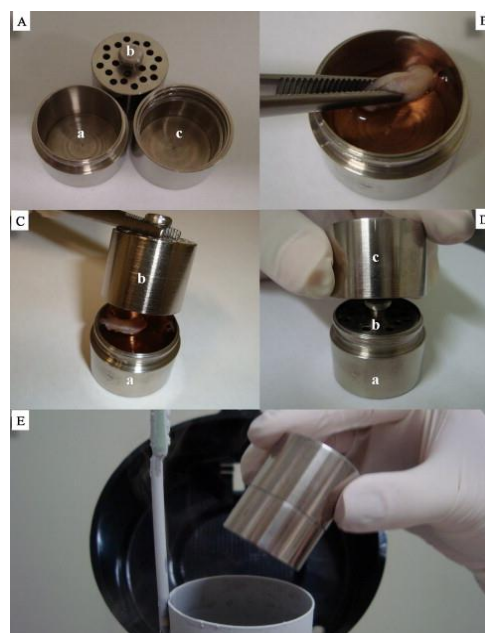
2.4.1 Vitrificação

Embora a congelação lenta seja utilizada com sucesso, esse método de criopreservação pode causar sérios danos ao ovário, devido, principalmente, à formação de cristais de gelo intra e extracelular. Visando evitar esse risco, o tecido ovariano pode ser criopreservado utilizando protocolos de vitrificação, os quais minimizam ao máximo a formação de cristais de gelo. Assim, como a congelação lenta, o processo de vitrificação também envolve as etapas de exposição aos crioprotetores, redução brusca de temperatura, estocagem, aquecimento e remoção do crioprotetor. No entanto, um grande diferencial é a formação de um vítreo em torno da amostra, evitando, assim a formação de cristais de gelo, os quais são extremamente perigosos para a célula ou tecido. Além disso, a vitrificação é um método simples, rápido, fácil e prático, uma vez que não necessita a utilização de equipamentos especiais, como freezer programável, para a sua execução.

Devido a essas vantagens, na última década, os pesquisadores têm concentrado muitos esforços na vitrificação do ovário humano e em diferentes espécies (humana: KAGAWA et al., 2009; SANFILIPPO et al., 2015; SUZUKI et al., 2015; primatas não humanos: SUZUKI et al., 2012; murino: ZHANG et al., 2010; caprino: CARVALHO et al., 2013, 2014; bovino: KAGAWA et al., 2009 e ovino: BANDEIRA et al., 2015). Apesar disso, os resultados obtidos ainda são muito discrepantes, variando entre as espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie. Portanto, muitos estudos ainda devem ser realizados com a finalidade de melhorar os resultados, desta forma, a vitrificação tem apresentado muitas derivações, compreendendo diferentes protocolos, sem contudo, interferir no princípio da técnica que é a exposição radical de um material biológico, como o ovário, por exemplo, a uma temperatura extremamente baixa (-196° C, nitrogênio líquido) na presença de altas concentrações de agente crioprotetor.

Recentemente nossa equipe (LAMOFOPA) desenvolveu um novo dispositivo de vitrificação denominado *Ovarian Tissue Cryosystem* (OTC) para a vitrificação de tecido ovariano caprino, aperfeiçoando os protocolos já disponíveis na literatura. O OTC consiste em uma estrutura cilíndrica de aço inoxidável e composta por três peças (insert, tampa e base) que juntas formam um dispositivo totalmente fechado, evitando contato do tecido com o nitrogênio líquido durante a vitrificação. Além disso, o OTC permite a vitrificação de vários fragmentos ao mesmo tempo, bem como a realização de todas as etapas do processo de vitrificação em um mesmo dispositivo, como mostrado na figura 3 (CARVALHO et al., 2013).

Figura 3 - Ovarian Tissue Cryosystem (OTC) com suas três diferentes partes constituintes (a) base, (b) insert, (c) tampa, (D) fechamento do OTC e (E) imersão do OTC no nitrogênio. (CARVALHO et al., 2013).



Embora, a vitrificação pelo OTC ou mesmo por outra técnica diferente, ofereça inúmeras vantagens, qualquer método de criopreservação apresenta riscos para a função celular, dentro os quais pode se destacar a produção de ROS.

2.5 Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Radicaís livres são moléculas ou átomos com número ímpar na última camada eletrônica (RAKHIT et al., 2013), ou seja, não pareados, o que determina uma atração para um campo magnético e, algumas vezes torna a substância

altamente reativa (HALLIWEL et al.,1992; PERROTA et al.,1992). Os radicais livres podem ser formados pela perda (oxidação) ou ganho (redução) de um elétron em reações de óxido-redução (FERREIRA et al.,1997; VANNUCCHI et al.,1998). Esses radicais podem ser gerados no citoplasma, mitocôndrias ou na membrana e, seus alvos celulares são as proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (MIRZAEI et al., 2008). Além disso, são capazes de reagir rapidamente com vários compostos celulares, pois possuem uma meia-vida muito curta, variando de poucos minutos a nanossegundos (VANNUCCHI et al.,1998). Os radicais livres em que o elétron se encontra desemparelhado em átomo de oxigênio, são classificados como espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species – ROS) e estão divididos em dois grupos: radicalares (hidroxila -HO, superóxido - O₂, peroxila - ROO e alcoxila - RO) e não radicalares (oxigênio, peróxido de hidrogênio - H₂O₂ e ácido hipocloroso – HClO).

Apesar de necessários para as funções corporais fisiológicas, em grandes quantidades os radicais livres são prejudiciais às células (RAKHIT et al., 2013). *In vivo*, as ROS desempenham um papel importante na proliferação e diferenciação celular (DROGE, 2002; POLI et al., 2004) e sua produção ocorre naturalmente na cadeia respiratória mitocondrial, sendo equilibrada pelos sistemas de defesa antioxidantes das células (AGARWAL et al., 2005; 2006). No entanto, os elevados níveis de ROS podem induzir a morte celular por apoptose pela via mitocondrial (CHANDRA et al.,2000). Existem evidências que as ROS são geradas não somente em decorrência do metabolismo celular, mas também por fatores externos, como: concentração de oxigênio, luz e manipulação *in vitro* (COMBELLES et al., 2009).

O resultado do desequilíbrio entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante é conhecido como estresse oxidativo (DROGE, 2002). Os riscos de desenvolvimento de estresse oxidativo são maiores *in vitro* do que *in vivo* (GUPTA et al., 2009) devido à falta do mecanismo de defesa fisiológica, ausência de antioxidantes naturais e a presença de múltiplas fontes potenciais de ROS (LAMPIAO, 2012). No processo de criopreservação, as altas taxas de resfriamento e aquecimento, bem como a presença de agentes crioprotetores aumentam a produção de ROS, levando a alterações no metabolismo oxidativo (DOWLING; SIMMONS, 2009). Desta forma, o estresse oxidativo é um fator importante a ser avaliado e relacionado com às crioinjúrias (TATONE et al., 2010), o qual pode ser minimizado na presença de agentes antioxidantes.

2.6 Agentes Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que mesmo presente em baixas concentrações comparada ao substrato oxidável podem atrasar ou inibir significativamente as taxas de oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE 1989), que incluem proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (VANNUCCHI et al., 1998), protegendo assim, as células e seu microambiente dos danos oxidativos (BANSAL; BILASPURI 2010; LAMPIAO et al., 2012). Os agentes antioxidantes são divididos em antioxidantes *enzimáticos* e *não enzimáticos*. Dentre os antioxidantes enzimáticos podemos destacar glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (COMBELLES et al., 2009). No que concerne aos antioxidantes não enzimáticos, destacam-se as vitaminas C e E, além de diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG; ARNER, 2001).

Os antioxidantes são formados endogenamente ou adquiridos de fontes dietéticas (GUPTA et al., 2009). No que diz respeito ao sistema reprodutivo, dos machos, os antioxidantes estão presentes nos testículos, epidídimos e plasma seminal (TREMELLEN, 2008). Nas fêmeas, essas substâncias estão presentes nos ovários, tubas uterinas e epitélio do endométrio (RAKHIT et al., 2013). No que se refere à reprodução das fêmeas, as ações dos antioxidantes são de fundamental importância, visto que os níveis fisiológicos de ROS quando presentes em excesso, podem comprometer vários eventos fisiológicos, incluindo a esteroidogênese, foliculogênese, maturação, ovulação e luteólise.

Considerando a presença e importância de agentes antioxidantes no sistema reprodutor, essas substâncias também são frequentemente utilizadas em técnicas de reprodução assistida. A catalase (CAT), por exemplo tem sido empregada com sucesso na criopreservação tanto de sêmen (SHAFIEI et al., 2015), de oócitos (DINARA et al., 2001), bem como de tecido ovariano (CARVALHO et al., 2014). Além disso, estudos realizados com congelação lenta (LUZ et al., 2012) ou vitrificação (CARVALHO et al., 2014) de tecido ovariano caprino, mostraram uma redução na produção de ROS. Outro antioxidante que tem sido utilizado durante a manipulação *in vitro* de folículos ovarianos, é o ácido alfa lipóico (ALA). Estudos têm mostrado que esse antioxidante tem sido empregado no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de camundongos, resultando na redução de níveis de ROS e aumento na

capacidade oxidativa total, melhorando assim as taxas de sobrevivência e competência para o desenvolvimento desses folículos (HATAMI et al., 2014). Considerando o emprego, bem como os benefícios oferecidos por esses antioxidantes na manipulação de folículos pré-antrais, ambos serão apresentados e discutidas no presente estudo.

2.6.1 Catalase (CAT)

Algumas ROS, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) podem causar danos ao DNA e induzir a peroxidação lipídica que afeta negativamente a estrutura da membrana, fluidez e função (FREEMAN e CRAPO, 1982). A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é a incorporação de um oxigênio molecular (radical livre) sobre os ácidos graxos da membrana celular, levando à destruição de sua estrutura, perda das trocas metabólicas e, em última condição, à morte celular (CURI et al, 2002). A peroxidação lipídica parece ser o principal dano causado às membranas (SRIVASTAVA, 2000), e evidências sugerem que a CAT é capaz de reduzir essas injúrias celulares (BECONI et al., 1993).

A CAT é capaz de quebrar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , eliminando assim as reações em cadeia que conduzem a peroxidação lipídica e a formação de outros radicais reativos (AITKEN, 1995). Conforme mencionado acima, a presença de CAT na concentração de 20 UI/ml na solução de congelamento lenta de tecido ovariano caprino, reduziu a peroxidação lipídica (LUZ et al., 2012) e foi capaz de manter os níveis de ROS similares entre o tecido ovariano caprino fresco e vitrificado (CARVALHO et al., 2014).

2.6.2 Ácido Alfa Lipóico (ALA)

O Ácido Alfa Lipóico (ALA) está presente nas mitocôndrias e funciona como um cofator de complexos multienzimáticos e reage com ROS, como: radicais superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, radicais peroxil e oxigênio singlete. ALA também protege as membranas ao interagir com a vitamina C e a glutathione, que por sua vez pode reciclar a vitamina E, além disso foi observado que ALA impediu os sintomas de escorbuto, em cobaias com deficiência de vitamina C, bem

como, preveniu os sintomas de deficiência de vitamina E (PACKER et al.,1995). O ALA tem influência sobre o fator de crescimento do nervo, induzindo a expressão do gene superóxido dismutase, que resulta em aumento do antioxidante superóxido dismutase (SOD), além de aumentar a atividade da catalase e glutathione peroxidase (GPx) (AKPINAR et al.,2008), duas enzimas fundamentais que podem ser utilizadas como biomarcadores do estresse oxidativo (LUBERDA et al.,2005). Algumas evidências também indicam que o ALA pode suprimir a morte celular através da produção de glutathione (VOLOBOUEVA et al., 2005) e inibir o fator de necrose tumoral induzido pela produção de ROS (BYUN et al., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, em relação ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados, o ALA mostrou-se um antioxidante potente sobre a capacidade de desenvolvimento desses folículos (TALEBI et al., 2012). A adição do ALA no cultivo *in vitro* de longa duração de folículos pré-antrais frescos e vitrificados de camundongos, reduziu os níveis de ROS e aumentou a capacidade oxidativa total, melhorando assim as taxas de sobrevivência e competência para o desenvolvimento desses folículos (HATAMI et al., 2014).

A utilização desses antioxidantes durante a criopreservação e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais pode minimizar as injúrias causadas sobre as organelas celulares como as mitocôndrias, minimizando conseqüentemente, a própria geração de ROS, bem como os danos severos ao DNA. Para uma melhor compreensão deste assunto, as mitocôndrias, bem como técnicas para avaliação dos danos ao DNA serão brevemente discutidos nos tópicos abaixo.

2.7 Mitocôndrias

As mitocôndrias são estruturas delimitadas por duas membranas funcionalmente distintas, uma externa e outra interna, que são altamente dobradas em cristas. Essas duas membranas dão origem a dois compartimentos separados e aquosos, ou seja, o *espaço intermembranoso* e a *matriz intercelular* (PRACHAR, 2010). Essa organela mede entre 0,5 e 1µm de diâmetro e 7µm de largura, cada célula contém entre 100 a 1000 mitocôndrias, sendo esta organela a única que possui seu próprio genoma, o DNA mitocondrial (mtDNA), o qual está organizado na

matriz e, dependendo das células, pode haver entre 2 a 10 moléculas de mtDNA (BENKHALIFA et al., 2014). Essas organelas estão intrinsecamente envolvidas no metabolismo e contribuem para várias funções celulares, inclusive a produção de ATP (NAGAI et al., 2004). Além de terem um papel importante durante a apoptose, as mitocôndrias também atuam na homeostase do cálcio e alguns precursores anabólicos como proteínas e nucleotídeos, bem como na síntese de esteroides (PFEIFFER et al., 2013). A disfunção mitocondrial tem sido associada a distúrbios, tais como, a infertilidade, envelhecimento e doenças cancerosas (AMARAL et al., 2013; EDEAS E WEISSIG, 2013).

Em relação aos danos causados nas mitocôndrias pela criopreservação, uma consequência inevitável, é o choque térmico, o qual pode afetar a organização celular ou inativar os sistemas enzimáticos, com consequentes mudanças nas propriedades estruturais e funcionais das células (SOHN et al., 2002). Nessas condições físicas e químicas, a tolerância do tecido ao estresse é reduzida, o qual pode resultar no metabolismo aeróbico do tecido com consequente disfunção mitocondrial (FABBRI et al., 2014). Essas alterações são resultantes das forças osmóticas geradas durante o congelamento e aquecimento, afetando as atividades, principalmente citoplasmáticas, tais como a função mitocondrial, metabolismo e vias de sinalização intracelular (SALEHNIA et al., 2013).

Quanto ao papel das mitocôndrias no desenvolvimento folicular, a forma como são distribuídas, pode ser um indicativo de maturação citoplasmática. Na maturação de oócitos, por exemplo, a produção de ATP e distribuição mitocondrial são importantes processos para ativação, fertilização e desenvolvimento embrionário e, são requisitos para favorecer a embriogênese, em que a demanda de energia é alta em torno do núcleo (NAGAI et al., 2006). Estudos têm demonstrado que quando as mitocôndrias estão ativas também se reorganizam durante a maturação nos oócitos na espécie bovina (VAN BLERKOM, 1990; PLANTE and KING, 1994) e durante a fertilização de oócitos de macaco rhesus (SQUIRRELL et al., 1999).

Em estudos com hamster, sugere-se que a presença de fosfato inorgânico ou alteração do Ph intracelular podem comprometer o padrão normal de distribuição mitocondrial (SESHAGIRI e BAVISTER, 1991). O padrão de distribuição mitocondrial que capacita o folículo e oócito para o desenvolvimento varia entre as espécies, como mostrado no quadro abaixo.

Quadro 1- Padrão de distribuição mitocondrial normal em oócitos capacitados e folículos de diferentes espécies de mamíferos.

Espécie	Padrão de Distribuição mitocondrial	Referência
Humana	Uniformemente distribuídas no citoplasma do folículo	FABBRI et al., 2014 JONES et al., 2004 CHEN et al., 2012
Murina (camundongos)	Polarizada no citoplasma do folículo	OU et al., 2012, DUAN et al., 2015
Canina	Uniformemente distribuídas no citoplasma do oócito	VAN BLERKOM e RUNNER, 1984
Suína	Dispersas no citoplasma do oócito	DAI et al., 2015
Equina	Uniformemente distribuídas no citoplasma do oócito	TORNER et al., 2007
Bovina	Dispersas no citoplasma do oócito	ADONA et al., 2008
Ovina	Aglomeradas no citoplasma do oócito	LEONI et al., 2015

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.8 Proteína sinalizadora de danos (H2AX)

Além da criopreservação afetar a distribuição mitocondrial, pode também provocar danos no DNA, cujo mais severo, são as rupturas de dupla cadeia ou Double-strand breaks (DSBs) e, acredita-se que quando esse tipo de dano não é reparado, induz ao processo de morte celular (JACKSON 2002; SONODA et al., 2006). As histonas, são proteínas que podem servir como marcadoras de posições específicas de danos no DNA (HASSA; HOTTIGER, 2005). A família da histona H2A, possui várias variantes (H2A1, H2A2, H2AX e H2AZ), entretanto a H2AX, é a única que está presente em células eucarióticas (AUSIO; ABBOTT, 2002).

Em células de mamíferos, a fosforilação da histona H2AX, na posição de serina139, ocorre em resposta à formação de DSB, ou seja, sinaliza o dano no DNA. Ressalta-se que a forma fosforilada de H2AX é γ H2AX (ROGAKOU et al., 1999; HELT et al., 2005). Além de sinalizar os danos no DNA, a γ H2AX recruta proteínas para reparar esses danos e, possibilita que essa sinalização seja feita corretamente,

por esse motivo, essa histona tem sido utilizada como biomarcador quantitativo de DSB do DNA (KOBAYASHI, 2004), bem como, em estudos *in vitro* que analisam a terapia do câncer sobre folículos ovarianos (KUO; YANG, 2008).

2.9 Detecção de apoptose (TUNEL)

Quando os danos no DNA não são reparados, a célula pode entrar em apoptose, que é caracterizada por uma extensa fragmentação do DNA, que gera uma afinidade de DSBs (NAGATA, 2000). Um dos parâmetros/técnicas que podem ser utilizados para detectar células apoptóticas após criopreservação, é a técnica de deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) biotin nick end-labeling (TUNEL). A técnica de TUNEL tem como princípio, a utilização de uma enzima deoxynucleotidyl transferase terminal (TdT) que adiciona nucleotídeos no local da fragmentação do DNA, na extremidade 3'-OH nas células apoptóticas (GAVRIELI et al., 1992). A incorporação da dUTP biotinilada às extremidades 3' do DNA fragmentado é carregada numa reação contendo TdT. Neste estudo, após coloração com complexo avidina-biotina-peroxidase conjugado, o núcleo das células apoptóticas, ficaram marcados com uma coloração marrom, enquanto que os não apoptóticos ficaram com uma coloração mais clara (LIU et al., 2003). Essa técnica além de permitir a avaliação da fragmentação do DNA em secções histológicas, também detecta o grau de apoptose ((PEREZ et al., 1999) e tem sido utilizada em vários estudos com folículos pré-antrais (ROTI et al., 2012; MORGAN et al., 2013; CARVALHO et al., 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os tratamentos utilizados contra o câncer têm resultado em altas taxas de cura e sobrevivência. Contudo, esses tratamentos são gonadotóxicos e levam à infertilidade em quase 100% dos casos (DONNEZ et al., 2013). Sabe-se que as pacientes que necessitam de quimio e/ou radioterapia para tratamento oncológico, estão propensas a sofrer problemas reprodutivos, tais como a falência ovariana prematura (POF - *premature ovarian failure* – MEIROW et al., 2008). Desta forma, a criopreservação de tecido ovariano torna-se a principal e mais viável opção para preservar e, conseqüentemente, regenerar a fertilidade de mulheres que se submeterão a tratamentos contra o câncer (DOLMANS et al., 2013). A reversão da POF, decorrente dos tratamentos quimioterápicos, a partir de autotransplante de tecido ovariano criopreservado tornou-se uma realidade, com pelo menos 60 nascimentos na espécie humana (DONNEZ & DOLMANS et al., 2015) desde o primeiro nascimento reportado por Donnez e sua equipe, em 2004.

A grande maioria dos relatos de nascimentos após criopreservação e transplante de tecido ovariano tem utilizado o processo de congelação lenta, porém alguns autores têm indicado que a vitrificação pode ser melhor que a congelação lenta para a criopreservação de tecido ovariano (AMORIM et al., 2011). Nos anos de 2005 e 2013 foram relatados os primeiros nascimentos, respectivamente na espécie ovina (BORDES et al., 2005) e humana (KAWAMURA et al., 2013) a partir de tecido ovariano vitrificado. Porém, o processo de vitrificação ainda se encontra em um estágio experimental, provavelmente devido aos protocolos que ainda não estão plenamente estabelecidos. Um dos aspectos que podem ser melhorados ou controlados nos protocolos de vitrificação é a produção de ROS, o qual é muito comum durante o processo de criopreservação. Desta forma, uma das alternativas é a suplementação das soluções de vitrificação com antioxidantes. No presente estudo foi utilizada a catalase, a qual foi utilizada anteriormente com sucesso na congelação lenta de óocitos de camundongos (DINARA et al., 2001) e tecido ovariano caprino (LUZ et al., 2012), bem como na vitrificação de tecido ovariano nessa mesma espécie (CARVALHO et al. 2014). Além da catalase, o ácido alfa lipóico, utilizado anteriormente no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais vitrificados de camundongos, também demonstrou ser um potente antioxidante no controle da produção de ROS (HATAMI et al., 2014). No entanto, na espécie ovina, essas substâncias ainda não

foram utilizadas, havendo a necessidade, portanto, de definir a concentração ideal para o tecido ovariano dessa espécie.

Conforme mencionado na revisão de literatura, o OTC, recentemente desenvolvido pela equipe do LAMOFOPA para a vitrificação de ovário caprino, o qual resultou em excelentes taxas de normalidade e viabilidade folicular após a criostocagem em nitrogênio líquido. Porém a produção de ROS e outros danos decorrentes, como a apoptose ainda se caracterizam como aspectos preocupantes e que precisam ser minimizados ou controlados, a fim de que a função ovariana seja melhor preservada. Desta forma, acredita-se que o protocolo de vitrificação de tecido ovariano usando o OTC como dispositivo possa ser aperfeiçoado, utilizando agentes antioxidantes na solução de vitrificação.

A espécie ovina foi escolhida nesse trabalho, por duas importantes razões: Primeiro porque é um excelente modelo experimental para a espécie humana. De acordo com a literatura, o ovário da ovelha é bastante semelhante ao ovário da mulher, no que diz respeito à arquitetura, tamanho e consistência tecidual. Além disso, existem outras semelhanças, tais como, as características morfológicas dos folículos ovarianos, bem como o período compreendido para o desenvolvimento de folículo primordial até o estágio pré-ovulatório, que é de aproximadamente 180 dias em ambas as espécies. Portanto, considerando essas características comuns entre os ovários da mulher e da ovelha, bem como as questões éticas que envolvem a experimentação na espécie humana, acreditamos que as informações obtidas com ovários de ovelhas, poderão ser extrapoladas para o ovário humano.

Segundo, a espécie ovina é de grande relevância econômica e social, servindo como fonte de renda e alimento para as populações, especialmente no Nordeste do Brasil. O Nordeste brasileiro é considerado o maior produtor de carne ovina deslanada no país, portanto, o desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida que tragam melhorias para os rebanhos ou mesmo que permitam a preservação do material genético de animais de grande valor genético, como a criopreservação de ovário, pode ser de grande interesse não somente para a comunidade científica, como também para os produtores.

Desta forma, o aperfeiçoamento das soluções utilizadas no procedimento de vitrificação, visando reduzir as crioinjúrias, é de extrema relevância para a pesquisa e conseqüente avanço da criobiologia, bem como para a aplicabilidade prática do processo de criopreservação do material genético de fêmeas.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A adição de agentes antioxidantes (catalase ou ácido alfa lipóico) na solução de vitrificação pode controlar ou minimizar a geração de ROS durante o processo de criopreservação;
- A redução de ROS durante a vitrificação varia com o tipo e concentração do agente antioxidante utilizado;
- A atividade mitocondrial pode ser afetada pelo processo de vitrificação.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

- Aperfeiçoar o protocolo de vitrificação de tecido ovariano ovino utilizando agentes antioxidantes para controlar a produção de ROS e preservar função mitocondrial.

5.2 Específicos

- Avaliar o efeito da vitrificação na ausência ou presença de diferentes concentrações de catalase (10, 20 e 40 UI/ml) ou do ácido alfa lipólico (25, 50 e 100 μ M/ml) nas soluções de vitrificação, após curto período de incubação, sobre:
 - ✓ morfologia e desenvolvimento folicular;
 - ✓ densidade das células do estroma ovariano;
 - ✓ produção de ROS no meio de incubação.
- Verificar a atividade mitocondrial e a produção de ROS no tecido ovariano ovino após vitrificação;
- Avaliar danos no DNA através do teste de TUNEL e fosforilação da histona H2AX.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado e realizado sob as diretrizes do Comitê de Ética para Uso Animal da Universidade Estadual do Ceará (6004631/2015). Os crioprotetores (etilenoglicol e dimetilsulfóxido) foram obtidos da Dinâmica (Dinâmica Química, Diadema, SP, Brasil) e os outros produtos químicos foram adquiridos da Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

6.1 Ovários e desenho experimental

Foram coletados ovários ($n = 16$) de oito ovelhas adultas não prenhas em um abatedouro local. Imediatamente após a morte, os ovários foram lavados uma vez em álcool a 70% e duas vezes em meio essencial mínimo (MEM), suplementado com 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina.

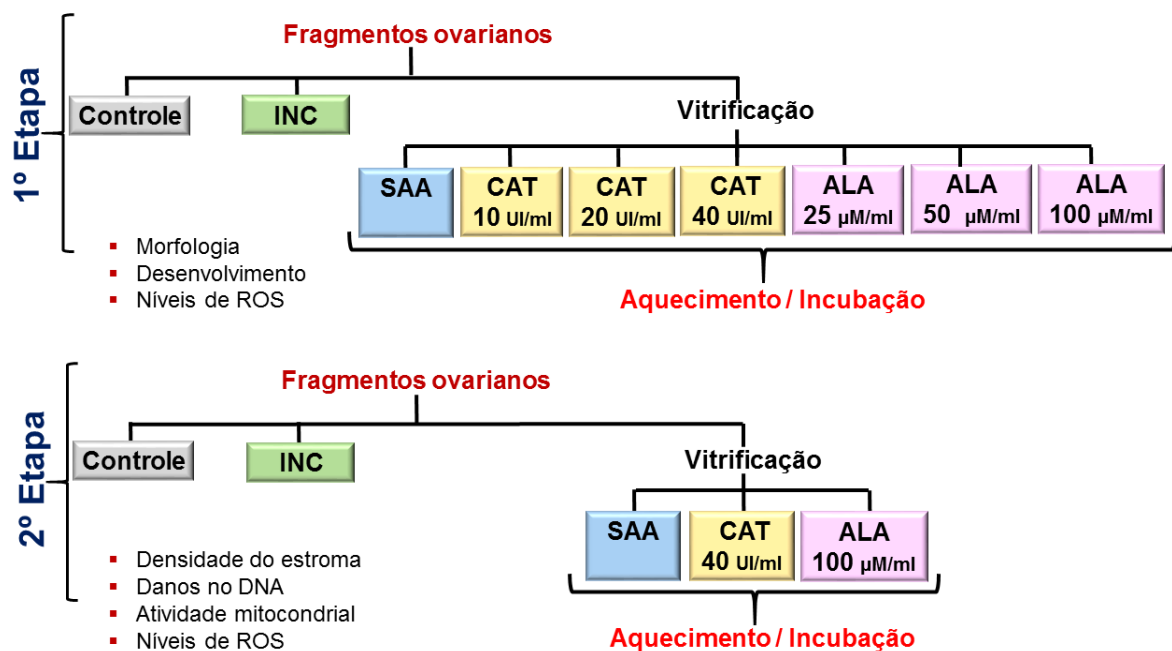
Os ovários foram então transportados ao laboratório em MEM HEPES a 20 °C dentro de uma hora após a coleta (CARVALHO et al., 2014). No laboratório, os ovários foram fragmentados com o auxílio de um tissue slicer (Thomas Scientific, EUA) sendo a superfície do córtex ovariano seccionada em fragmentos de 3x3x0,5 mm.

Este experimento foi realizado em duas etapas (Figura 4). Na primeira, foram utilizados 18 fragmentos de quatro pares de ovários. Dois fragmentos foram imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% (Controle) e outros dois fragmentos foram submetidos a incubação durante 24 horas (INC) e posteriormente fixados da mesma forma que os outros. Os fragmentos remanescentes ($n = 14$) foram distribuídos em sete condições de vitrificação: vitrificados sem agentes antioxidantes (SAA) ou vitrificados com diferentes concentrações de catalase - CAT (10, 20 ou 40 UI/ml) ou ácido alfa lipóico - ALA (25, 50 ou 100 $\mu\text{M/ml}$). Após vitrificação, os fragmentos foram aquecidos, incubados durante 24 horas e fixados. Por conseguinte, foram comparados nove tratamentos (Controle, INC, SAA, CAT10, CAT20, CAT40, ALA25, ALA50 e ALA100) em quatro repetições. Os fragmentos foram destinados para análise morfológica e desenvolvimento folicular, e o meio para análise dos níveis de ROS.

Na segunda etapa, foram utilizados 15 fragmentos de outros quatro pares de ovários. Com base nos melhores resultados obtidos na primeira etapa (maior

porcentagem de folículos normais e em desenvolvimento e menores níveis de ROS no meio de incubação) cinco tratamentos foram repetidos nesta etapa. Portanto, três fragmentos frescos foram imediatamente fixados (Controle) enquanto outros três foram incubados (INC). Os fragmentos restantes (n = 9) foram distribuídos em três condições de vitrificação (SAA, CAT40 e ALA100). Todos os fragmentos destes cinco tratamentos foram submetidos a análises de densidade das células do estroma do tecido ovariano, danos no DNA, atividade mitocondrial e níveis intracelulares de ROS dos folículos inclusos no tecido ovariano.

Figura 4 – Desenho experimental para a vitrificação de tecido ovariano ovino utilizando agentes antioxidantes.



6.2. Procedimento de vitrificação e aquecimento

A vitrificação (Figura 5) foi realizada utilizando o OTC (Ovarian Tissue Cryosystem), um sistema fechado de vitrificação de superfície sólida descrito anteriormente por nossa equipe (CARVALHO et al., 2013). Resumidamente, os fragmentos foram expostos a duas soluções de vitrificação (SV). A SV1 foi composta por MEM suplementado com 10 mg/ml de Albumina Sérica Bovina (BSA), 0,25 M de sacarose (SAC), 10% de etilenoglicol (EG) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A SV2 foi semelhante a SV1, mas com maior concentração de crioprotetores (20% de EG e

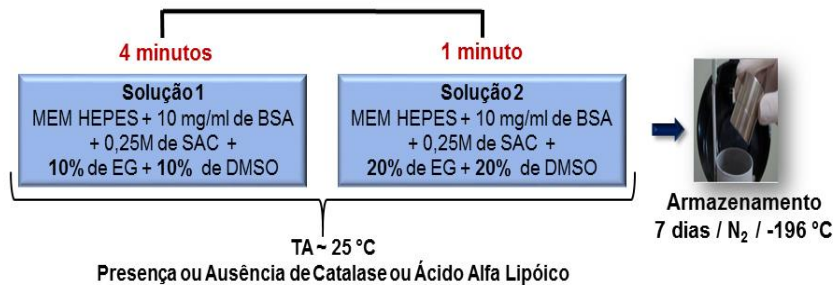
20% de DMSO). Ambas as soluções (SV1 e SV2) foram preparadas sem ou com agentes antioxidantes (CAT ou ALA) em diferentes concentrações como mencionado anteriormente.

Os fragmentos ovarianos foram inicialmente expostos a SV1 durante 4 min seguido por SV2 durante 1 min. Ambas as exposições foram realizadas utilizando o OTC. A solução de vitrificação foi então removida e o OTC contendo o tecido ovariano foi fechado e imediatamente imerso verticalmente em nitrogênio líquido.

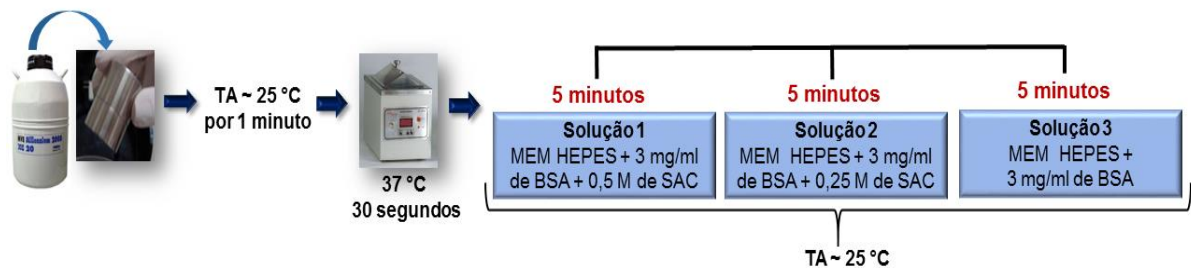
Após criostocagem por 7 dias, os OTCs contendo o tecido ovariano vitrificado, foram aquecidos (Figura 5) à temperatura ambiente (~25 °C) durante 1 min, seguido da imersão em banho maria (37 °C) durante 30 s. Logo após, os crioprotetores foram removidos por meio de três soluções de aquecimento (SA) de 5 minutos cada. A SA1 continha MEM + 3 mg/mL de BSA + 0,5 M de SAC, SA2: MEM + 3 mg/mL de BSA + 0,25 M de SAC e a SA3: MEM + 3 mg/mL de BSA. Essas três soluções não continham antioxidantes.

Figura 5 – Procedimento de vitrificação e aquecimento do tecido ovariano ovino.

VITRIFICAÇÃO



AQUECIMENTO



6.3 Incubação

Fragmentos frescos e vitrificados, foram incubados em 1 mL de meio de cultivo, por um período de 24 horas, em uma incubadora umidificada a 39 °C, com 5% CO₂. O meio de cultivo consistiu de α -MEM, suplementado com ITS (10 μ g/mL Insulin, 5,5 μ g/mL Transferrina; 5 ng/mL Selênio), Glutamina (2 mM), Hipoxantina (2 mM), BSA – Albumina Sérica Bovina (1,25 mg/mL), LIF - Fator Inibidor de leucemia (50 ng/mL), KL - Kit Ligant (50 ng/mL), FSH – Hormônio Folículo Estimulante (100 ng/mL), descrito por LUNARDI et al. (2015).

6.4 Morfologia e desenvolvimento folicular

O tecido ovariano fresco ou vitrificado foi fixado em paraformaldeído a 4% (PAF) durante 2 horas a 37 °C, desidratado numa série graduada de etanol, clarificado com xilol, embebido em cera de parafina e cortado em 7 μ m de espessura. Os fragmentos foram corados com ácido periódico Schiff (PAS) - hematoxilina. Para avaliação morfológica, as lâminas foram codificadas e examinadas ao microscópio óptico (Nikon, Japão) com uma ampliação de 400X, e os folículos foram classificados de acordo com a integridade e fase de desenvolvimento.

Os estágios de desenvolvimento do folículo foram definidos como: primordial, quando continha uma camada de células da pré-granulosa achatadas ao redor do oócito; transição, uma camada de células da granulosa achatadas e cubóides; primário, uma camada de células de granulosa cubóides; secundário, duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides (WRIGHT et al., 1999)

Os folículos pré-antrais foram morfológicamente classificados como (i) normais se continham um oócito intacto e células da granulosa intactas e (ii) degenerados se continham o núcleo do oócito picnótico, citoplasma retraído, acompanhado ou não de células da granulosa desorganizadas, e ainda com aumento de volume ou desprendimento da membrana basal. A presença de pelo menos uma das características acima mencionadas foi considerado indicativo de atresia (CARVALHO et al, 2014).

6.5 Níveis de ROS no meio de incubação

Os níveis de ROS foram determinados pelo método de espectrofluorimetria (LOETCHUTINAT et al., 2005), utilizando o ensaio diacetato de 2' 7'-dihydrodichlorofluorescein (DCFH-DA, D6883, Sigma-Aldrich). A alíquota da amostra (50 μ L do meio de incubação) foi incubada com 5 μ L de DCFH-DA (1 mM) à temperatura ambiente. A oxidação de DCHF-DA a dihydrodichlorofluorescein fluorescente foi medida para a detecção de ROS. A emissão de intensidade de fluorescência 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) foi registada a 520 nm (com excitação de 480 nm) 2 horas após a adição de DCFH-DA ao meio, utilizando espectrofluorímetro (modelo Shimadzu RF-5301PC, Tóquio, Japão).

6.6 Densidade das células do estroma

A densidade das células do estroma ovariano foi avaliada pelo cálculo de 100 x 100 μ m. Para cada tratamento, foram avaliados dez campos por lâmina e calculado o número médio de células estromais por campo (CARVALHO et al., 2013). Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador.

6.7 Coloração γ H2AX para detecção de danos ao DNA

Para esta análise utilizou-se um anticorpo primário monoclonal de camundongo para a detecção da proteína H2AXph139 (1:200 ab26350, Inc. Abcam, Cambridge, MA, EUA), que está envolvida em danos no DNA, além do anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 anti-IgG de coelho (ab150113, Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA) diluído em 1:500 para detecção de H2AXph139. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário na solução utilizada como diluente. Os tecidos ovarianos derivados do grupo controle, bem com INC e fragmentos vitrificados (SAA, CAT40 e ALA100) foram preparados como descrito no teste de TUNEL. Para recuperação do antígeno, as lâminas foram incubadas overnight a 4 °C com anticorpos primários (H2AXph139). Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 durante 1 h à temperatura ambiente e coradas com azul de Evans (1:10.000). As lâminas foram montadas com Vectashield Mounting Medium® (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e a marcação foi avaliada utilizando um microscópio de varredura a laser confocal (LSM 710, Zeiss,

Oberkochen, Alemanha). Todas as análises foram realizadas utilizando as mesmas configurações. (GUERREIRO et al., 2016).

6.8 Análise de fragmentação do DNA para a detecção de células apoptóticas

A fragmentação do DNA foi analisada pelo teste de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphates nick end-labeling), utilizando o kit de detecção de morte celular *in situ*, POD (Roche Applied Science, Mannheim, BW, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras do grupo controle, bem como INC e fragmentos vitrificados (SAA, CAT40 e ALA100), foram fixadas em PAF a 4% em Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,2) e subsequentemente desidratadas e imersas em cera de parafina. As secções de tecido (5 µm) montadas em lâminas Superfrost Plus (Knittel Glass, Bielefeld, NW, Alemanha) foram desparafinadas com Citrisolve (Fisher Scientific, Ottawa, Ontário, Canadá) e reidratadas numa série de etanol graduada. A recuperação do antígeno foi realizada incubando as secções de tecido em 0,01 M de tampão citrato de sódio (pH 6,0) durante 5 min em uma panela de pressão. Para bloquear a peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com H₂O₂ a 3% em metanol e depois bloqueadas durante 1 h à temperatura ambiente utilizando PBS contendo 1% de BSA. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com TUNEL (50 µL) durante 1 h a 37 °C. O Conversor POD foi adicionado e a localização da proteína foi revelada por incubação com DAB (0,05% de DAB em Tris/HCl, pH 7,6, 0,03% de H₂O₂). Finalmente, as secções foram contra-coradas com hematoxilina. Os folículos foram considerados com DNA fragmentado quando os oócitos apresentaram núcleos corados de marrom escuro (YUCEBILGIN et al., 2004). Como controlo positivo interno, as secções foram tratadas com 10 U/ml de DNase I (Invitrogen™, Carlsbad, CA) em 1 mg/mL BSA, durante 10 min à TA, antes da incubação com TUNEL para induzir as quebras inespecíficas do DNA. Para o controle negativo a enzima terminal de desoxinucleotidil transferase foi omitida (TARUMI et al., 2009).

6.9 Atividade mitocondrial e níveis intracelulares de ROS

Esta análise foi realizada de acordo com FABBRI et al. (2014), com algumas modificações. Resumidamente, avaliou-se a quantificação das intensidades de

fluorescência MitoTracker Orange CMTMRos e DCF, indicando estado de energia aparente (atividade mitocondrial) e níveis intracelulares de ROS, respectivamente. As amostras de tecido ovariano do grupo controle, bem como INC e vitrificados (SAA, CAT40 e ALA100), foram incubadas durante 30 minutos em 998 μL de PBS com 2 μL de MitoTracker Orange CMTMRos (M7510; Molecular probes) a 39 °C e 5 % de CO_2 para detectar e localizar mitocôndrias ativas. Após incubação com a sonda específica das mitocôndrias, as amostras de ovário foram incubadas durante 15 minutos em 999 μL de PBS com 1 μL de DCF para detectar e localizar fontes intracelulares de ROS. A amostra foi fixada em paraformaldeído a 4% durante 12 horas a 4 °C, desidratada em sacarose durante 72 horas intercaladas (primeiramente por 24 h e posteriormente por 48 h), inserida em tecido tek e posteriormente armazenada a -80 °C. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em formaldeído a 3% durante 15 minutos, lavadas em PBS durante 5 minutos e montadas com meio de montagem Fluoroshield com iodeto de propídio (ABCAM-ab104129) e avaliadas utilizando um microscópio de varredura a laser confocal (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

6.10 Análise estatística

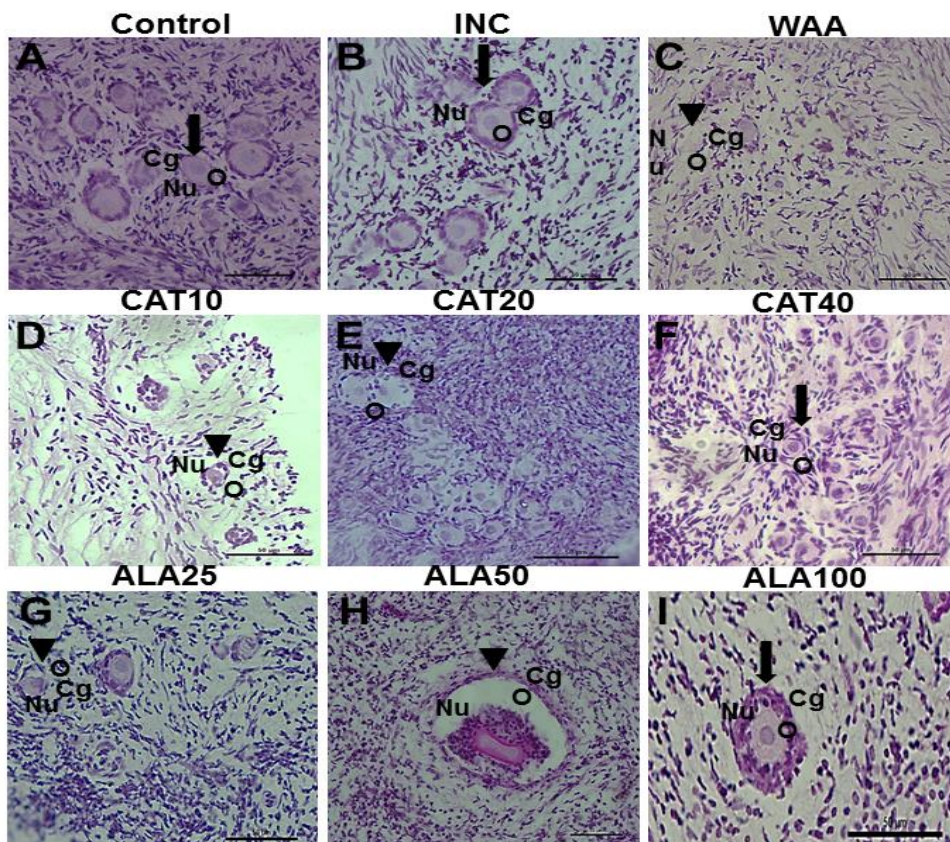
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Plot 11® (Systat Software Inc., EUA). Os dados que não tiveram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, foram transformados em logaritmos. As comparações das médias foram realizadas entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis. A proporção de folículos morfologicamente normais e os estádios de desenvolvimento folicular (primordial e em desenvolvimento) entre os tratamentos, foram analisados pelos testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O coeficiente de correlação de Pearson foi realizado para avaliar a associação entre a intensidade de fluorescência MitoTracker e DCFH-DA. Além disso, calculou-se o *odds ratio* com intervalo de confiança de 95% (IC) para determinar o efeito dos tratamentos realizados na presença de folículos normais. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média e porcentagem, salvo indicação contrária. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

7. Resultados

7.1 Morfologia folicular

No experimento, um total de 888 folículos pré-antrais foram analisados. Os folículos morfologicamente normais ou degenerados foram observados no tecido ovariano fresco (controle), incubado (INC) ou vitrificado sem (SAA) ou com antioxidantes (CAT ou ALA), como mostrado na figura 6.

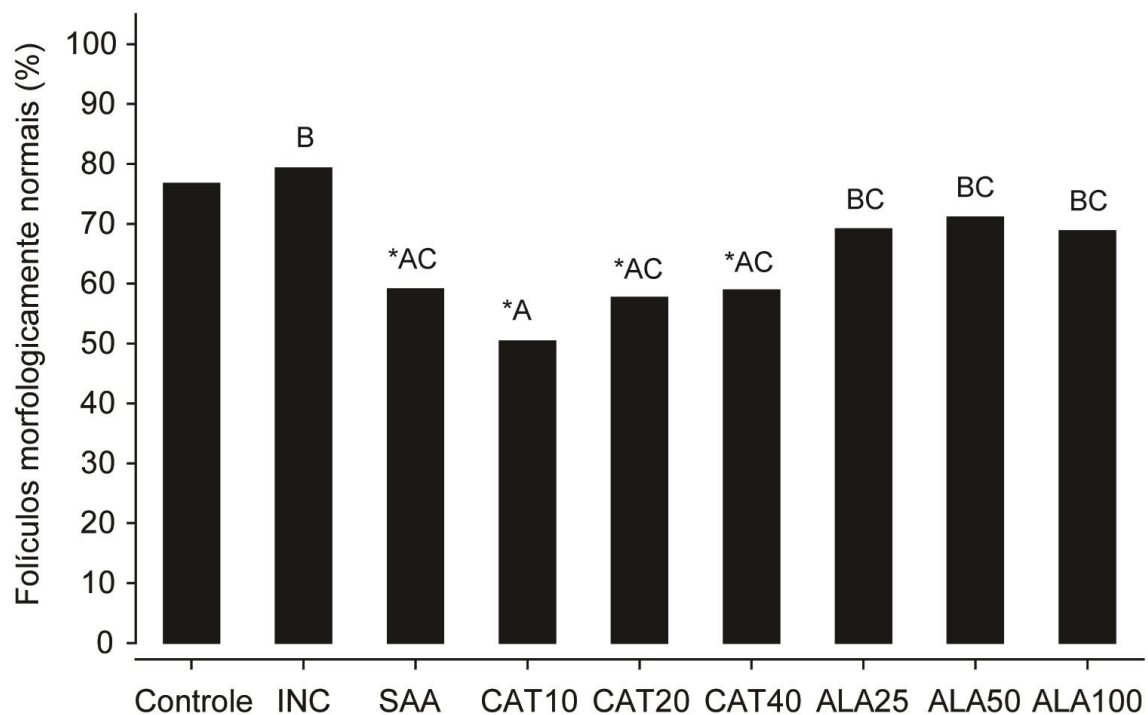
Figura 6 - Imagens representativas da morfologia dos folículos pré-antrais ovinos, após coloração com ácido periódico Schiff-hematoxilina. Folículos normais são mostrados no controle (A), INC (B), CAT40 (F) e ALA100 (I), enquanto folículos degenerados estão representados em SAA (C), CAT10 (D), CAT20 (E), ALA25 (G) e ALA50 (H). O: oócito; Nu: núcleo do oócito; Cg: células da granulosa (400 x). As setas inidcam folículos normais e a ponta da seta, folículos degenerados. Barra de escala 50 µm.



O percentual de folículos morfologicamente normais no tecido ovariano vitrificado na presença do ALA em todas as concentrações testadas (25, 50, 100

$\mu\text{M/mL}$) não diferiu ($P > 0,05$) do controle, nem do tecido apenas incubado (INC) por 24 h. Por outro lado, esse percentual no tecido vitrificado sem antioxidante (SAA), bem como na presença de catalase em todas as concentrações (10, 20, 40 UI/mL) foi menor ($P < 0,05$) em relação ao controle e INC (Figura 7).

Figura 7 - Morfologia normal em tecido ovariano fresco (controle), incubado (INC) ou vitrificado sem (SAA) ou com agentes antioxidantes (CAT ou ALA).



* Diferem do controle. A, B, C Diferença entre tratamentos ($P < 0,05$).

7.2 Análise de associação entre os tratamentos

A associação entre a porcentagem de folículos pré-antrais normais no tecido ovariano fresco, incubado e nos grupos vitrificados com os antioxidantes, foram analisadas ainda pela razão de possibilidades (odds ratio) (Tabela 1). Observa-se que os tratamentos com CAT (dados combinados das três concentrações) e SAA, tiveram odds ratio ($P > 0,05$) semelhante à porcentagem de folículos pré-antrais normais após vitrificação.

Em contraste, a probabilidade de presença folículos pré-antrais morfologicamente normais com ALA (Dados combinados das três concentrações) foi

1,6 e 1,8 vezes maior em comparação aos grupos SAA ($P < 0,05$) e CAT ($P < 0,01$), respectivamente.

Além disso, o grupo INC apresentou odds ratio ($P < 0,01$) superior aos grupos SAA (2,6 vezes) e CAT (3,1 vezes). Finalmente, ALA e INC mostraram uma probabilidade semelhante ($P > 0,05$) de presença de folículos pré-antrais normais.

Tabela 1 - Análise da associação entre os tratamentos (incubado ou vitrificado sem (SAA) ou com agentes antioxidantes (CAT ou ALA)).

Comparação/Trat.	Morfologia normal	ODDS RATIO	CI 95%	P
SAA	59,1 (71/120)	1,1	0,7 - 1,8	0,53
CAT	55,2 (153/277)			
SAA	59,1 (71/120)	1,6	1,0 - 2,4	0,05
ALA	69,6 (209/300)			
CAT	55,2 (153/277)	1,8	1,3 - 2,6	0,01
ALA	69,6 (209/300)			
INC	79,3 (73/92)	2,6	1,4 - 4,9	0,01
SAA	59,1 (71/120)			
INC	79,3 (73/92)	3,1	1,7 - 5,4	0,01
CAT	55,2 (153/277)			
INC	79,3 (73/92)	1,6	0,9 - 2,9	0,09
ALA	69,6 (209/300)			

C.I: 95% intervalo de confiança.

INC: controle incubado; SAA: sem antioxidante; CAT: catalase; ALA: ácido alfa lipóico

† Os dados dos tratamentos com catalase (CAT 10, CAT 20 e CAT 40 UI/ml) foram combinados.

‡ Os dados dos tratamentos com ácido alfa lipóico (ALA 25, ALA 50 e ALA 100 μ M/ml) foram combinados.

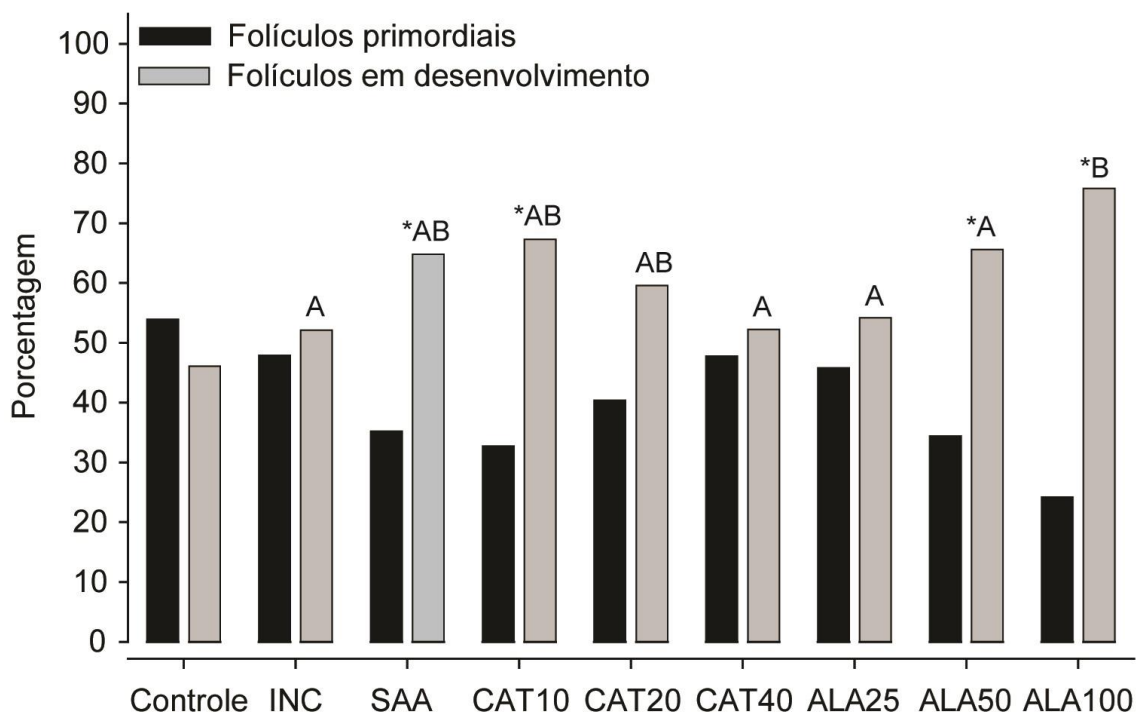
7.3 Desenvolvimento folicular

A porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento é mostrada na Figura 8. Foi observado um maior percentual de ativação e desenvolvimento folicular

(representado por alta porcentagem de folículos em desenvolvimento) nos tratamentos SAA, CAT10, ALA50 e ALA100 em comparação ao controle ($P < 0,05$).

Além disso, observou-se que a porcentagem de folículos em desenvolvimento foi maior no tratamento com ALA100 em relação ao INC e aos tratamentos CAT40, ALA25 e ALA50 ($P < 0,05$).

Figura 8 - Desenvolvimento folicular em tecido ovariano fresco (controle), incubado (INC) ou vitrificado sem (SAA) ou com antioxidantes (CAT ou ALA).

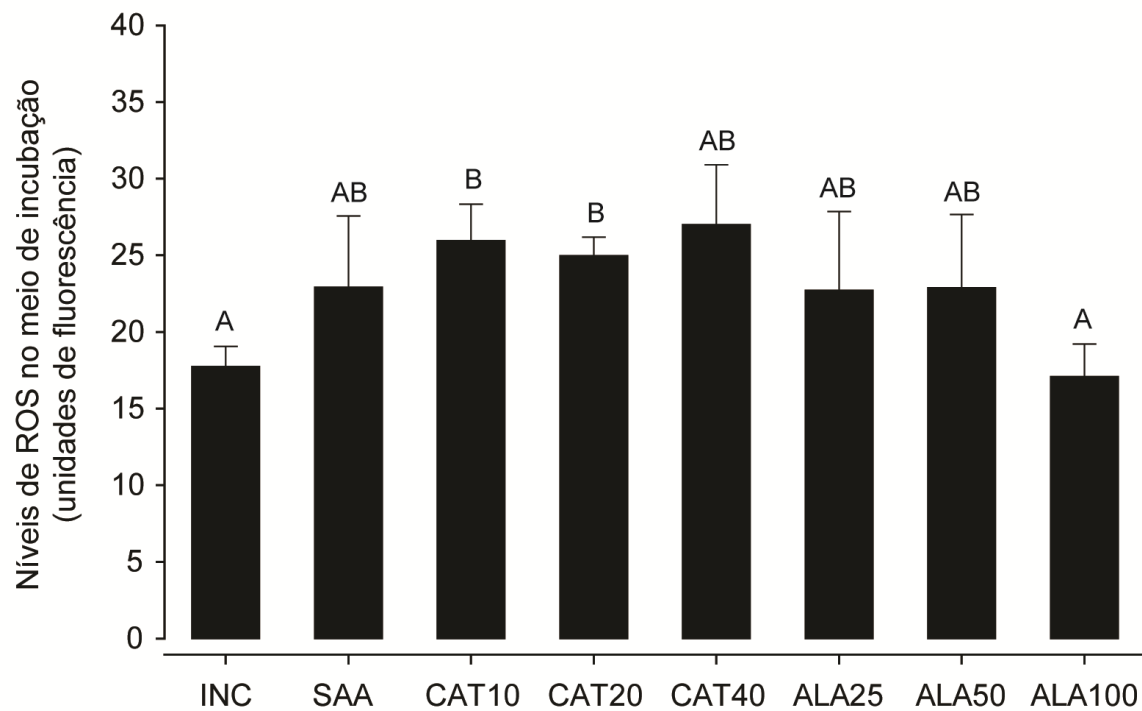


* Diferem do controle. A, B, C Diferença entre tratamentos ($P < 0,05$).

7.4 Níveis de ROS no meio de incubação

Os dados mostraram que, para esse parâmetro, os tratamentos INC e ALA100 foram as duas únicas situações nas quais os níveis de ROS não diferiram entre si ($P > 0,05$) e concomitantemente foram inferiores aos tratamentos CAT10 e CAT20 ($P < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9 - Níveis (Média \pm SEM) de espécies reativas de oxigênio (unidades de fluorescência relativas) produzida por fragmentos de tecido ovariano após vitrificação e incubação durante 24 horas.

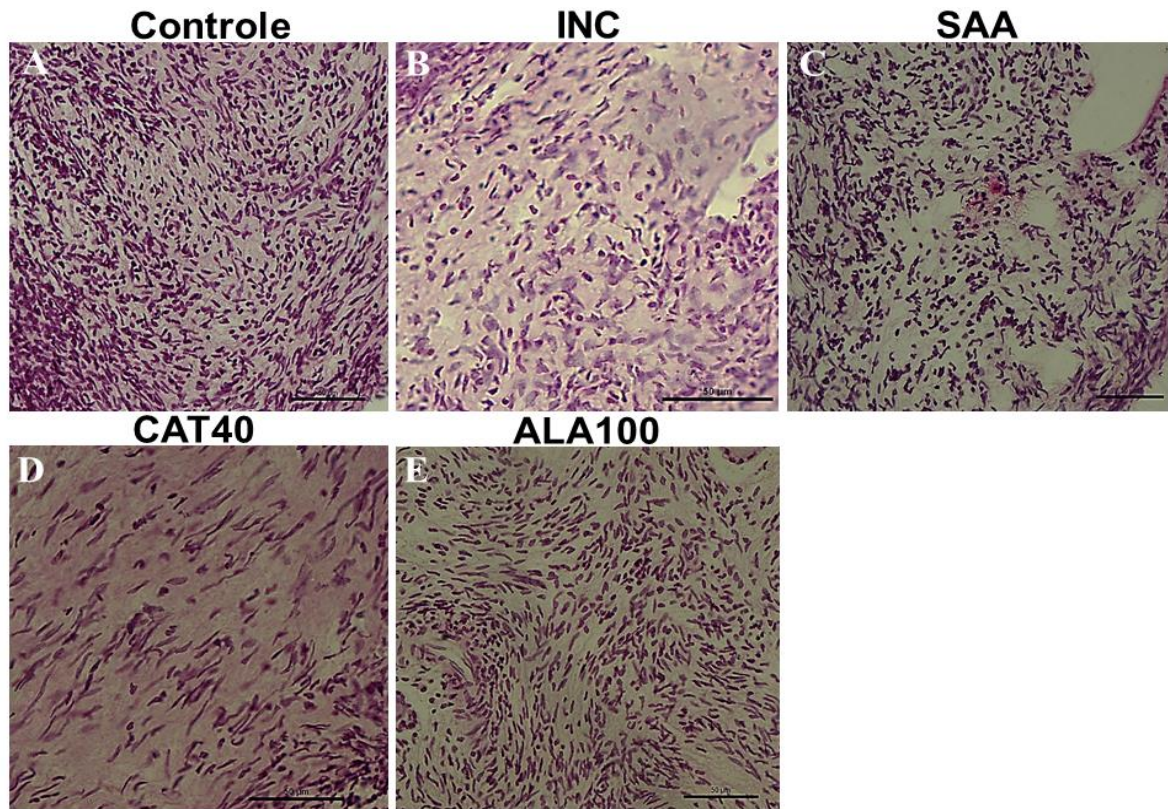


^{A,B} Indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

7.5 Densidade das células do estroma

Imagens das células do estroma dos grupos Controle, INC, SAA, CAT40 e ALA100 são mostradas na Figura 10. A análise mostrou que, comparada ao controle, a densidade celular reduziu significativamente em todos os tratamentos, exceto no SAA. Além disso, dentre os fragmentos vitrificados, a densidade caiu significativamente na CAT40 em relação aos tratamentos INC, SAA e ALA100 (Tabela 2).

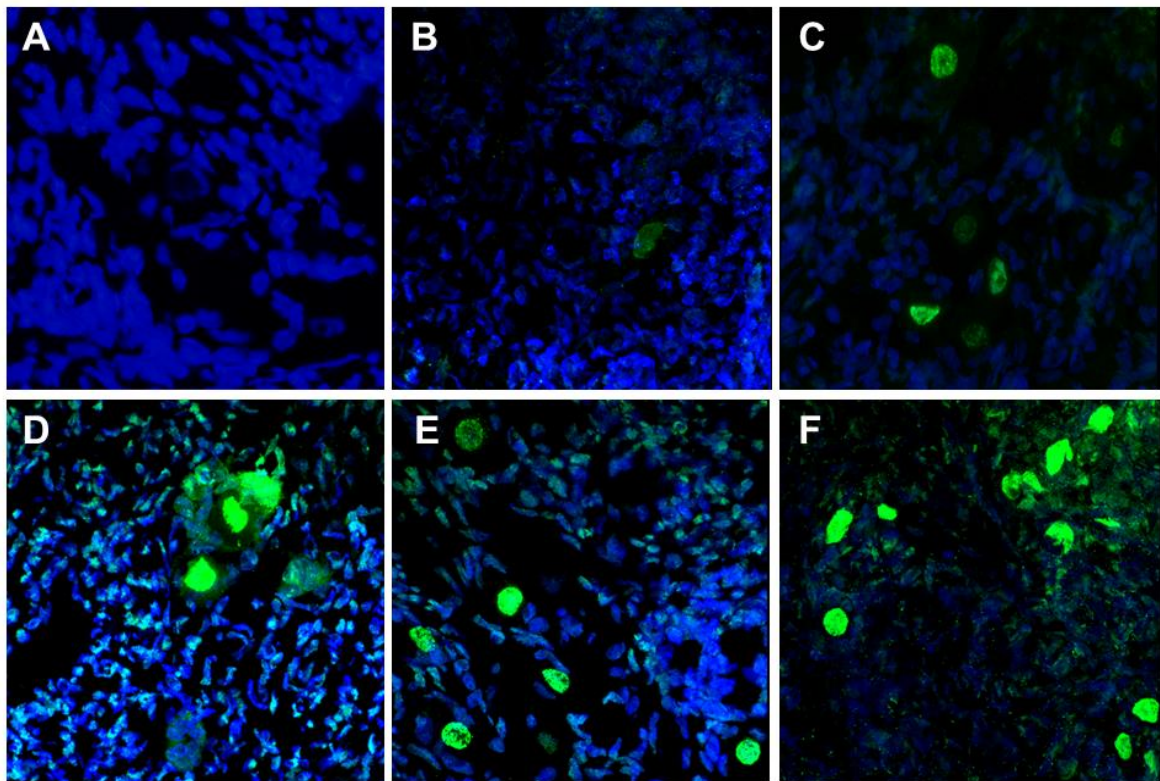
Figura 10 - Imagens representativas do estroma ovariano ovino (A) Controle, (B) INC, (C) SAA, (D) CAT40 e (E) ALA100. Na imagem (D), CAT40, observa-se uma redução da densidade das células do estroma. Barra de escala 50 μ m.



7.6 Detecção de focos Gamma H2AX em folículos pré-antrais

A análise de imunofluorescência foi realizada no sentido de localizar a proteína envolvida na sinalização de danos no DNA (γ H2AX) (Figura 11) dos folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano. A porcentagem de imunocoloração positiva nos folículos para γ H2AX em CAT40 foi superior ao controle e ao tratamento INC (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados no tecido vitrificado SAA e INC. Nota-se que entre os tecidos criopreservados, apenas o vitrificado com ALA100 foi capaz de manter a sinalização de danos semelhante ($P > 0,05$) ao tecido apenas incubado (INC).

Figura 11 - Imagens representativas da imunodeteção da proteína H2AXp139 (cores verdes fluorescentes) em folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de ovelha. (A) Controle negativo da técnica, (B) Controle, (C) INC, (D) SAA, (E) CAT40, (F) CAT100. Barra de escala 50 μ m.



7.7 Avaliação da fragmentação do DNA pelo TUNEL

O teste de TUNEL revela a presença de células apoptóticas nos folículos pré-antrais (Figura 12). A porcentagem de folículos pré-antrais ovinos positivos para o TUNEL (tabela 2), mostrou que os fragmentos INC apresentaram porcentagem de células positivamente marcadas para TUNEL, superior ao controle, bem como aos outros tratamentos.

Figura 12 - Imagens representativas da análise de morte celular por apoptose em folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano ovino, através da técnica de TUNEL. (A) Controle negativo da técnica, (B) Controle positivo da técnica, (C) Controle, (D) INC (E), SAA, (F) CAT40 e (G) ALA100. A seta branca, indica folículos marcados para TUNEL, a ponta da seta, indica folículo não marcado. Barra de escala 50 μ m.

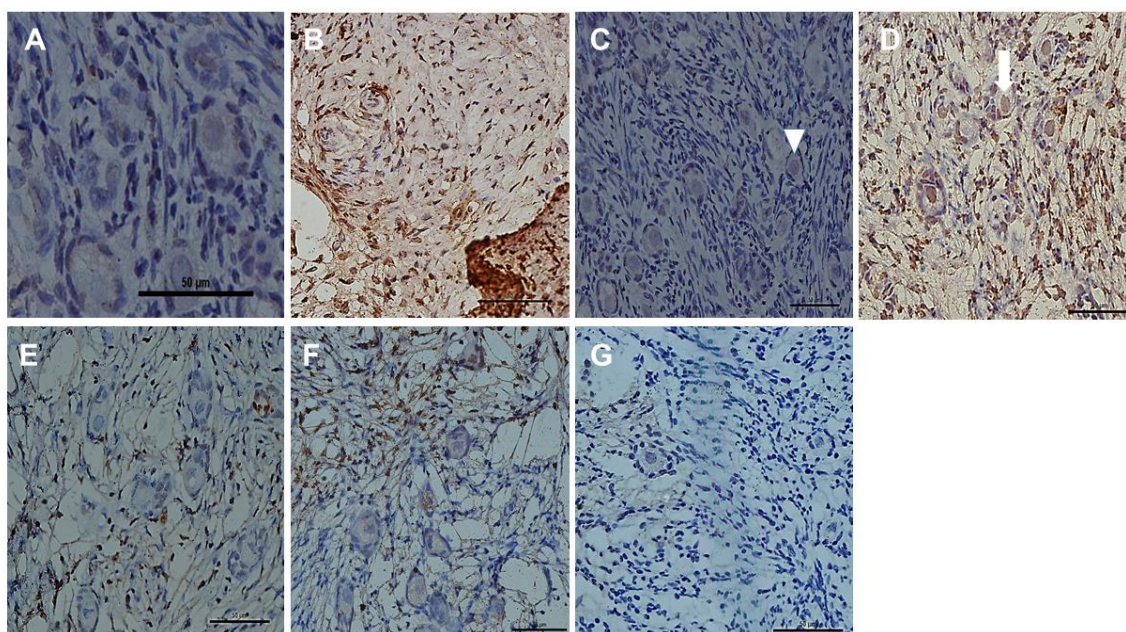


Tabela 2 - Densidade das células do estroma (MÉDIA \pm SEM), porcentagem de folículos pré-antrais com marcação da γ H2AX e sinal positivo para TUNEL nos grupos controle, INC e vitrificados na ausência (SAA) ou presença de antioxidantes (CAT ou ALA).

Tratamentos	Densidade das células do estroma	FOPA com focos γ H2AX (%)	FOPA com TUNEL positivo (%)
Controle	170,6 \pm 4,8 ^A	62,5 (10/16) ^{AB}	2,8 (2/71) ^A
INC	145,3 \pm 5,6 ^B	45,2 (33/73) ^A	42,1 (24/57) ^B
SAA	162,2 \pm 6,8 ^{AB}	82,1 (23/28) ^{BC}	5,4 (4/73) ^A
CAT40	126,0 \pm 5,0 ^C	92,3 (24/26) ^C	5,4 (2/37) ^A
ALA100	145,7 \pm 5,4 ^B	80,0 (4/5) ^{AC}	0,0 (0/19) ^A

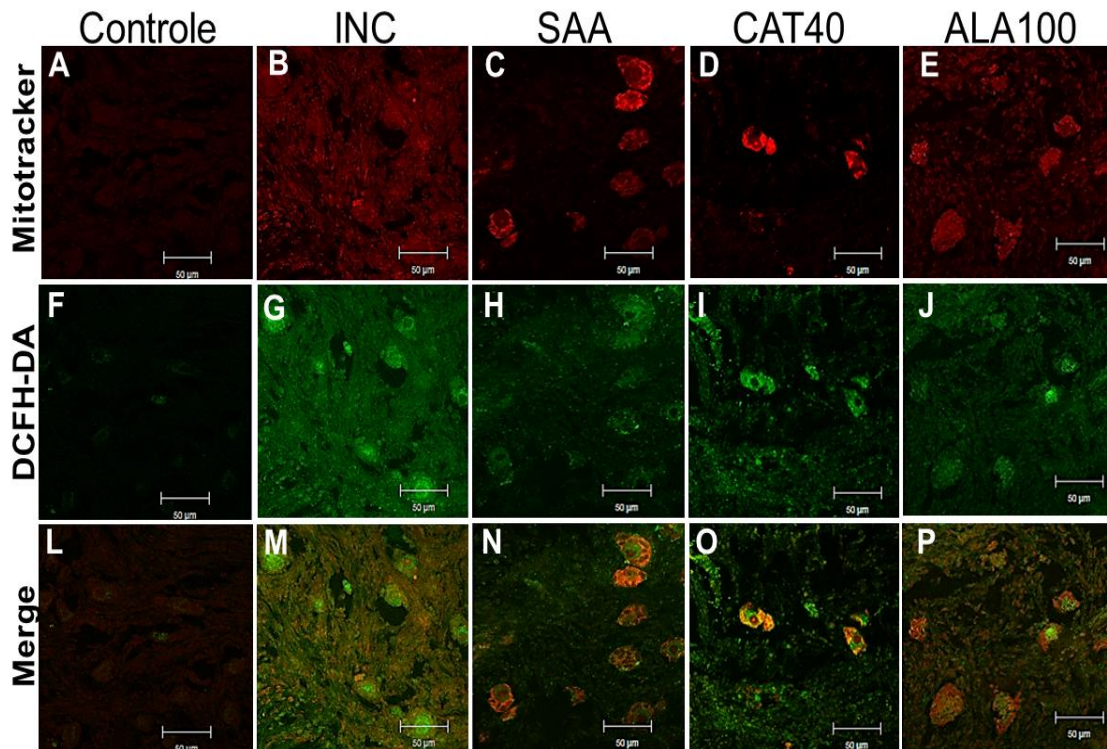
^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

7.8 Atividade mitocondrial e níveis intracelular de ROS

A atividade mitocondrial e os níveis de ROS intracelular foram analisados através da intensidade de fluorescência das sondas Mitotracker Orange e DCFH-DA, respectivamente, bem como a fusão das duas sondas (Figura 13).

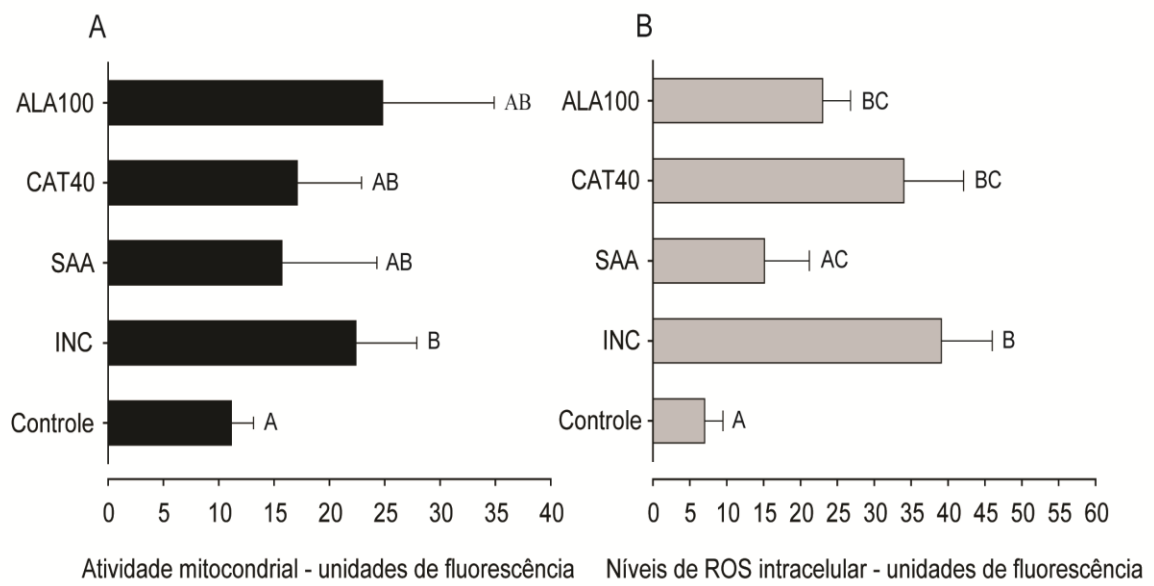
Figura 13 - Imagens representativas da atividade mitocondrial representada pela

intensidade de fluorescência do Mitotracker (A-E), níveis de ROS intracelular representado pela intensidade fluorescência do DCFH-DA (F-J) e sobreposição das duas sondas (L-P) nos diferentes tratamentos (Controle, INC, SAA, CAT40 e ALA100). Barra de escala 50 μ m.



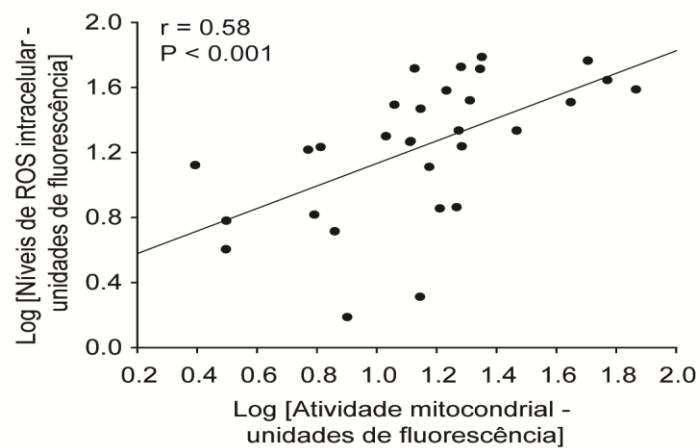
No que se refere a atividade mitocondrial (Figura 14A), somente o grupo INC foi significativamente superior ao grupo controle ($P < 0.05$). Os grupos CAT40, ALA100 e SAA foram semelhantes aos grupos controle e INC. Em relação aos níveis de intracelulares de ROS (Figura 14B), foi observado que a intensidade de fluorescência foi significativamente superior ($P < 0.05$) nos grupos INC, CAT40 e ALA100, comparado ao controle. Além disso, o grupo INC foi significativamente maior ($P < 0.05$) ao SAA, e semelhante a CAT40 e ALA100. Concomitantemente, o aumento da atividade mitocondrial (Mitotracker) resultou no aumento da porcentagem dos níveis de ROS (DCFH-DA) (Figura 15).

Figura 14 - Quantificação da atividade mitocondrial através da intensidade de fluorescência da sonda Mitotracker (A) e níveis de ROS intracelular através da intensidade de fluorescência do DCFH-DA (B) nos grupos controle, INC e vitrificado SAA e com CAT ou ALA. Os valores foram expressos como unidades de fluorescência (Média \pm SEM).



A,B,C indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Figura 15 - Correlação entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de ROS. Cada ponto do gráfico representa uma amostra de tecido ovariano ($n = 30$), $r = 0,58$; $P = 0,001$.



8. Discussão

Muitos estudos têm demonstrado que o transplante de tecido ovariano criopreservado por congelamento lento (DONNEZ et al 2004; 2011; 2012; CALLEJO et al., 2013; CAMPBELL et al., 2014) ou vitrificação (BORDES et al., 2005, KAWAMURA et al., 2013; SUZUKI et al., 2015), proporciona grandes benefícios à medicina regenerativa, incluindo a restauração da função reprodutiva. No entanto, ambos os métodos de criopreservação causam um aumento significativo de estresse oxidativo que pode levar à degeneração de folículos presentes no ovário. Portanto, os esforços atuais na melhoria da criopreservação do tecido ovariano, em parte, concentram-se no estabelecimento de um protocolo ótimo, que, dentre outros fatores, envolve a suplementação das soluções de vitrificação com antioxidantes. Neste estudo, foram investigados os efeitos da adição da catalase e do ácido alfa lipóico na solução de vitrificação de tecido ovariano ovino, sobre a morfologia e desenvolvimento folicular, densidade das células estromais, níveis de ROS, danos no DNA, bem como função mitocondrial dos folículos pré-antrais.

Este estudo mostrou que, ao contrário do tecido vitrificado com o antioxidante ALA, tecidos vitrificados com a catalase (CAT) ou mesmo sem antioxidantes (SAA) ou apresentaram percentuais de morfologia folicular normal menores que em tecidos frescos (grupo controle) ou apenas incubados (INC). Esses dados mostram a relevância da utilização de antioxidantes, bem como da concentração e do tipo desse suplemento na solução de vitrificação. Este é também o primeiro estudo a mostrar o efeito benéfico do ALA na solução de vitrificação de tecido ovariano ovino. Estudos anteriores realizados em camundongos mostraram que esse mesmo antioxidante manteve a morfologia folicular normal, quando adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais frescos (TALEBI et al., 2012) ou vitrificados (HATAMI et al., 2014a).

No que se refere a catalase, de acordo com estudos prévios realizados por nossa equipe, a adição de 20 UI na solução de congelamento lenta reduziu a peroxidação lipídica (LUZ et al., 2012) e na solução de vitrificação foi capaz de controlar a produção de ROS (CARVALHO et al., 2014) no tecido ovariano caprino.

Quanto à porcentagem de folículos em desenvolvimento, observou-se que, a adição de ALA na concentração de 100 μ M aumentou as taxas de folículos em desenvolvimento em relação ao tecido apenas incubado (INC), ou seja, que não foi

submetido ao procedimento de vitrificação, indicando que esse antioxidante é capaz de proteger os folículos contra crioinjúrias permitindo seu desenvolvimento. Sabe-se que, durante os procedimentos de criopreservação, o sistema de proteção endógeno falha (FABBRI et al., 2014), assim, pode-se sugerir que o uso de antioxidantes exógenos investigados durante o processo de vitrificação, especialmente ALA 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$, poderia constituir uma estratégia útil para proteger a função endógena dos sistemas celulares do ovário. Comparando também diferentes concentrações (50, 100, 250 or 500 $\mu\text{M}/\text{ml}$) de ALA no cultivo in vitro de folículos pré-antrais frescos, presentes no tecido ovariano de camundongos, Talebi et al. (2012) mostraram que a concentração de 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ foi melhor do que as demais, no que se refere ao desenvolvimento folicular. Diante desses achados, nós acreditamos que uma concentração de ALA abaixo de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ não é capaz de eliminar uma quantidade suficiente de radicais livres, de modo que, aqueles que permanecem, representam perigo para a célula, causando conseqüentemente, prejuízo para a função celular.

No presente estudo observou-se que os níveis de ROS nos tratamentos INC e ALA100 foram similares entre si e inferiores aos encontrados em CAT10 e CAT20, concomitantemente. Este resultado pode ser explicado, pelo fato de que ALA sintetiza glutathiona e aumenta a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (AKPINAR et al., 2008), sendo, portanto, mais efetivo do que a catalase. Estudos realizados anteriormente em camundongos, também mostraram que o ALA diminuiu os níveis de ROS, aumentou a capacidade antioxidante total, melhorou as taxas de sobrevivência e competência de desenvolvimento dos folículos pré-antrais isolados vitrificados e aquecidos após cultivo in vitro de longa duração (HATAMI et al., 2014b). Todos esses dados revelam o efeito positivo do ALA sobre os folículos pré-antrais.

Como pode ser constatado, no presente estudo, o ALA na concentração de 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ foi superior à catalase em algumas concentrações para a morfologia (CAT10) e desenvolvimento folicular (CAT40) e níveis de ROS (CAT10 and CAT20). De acordo com Hatami et al. (2014b), o tecido ovariano sofre muitos danos morfofuncionais em consequência de hipóxia ou de produção de radicais livres durante os procedimentos de criopreservação/aquecimento. Portanto, de acordo com o tipo e concentração de antioxidante utilizado na solução de vitrificação, as crioinjúrias foliculares podem ser atenuadas.

Com relação à densidade das células do estroma, observou-se que o

tratamento CAT40, obteve o menor número de células, sendo significativamente menor do que todos os demais tratamentos. Um estudo recente realizado por nossa equipe em cabras, mostrou que a vitrificação na presença de 20 UI / mL de catalase não reduziu a densidade celular (CARVALHO et al., 2013). Isso pode ser devido à menor concentração utilizada. Por outro lado, estudos em seres humanos (GOOK et al., 1999, HREINSSON et al., 2003, EYDEN et al., 2004), bem como em cabras e ovelhas (FAUSTINO et al., 2010), a vitrificação sem antioxidantes também reduziu a densidade das células do estroma. Isto sugere que é essencial definir o tipo e a concentração do antioxidante para uma boa preservação, não apenas dos folículos, mas também das células do estroma, devido a sua importância na produção de peptídeos e fatores de crescimento, essenciais para o crescimento e desenvolvimento celular (PICTON et al., 2008). Além disso, as células do estroma são importantes para a manutenção das interações celulares, proporcionando assim a sinalização necessária para a formação, desenvolvimento e migração dos folículos dentro do ovário (WEST e SHEA, 2007).

No que se refere aos danos ao DNA, estes foram identificados por meio da localização da proteína γ H2AX, a qual está envolvida nesse processo. Foi observado que no tecido vitrificado na presença de CAT na concentração de 40 UI, os danos ao DNA dos folículos foram similares àqueles observados nos tecidos vitrificados na ausência de antioxidante (SAA), controle estavam mais presentes em relação ao tecido fresco. Por outro lado, o tecido que foi apenas incubado (INC) apresentou maior positividade para o teste do TUNEL, ou seja, maior presença de células apoptóticas. Acredita-se que no caso dos dois tratamentos com vitrificação (SAA e CAT40), o dano ainda estivesse no início, porém, é possível que em ambos tratamentos, a maquinaria celular tenha sido capaz de reparar os danos ocorridos, em virtude de não terem apresentado um grande percentual de marcação para o TUNEL.

A proteína γ H2AX desempenha um papel importante no recrutamento e manutenção de moléculas de reparo do DNA em locais de dano até que o reparo esteja completo (SVETLOVA et al., 2010). Aproximadamente 1% dessas rupturas de DNA são convertidas em DSBs, principalmente durante a replicação do DNA, enquanto que os 99% restantes são reparados (PODHORECKA et al., 2010). Isso pode explicar a baixa percentagem de folículos marcados para o TUNEL no controle, bem como nos demais tratamentos (SAA, CAT40, CAT100).

Por outro lado, no tratamento INC, acredita-se que no momento da análise, os danos já poderiam estar em um estágio avançado, o que poderia explicar a baixa percentagem de marcação para γ H2AX, concomitante ao alto percentual de folículos TUNEL positivos. A fosforilação da histona H2AX na serina139 é um evento inicial no processo de dano (ROGAKOU et al., 1998), enquanto que a marcação para o TUNEL representa um evento tardio no processo de apoptose (Loro et al., 1999; GOWN & WILLINGHAM et al., 2012).

Devido ao papel fundamental das mitocôndrias na produção de adenosine trifosfato (ATP), bem como no desenvolvimento folicular, maturação citoplasmática e competência oocitária (NAGAI et al., 2006), foi analisada a atividade mitocondrial nos folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano. Somente a atividade mitocondrial do tecido apenas incubado (INC) foi significativamente superior ao controle, indicando hiperatividade celular, levando ao estresse oxidativo (FABBRI et al., 2014). Curiosamente os tratamentos submetidos a vitrificação (SAA, CAT40 e ALA100), foram semelhantes aos grupos controle e INC, visto que o processo de criopreservação pode comprometer a atividade mitocondrial, devido ao choque térmico (SOHN et al., 2002), condições físicas e químicas, às quais o tecido é submetido (FABBRI et al., 2014), às forças osmóticas geradas durante a vitrificação e também às condições de aquecimento (SALEHNIA et al., 2013). Isso pode ser uma estratégia do tecido para tentar superar as injúrias sofridas durante o processo de criopreservação. Como as mitocôndrias são fontes de ROS (TAKAHASHI et al., 2013) e essenciais para vários processos fisiológicos (BERGAMINI et al., 2004), a incapacidade de defesa antioxidante das células, pode aumentar a produção de ROS e causar estresse oxidativo (VELEZ-PARDO et al., 2007; AGARWAL et al., 2012). Isso pode explicar o aumento na produção de ROS observado no presente estudo, após a vitrificação. Resultados similares foram observados após a criopreservação de oócitos de várias espécies (vaca: ZHANG et al., 2011; porca: SOMFAI et al., 2017; GUPTA et al., 2010 e camundongos: TATONE et al., 2010), embriões de camundongos (MARTINO et al., 2013) e no tecido ovariano humano (FABBRI et al., 2014). No presente estudo, houve uma correlação positiva entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de ROS. No tecido ovariano humano congelado, FABBRI et al., (2014) também verificaram que o aumento da atividade mitocondrial e níveis de ROS aumentaram as condições de estresse oxidativo. Esse fato confirma que danos nas mitocôndrias podem causar um desequilíbrio entre a

produção e remoção de ROS, bem como o excesso de ROS pode levar à disfunção mitocondrial (ZHAO et al., 2015).

9. Conclusão

A vitrificação de tecido ovariano ovino na presença de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de ALA preservou a morfologia, promoveu o desenvolvimento e causou menos danos ao DNA dos folículos pré-antrais. Apesar dos resultados satisfatórios do presente estudo, nós sugerimos a realização de novos estudos para definir a concentração ideal de ALA, de modo a favorecer todas os parâmetros avaliados.

A vitrificação de tecido ovariano ovino na presença de 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de ALA preservou a morfologia, promoveu o desenvolvimento, causou menos danos no DNA dos folículos pré-antrais e manteve os níveis de ROS no meio de incubação e atividade mitocondrial inalterados.

10. Perspectivas

Apesar dos resultados satisfatórios do presente estudo, acredita-se que a utilização de ALA em concentrações mais elevadas ou em associação com outros antioxidantes, bem como, a manutenção do mesmo no meio de cultivo *in vitro* após a vitrificação, poderão também oferecer resultados mais satisfatórios. Além disso, acreditamos que outra possibilidade de melhorar os resultados, será aumentando o período do cultivo, para 7 ou mais dias, como também realizando um cultivo *in vivo*, ou seja, o transplante do tecido ovariano após a criopreservação.

Referências

ADHIKARI D AND LIU K. Molecular Mechanisms Underlying the Activation of **Mammalian Primordial Follicles**. *Endocrine Reviews*, v. **30**, p. **438-464**, 2009.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 49-65, 2008.

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

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S.; The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 18, n. 3, p. 325–332, 2006.

AGARWAL A, APONTE-MELLADO A, PREMKUMAR BJ, SHAMAN A & GUPTA S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 49, 2012.

AITKEN, R.J. Os radicais livres, peroxidação lipídica e na função dos espermatozoides. **A reprodução, fertilidade e Desenvolvimento**, v. 7, p. 659 – 668, 1995.

AKPINAR, D.; YARGICOGLU, P.; DERIN, N.; ALICIGUZEL, Y.; AGAR, A. The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint stress. **Physiological Research**, v. 57, n. 6, p. 893–901, 2008.

AMARAL, S.; AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. Aging and male reproductive function: a mitochondrial perspective. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 181-197, 2013.

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

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morula e from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.

AUBARD, Y. C.; POIROT, P.; PIVER, S. GALINAT, M.P. Teissier Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 414–415, 2001.

AUSIO J and ABBOTT DW: The many tales of a tail: carboxyterminal tail heterogeneity specializes histone H2A variants for defined chromatin function. **Biochemistry**, v.41, p. 5945-5949, 2002.

BANDEIRA, F.T.; CARVALHO, A.A.; CASTRO, S.V.; LIMA, L.F.; VIANA, DA, EVANGELISTA J.S.; PEREIRA. M.J.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P. Two methods of vitrification followed by in vitro culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 2, p. 177-185, 2015.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, 2010.

BARNETT, K.R., SCHILLING, C., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v .12, n. 5, p. 537–555, 2006.

BECONI, M.T.; FRANZIA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, p. 545–553, 1993.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M.S.; ALEEM, A.A.; SHARMA, R.K.; WORLEY, S.E. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen

species. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 593-600, 2004.

BENKHALIFA, M.; FERREIRA, Y.J.; CHAHINE, H.; LOUANJLI, N.; MIRON, P.; MERVIEL, P.; COPIN, H. Mitochondria: Participation to infertility as source of energy and cause of senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 55, p. 60–64, 2014.

BERGAMINI C.M., GAMBETTI S., DONDI A & CERVELLATI C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, p. 1611–1626, 2004.

BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; COURBIERE, B.; GUERIN, J.F.; SALLE B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. **Human Reproduction**, v. 10, p. 2745-2748, 2005.

BYUN, C.H.; KOH, J.M.; KIM, D.K.; PARK, S.I.; LEE K.U.; KIM, G.S. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 7, p. 1125–1135, 2005.

CALLEJO J., SALVADOR C., GONZÁLEZ-NUÑEZ S., ALMEIDA L., RODRIGUEZ L., MARQUÉS L., VALLS A. AND LAILLA J.M. Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, p. 33, 2013.

CAMPBELL, B.K.; HERNANDEZ-MEDRANO, J., ONIONS, V., PINCOTT-ALLEN, C., ALJASER, F., FISHER, J., MCNEILLY, A.S., WEBB, R. AND PICTON, H.M. Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. **Human Reproduction**, v. 29, n. 8 p. 1749 –1763, 2014.

CARVALHO, A. A.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S.V.; LOPES, C. A. P. Novel widecapacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). **Animal Reproduction Science**, p. 220-227, 2013.

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 in Veterinary Science**, v. 97, p. 140–147, 2014.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro. **Reproductive Science**, v. 16, p. 239-246, 2009.

CHANDRA, J.; SAMALI, A. and ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 323–333, 2000.

CHEN, C., HAN, S., LIU, W., WANG, Y., HUANG, G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 1045–1050, 2012

COMBELLES, C.M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864-880, 2009.

COTICCHIO, G.; BROMFIELD, J.J.; SCIAJNO, R.; GAMBARDELLA, A.; SCARAVELLI, G.; BORINI, A.; ALBERTINI, D.F. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v.19, n. 3, p. 29-34, 2009.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C.K. **Entendendo a gordura - os ácidos graxos**. São Paulo, 2002.

DAI, J.; WU, C.; MUNERI, C. W.; NIU, Y.; ZHANG, S.; RUI, R.; ZHANG, D. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. **Cryobiology**, v. 71, p. 291–298, 2015.

DELA PENA, E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; ATABAY, E.C.; NAGANO, M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v. 123, n. 4, p. 593-600, 2002.

DHARMA, S.J., MODI, D.N., NANDEDKAR, D.T. Gene expression profiling during early folliculogenesis in the mouse ovary. **Fertility and Sterility** v. 91, p. 2025-2036, 2009.

DINARA, S.; SENGOKU, K.; TAMATE, K.; HORIKAWA, M.; ISHIKAWA, M. Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1976–1981, 2001.

DING, C. C.; THONG, K. J.; KRISHNA, A.; TELFER, E. E. Activin A inhibits activation of human primordial follicles in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p. 141-147, 2010.

DOLMANS, M. M.; JADOUL, P.; GILLIAUX, S.; AMORIM, C. A.; LUYCKX, V.; SQUIFFLET, J.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A.A. Review of 15 years of ovarian tissue bank activities. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, p. 305-314, 2013.

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

DONNEZ J, SQUIFFLET J, JADOUL P, DEMYLLE D, CHERON AC, VAN LANGENDONCKT A & DOLMANS MM. Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic

disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. **Fertility and Sterility**, v. 95, p. 1787.e 1–1787, 2011.

DONNEZ J, JADOUL P, PIRARD C, HUTCHINGS G, DEMYLLE D, SQUIFFLET J, SMITZ J & DOLMANS MM. Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. **Fertility and Sterility**, v. 98, p. 720–725, 2012.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M.; PELLICER, A.; DIAZ-GARCIA, C.; SERRANO, M. S.; SCHMIDT, K. T.; ERNST, E.; LUYCKX, V.; ANDERSEN, C. Y. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v. 99, 1503-1513, 2013.

DONNEZ, J. and DOLMANS, M. M. Transplantation of ovarian tissue. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 28, p. 1188-1197, 2014.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B / Biological Science**, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, 2009.

DROGE W· Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUAN, X.; DAI, X.; WANG, T.; LIU, H.L. and SUN, S.C. Melamine negatively affects oocyte architecture, oocyte development and fertility in mice. **Human Reproduction**, v.30, n.7, p. 1643–1652, 2015.

EDEAS, M.; WEISSIG, V. Targeting mitochondria: strategies, innovations, and challenges: the future of medicine will come through mitochondria. **Mitochondrion**, v. 13, n.1, p. 389-390, 2013.

EYDEN B.J., RADFORD S.M., SHALET N., THOMAS D.R., BRISON B.A., LIEBERMAN. Preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in

dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. **Ultrastructure Pathology**, v. 28, n.4, p. 239-245, 2004.

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

FAUSTINO, L.R., SANTOS, R.R., SILVA, C.M.G., PINTO, L.C., CELESTINO, J.J.H., CAMPELLO, C.C., et al., Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 90–97, 2010.

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

FIGUEIREDO, J.R. Isolement, caracterisation et culture des follicules pré-antraux chez les bovins. 1995. 113f. Thèse - Université de Liège, Liège, Belgique, 1995.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA In: Gonçalves PBD, FIGUEIREDO JR, FREITAS VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Roca: São Paulo, 2ª ed., p. 303-327, 2008.

FREEMAN, B.A. and CRAPO, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v. 47, p. 412, 1982.

GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v.119, p. 493–501, 1992.

GOOK DA, EDGAR DH & STERN C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2061–2068, 1999.

GOSDEN, R. G.; BAIRD, D. T.; WADE, J. C.; WEBB, R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. **Human Reproduction**, v. 9, p. 597-603, 1994.

GUERREIRO, D.D.; LIMA, L.F.; RODRIGUES, G.Q.; CARVALHO, A., CASTRO S.V.; CAMPELLO, C.C.; PESSOA, C.D.O.; GADELHA, C.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BORDIGNON V.; RODRIGUES, A.P. In situ cultured preantral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. **Microscopy Research and Technique**, v. 79, n. 8, p. 773-81, 2016.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NAND, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57-63, 2008.

GUPTA, S.; MALHOTRA, N.; SHARMA, D.; CHANDRA, A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: clinical implications. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 2, p. 147–164, 2009.

GUPTA, M.K., UHM, S.J., LEE, H.T. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 93, p. 2602–2607, 2010.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: B. Hafez, E. S. E. Hafez, **Reprodução animal**, 7^o edição, São Paulo: Manole, p. 13-29, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 246, p. 501-14, 1986.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine

(2nd edn). **Clarendon Press**, Oxford, 1989.

HASSA, P. O.; HOTTIGER, M. O. An epigenetic code for DNA damage repair pathways? **Biochemistry and Cell Biology**, v.83, n. 3, p. 270-285, 2005.

HATAMI, S.; ZAVAREH, S.; SALEHNIA, M.; LASHKARBOLOUKI, T.; GHORBANIAN, M. T. and KARIMI I. The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified pre-antral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. **Iranian Biomedical Journal**, v. 12, n. 1, p. 57-64, 2014a.

HATAMI, S.; ZAVAREH, S.; SALEHNIA, M, LASHKARBOLOUKI T.; KARIMI I. Comparison of oxidative status of mouse pre-antral follicles derived from vitrified whole ovarian tissue and vitrified pre-antral follicles in the presence of alpha lipoic acid. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, n. 6, p. 1680-1688, 2014b.

HELT, C. E., CLIBY, W. A., KENG, P. C., BAMBARA, R. A. and M. A. O 'Reilly, "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage," *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 2, p. 1186–1192, 2005.

HREINSSON, J., ZHANG, P., SWAHN, M.L., HULTENBY, K., HOVATTA, O. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. **Human Reproduction**, v.18, p. 2420–2428, 2003.

HUANG, L.; MO, Y.; WANG, W.; LI Y, ZHANG, Q.; YANG, D. Cryopreservation of human ovarian tissue by solidsurface vitrification. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 139, p. 193-198, 2008.

JACQUES DONNEZ & MARIE-MADELEINE DOLMANS. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion

of the technique towards routine clinical practice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2015.

JACKSON, S. P. "Sensing and repairing DNA double-strand breaks," *Carcinogenesis*, v. 23, n. 5, p. 687–696, 2002.

JONES, A.; BLERKOM, J.V.; DAVIS, P.; ANDREW, A.T. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. ***Human Reproduction***, v. 19, n. 8, p. 1861–1866, 2004.

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

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, CH.; KAWAMURA, N.; TAMURAA, M.; HASHIMOTOE, S.; SUGISHITAA, Y.; MORIMOTOE, Y.; HOSOIF, YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B. AND HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. Edited by John J. Eppig, ***The Jackson Laboratory***, 2013.

KNIGHT, P.G., GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. ***Reproduction***, v. 132, p. 191–206, 2006.

KOBAYASHI J: Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to γ -H2AX through FHA/BRCT domain. *Journal of Radiation Research: Oxford Journals*, v. 45, p. 473-478, 2004.

KUO LINDA J. and YANG LI-XI. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Doublestrand Breaks. ***In vivo***, v. 22, p. 305-310, 2008.

LAMPIAO, F. Free radicals generation in an in vitro fertilization setting and how to minimize them. ***World Journal of Obstetrics and Gynecology***, v. 1, p. 29–34, 2012.

LARMAN, M.G.; MINASI, M.G.; RIENZI, L.; GARDNER, D.K. Maintenance of the meiotic spindle during vitrification in human and mouse oocytes. ***Reproductive***

BioMedicine Online, v. 15, n. 6, p. 692-700, 2007.

LEONI, G. G.; PALMERINI, M.G.; SATTA, V.; SUCCU, S.; PASCIU, V.; ZINELLU, A.; CARRU, A.; MACCHIARELLI, G.; NOTTOLA, S.A.; NAITANA, S. AND BERLINGUER, F. Differences in the Kinetic of the First Meiotic Division and in Active Mitochondrial Distribution between Prepubertal and Adult Oocytes Mirror Differences in their Developmental Competence in a Sheep Model. **Plos One**, v. 10, n. 4, 2015.

LIMA, L. F.; ROCHA, R. M. P.; ALVES, A. M. C. V.; SARAIVA, M. V. A.; ARAÚJO, V. R.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. **Homeopathy**, v. 102, p. 41-48, 2013.

LIN; MICHAEL, T.; BEAL, M.; FLINT. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, 2006.

LIU, H.C.; HE, Z.; ROSENWAKS, Z. Mouse ovarian tissue cryopreservation has only a minor effect on in vitro follicular maturation and gene expression. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 20, p. 421-431, 2003.

LIU, C. F., LIU, C, and YAO, H. H. C. Building Pathways for Ovary Organogenesis in the Mouse Embryo. Current Topics in **Developmental Biology**, v. 90, 2010.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; MEESUNGNOEN, J.; JAYGERIN, J.P.; MAKHETKORN, S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 323-331, 2005.

LORNAGE, J.; COURBIÈRE, B.; MAZOYER, C.; ODAGESCU, V.; BAUDOT, A.; BORDES, A.; POIREL, M. T.; FRANCK, M.; SALLE, B. Vitrification du tissu ovarien: cortex et ovaire entier chez la brebis. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 34, n.

9, p. 746-753, 2006.

LORO, L.L.; VINTERMYR, O.K.; LIAVAAG, P.G.; JONSSON, R.; JOHANNESSEN, A.C. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl2/bax expression. Ratio and increased apoptosis. **Human Pathology**, v. 30, n. 9, p. 1097-1105, 1999.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproduction Biology**, v. 5, n. 1, p. 5–17, 2005.

LUNARDI, F.O. **Vitrificação e cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos: uma alternativa para a preservação da função reprodutiva de fêmeas**. Tese – Programa de pós graduação em ciências veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, p. 101, 2015

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

LUNARDI, F.O., AGUIAR, F. L. N., DUARTE, A. B. G., ARAÚJO, V. R., LIMA, L.F., SÁ, N.A.R, CORREIA, H.H.V, DOMINGUES, S.F.S., CAMPELLO, C.C, SMITZ, J., FIGUEIREDO, J.R. AND RODRIGUES, A.P.R. Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop in vitro better than those vitrified into the ovarian fragments. **Theriogenology**, v. 85, p. 1203-1210, 2016.

LUZ, HIEDELY K. M.; SANTOS, REGIANE R.; WANDERLEY, LIVIA S.; FAUSTINO, LUCIANA R.; SILVA, CLEIDSON M. G.; CARVALHO, ADELIN A.; CAMPELLO, CLAUDIO C.; SANTOS, FRANCIELLI W.; FIGUEIREDO, R. AND RODRIGUES, ANA PAULA R. Catalase Prevents Lipid Peroxidation and Enhances Survival of Caprine Preantral Follicles Cryopreserved in a 1,2-Propanediol-Freezing Medium. **Biopreservation and biobanking**, v. 10, n. 4, 2012.

LUZ, V.B., V.R. ARAUJO, A.B.G. DUARTE, J.J.H. CELESTINO, T.F.P. SILVA, D.M. MAGALHAES-PADILHA, R.N. CHAVES, I.R. BRITO, A.P. ALMEIDA, C.C. CAMPELLO, C. FELTRIN, M. BERTOLINI, R.R. SANTOS, J.R. FIGUEIREDO. Eight-Cell Parthenotes Originated From *In vitro* Grown Sheep Preantral Follicles. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 11, p. 1219-1225, 2012.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAUJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2011.

MARTINO, N.A., DELL'AQUILA, M.E., CARDONE, R.A., SOMOSKOI, B., LACALANDRA, G.M., CSEH, S. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. **Reproductive Biology and Endocrinology** p. 1311:1327, 2013.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.

McLAUGHLIN, M.; TELFER, E. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, p. 971-978, 2010.

MEIROW, D. Fertility preservation in cancer patients using stored ovarian tissue: clinical aspects. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, v. 15, n. 6, p. 536-47, 2008.

MIRZAEI, H.; REGNIER F. Protein:protein aggregation induced by protein oxidation. **Journal Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, v. 873, n. 1, p. 8-14, 2008.

MORGAN, S.; LOPES, F.; GOURLEY, C.; ANDERSON, R.A.; SPEARS, N. Cisplatin and Doxorubicin Induce Distinct Mechanisms of Ovarian Follicle Loss; Imatinib Provides Selective Protection Only against Cisplatin. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 701-

717, 2013.

NAGAI, S.; MABUCHI T, HIRATA S, ET AL. Oocyte mitochondria: strategies to improve embryogenesis. **Human Cell**, v. 17, n. 4, p. 195-201, 2004.

NAGAI, S; MABUCHI, T.; HIRATA S. ET AL., "Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence," **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 137–144, 2006.

NAGATA, S.; ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD". **Nature**, v. 391, p. 43–50, 1998

NORDBERG, J.; ARNER, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1682-1686, 2003.

OU X.H.; LI S.; WANG Z.B.; et al. Maternal insulin resistance causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in mouse oocytes. **Human Reproduction**, v. 27, n. 7, p. 2130-2145, 2012.

PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, n. 2, p. 227-50, 1995.

PACKER, L.; TRITSCHLER, H.J.; WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 359-378, 1997.

PEREZ G.I., TAO X.J. & TILLY J.L. Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 414 420, 1999.

PERROTA, V. & SHINAIDER, A. Radicais livres de oxigênio: Importância na fisiopatologia das lesões isquêmicas viscerais. **Academic Medicine**, v. 152, n. 1, p. 22-27, 1992.

PFEIFFER, N.V.; DIRNDORFER, D.; LANG, S.; RESENBERGER, U.K.; RESTELLI, L.M.; HEMION. Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 7, p. 1036–1051, 2013.

PICTON, H.M., HARRIS, S.E., MURUVI, W., CHAMBERS, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction (Cambridge, England)**, v.136, p. 703–715, 2008.

PLANTE, L. and KING, W.A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by in vitro and in vivo fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 11, n. 10, p. 515-529, 1994.

PODHORECKA M.; SKLADANOWSKI A.; BOZKO P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. **Journal of Nucleic Acids**, v. 3, p. 2010.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1163–1182, 2004.

POSILLICO, S.; KADER, A.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Ovarian Tissue Vitrification: Modalities, Challenges and Potentials. **Current Women's Health Reviews**, v. 6, 2010.

PRACHAR, J. Mouse and human mitochondrial nucleoid—detailed structure in relation to function. **General Physiology Biophysics**, v. 29, p. 160–174, 2010.

RAKHIT, M.; GOKUL, S.R.; AGARWAL, A.; DU, PLESSIS S.S. Studies on Women's Health. **Antioxidant strategies to overcome OS in IVF-Embryo transfer**; p. 237–

262, 2013.

ROGAKOU, E.P.; PILCH, D.R.; ORR, A.H.; IVANOVA, V.S.; BONNER, W.M. DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 5858–5868, 1998.

ROTI ROTI, E.C.; LEISMAN, S.K.; ABBOTT, D.H.; SALIH, S.M. Acute Doxorubicin Insult in the Mouse Ovary Is Cell- and Follicle-Type Dependent. **PLoS ONE**, v. 7, n.8, p.422-493, 2012.

SAJAL, GUPTA; LUCKY, SEKHON; KIM, Y.; ASHOK, AGARWAL. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. **Women's Health Revista**, v. 6, p. 227-238, 2010.

SALEHNIA, M.; TÖHÖNEN, V.; ZAVAREH, S. AND INZUNZA, J. Does Cryopreservation of Ovarian Tissue Affect the Distribution and Function of Germinal Vesicle Oocytes Mitochondria? **BioMed Research International**, 2013.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; BERTHOLLET, C.; LORNAGE, J. Longterm follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 1, p. 172-177, 2003.

SANFILIPPO, S.; CANIS, M.; SMITZ, J.; SION B.; DARCHA, C.; JANNY L. AND BRUGNON F. Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, p. 67, 2015.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reproductive Sciences**, v. 17, p. 1135-1143, 2010.

SESHAGIRI, P.B. and BAVISTER, B.D. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the 'Crabtree effect'. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 105-111, 1991.

SHAFIEI M., FOROUZANFAR M., MORTEZA H.S., HOSSEIN M.N E. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat sêmen. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1321–1327, 2015.

SILVA, J. R. V. Growth factors in goat ovaries and the role of ativina-A in the development of early-staged follicles. Phd Thesis. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, p.142, 2005.

SOHN, I. P., AHN, J. A., PARK, D. W., GYE M. C., JO, D. H., KIM, S. Y., MIN, C. K. AND KWON, H. C. Amelioration of Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis of Two-Cell Mouse Embryos after Freezing and Thawing by the High Frequency Liquid Nitrogen Infusion. **Molecules and Cells**, v. 13, n. 2, p. 272-280, 2002.

SOMFAI, T., YOSHIOKA, K., TANIHARA, F., KANEKO, H., NOGUCHI, J., KASHIWAZAKI, N., et al. Generation of Live Piglets from Cryopreserved Oocytes for the First Time Using a Defined System for *In Vitro* Embryo Production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, e97731, 2014.

SONODA, E., HOCHEGGER, H., SABERI, A., TANIGUCHI, Y. and TAKEDA, S. "Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair," **DNA Repair**, v. 5, n. 9-10, p. 1021–1029, 2006

SQUIRRELL. J.M., WOKOSIN D.L., WHITE J.G. and BAVISTER B.D. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. **Nature Biotechnol**, v.17, p. 763-767, 1999

SRIVASTAVA, S. Effect of Ascorbic Acid, Caffeine and Chloroquine on the Freezability of Bovine Semen. M.V.Sc. Thesis, IVRI, Izatnagar - 243 122, U.P. India, 2000.

SUZUKI, N.; HASHIMOTO, S.; IGARASHI, S.; TAKAE, S.; YAMANAKA, M.; YAMOCHI, T.; TAKENOSHITA, M.; HOSOI, Y.; MORIMOTO, Y.; ISHIZUKA, B. Assessment of longterm function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkey. **Human Reproduction**, v. 27, n. 8, p. 2420-2429, 2012.

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

SVETLOVA, M.P.; SOLOVJEVA, L.V.; TOMILIN, N.V. Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks. **Mutation Research**, v. 1, n. 2, p. 54–60, 2010.

TAKAHASHI T, IGARASHI H, AMITA M, HARA S, MATSUO K & KURACHI H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 39, p. 1431–1439, 2013.

TALEBI, A.; ZAVAREH, S.; KASHANI, M.H.; LASHGARBLUKI, T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 2, p. 175–183, 2012.

TARUMI, W.; SUZUKI, N.; TAKAHASHI, N.; KOBAYASHI, Y.; KIGUCHI, K.; SATO, K.; ISHIZUKA, B.J. Ovarian toxicity of paclitaxel and effect on fertility in the rat. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, p. 414–420, 2009.

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

TATONE, C., DI EMIDIO, G., VENTO, M., CIRIMINNA, R & ARTINI, P.G. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**. v. 26, p.563-567, 2010.

TORNER, H., ALM, H., KANITZ, W., GOELLNITZ, K., BECKER, F., POEHLAND, R., BRUESSOW, K.P., TUCHSCHERER, A. Effect of initial cumulus morphology on meiotic dynamic and status of mitochondria in horse oocytes during IVM. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 176-83, 2007

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14 p. 243–258, 2008.

VAN BLERKOM, J.; RUNNER, M.N.; Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. **The American Journal of Anatomy**, v. 17, p. 335–355, 1984.

VAN BLERKOM, J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. **Journal of Electron Microscopy**. Tech., 16, 324-346, 1990.

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

VANNUCCHI, H. et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, 1998.

VELEZ-PARDO C, MORALES AT, DEL RIO MJ & OLIVERA-ANGEL M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine

embryos. **Theriogenology**, v. 67, p. 1285–1296, 2007.

VOLOBOUEVA, L.A.; LIU, J.; SUH, J.H.; AMES, B.N.; MILLER, S.S. (R)-alpha-lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 11, p. 4302–4310, 2005.

WEST, E. R.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Engineering the follicle microenvironment. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n. 4, p. 287-299, 2007.

WRIGHT C.S.; HOVATTA O.; MARGARA R.; TREW G.; WINSTON R.M.; FRANKS S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p.1555–1562, 1999.

YUCEBILGIN S.; TEREK M.C.; OZSARAN A.; AKERCAN F.; ZEKIOGLU O.; ISIK E.; ERHAN Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility. **Australian New Zealand J Obstetrics Gynaecol**, v. 44, p. 6–9, 2004.

ZHANG, J.M.; LIU, X.L.; YANG, Y.X.; WAN, X.P. Comparisons of different protocols for vitrifying mouse ovarian tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 4, p. 694–698, 2010.

ZHANG, X.M., DU, W.H., WANG, D., HAO, HS, LIU, Y., QIN, T., ZHU, H.B. Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 12, p. 942-950, 2011.

ZHANG, H.; WU, B.; LIU, H.; QIU, M.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ET AL. Improving development of cloned goat embryos by supplementing alpha-lipoic acid to oocyte in

vitro maturation medium. **Theriogenology**, v. 80, p. 228–233, 2013.

ZHAO, X.M., HAO, H.S., DU, W.H., ZHAO, S.J., WANG, H.Y., WANG, N., WANG, D., LIU, Y., QIN, T., ZHU, H.B. Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes **Journal of Pineal Research**, v. 60, n. 2, p. 132-41, 2015.

ANEXO

ARTICLE

Addition of antioxidant agents on vitrification solution improves the preservation of preantral follicles present in ovarian cortex

Luciana Mascena Silva^{1,2}, Danielle Cristina Calado de Brito¹, Denise Damasceno Guerreiro¹, Gildas Tetaping Mbemya¹, Giovanna Quintino Rodrigues¹, Jamily Bezerra Bruno¹, Maria Luana Gaudêncio dos Santos Morais^{1,2}, Nathalie Donfack Jiatsa¹, Benner Geraldo Alves¹, Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha², Francielli Weber Santos Cibirin³, Virgínia Cláudia Carneiro Girão², José Ricardo de Figueiredo¹ e Ana Paula Ribeiro Rodrigues^{1,2}.

¹ Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, ² Nucleus of study in microscopy and image processing (NEMPI) - Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, ³ Reproduction Biotechnology Laboratory (BIOTECH) - Federal University of Pampa, Malafaia, Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence should be addressed to A Salumets; Email: anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com

Abstract

Studies have shown that, during the vitrification of ovarian tissue, in addition to morphological changes, the follicles also suffer alterations in mitochondrial function and consequently DNA damage, culminating with apoptosis. Therefore, in this study, the

sheep ovarian tissue was vitrified in the absence or presence of antioxidants in different concentrations (catalase: 10, 20 and 40 IU/mL and alpha lipoic acid-ALA: 25, 50 and 100 μ M/mL) and incubated for 24 hours after warming to evaluate the morphology and follicular development; stromal cell density; levels of reactive oxygen species (ROS); Mitochondrial function and damage to DNA. Unlike, other treatments, the percentage of morphologically normal follicles in vitrified ovarian tissue in the presence of ALA in all concentrations did not differ from fresh tissue. The percentage of developing follicles was higher in ALA100 μ M/mL than those found in incubated or vitrified tissue with catalase (40 UI/mL) and ALA (25 or 50 μ M/mL), as well. The use of catalase affected significantly the density of the stromal cells (40 IU/mL), the levels of ROS (10 and 20 IU/mL), as well as the DNA damage revealed by γ H2AX (40 IU/mL). In conclusion, the vitrification of sheep ovarian tissue in the presence of 100 μ M/mL preserved the follicular morphology, promoted the development and caused less damage to the DNA of the follicles. According to the results of the present study, it is recommended to add antioxidants to the vitrification solution, however, for a better preservation, it is necessary to define the type and concentration of the antioxidant agent.

Introduction

In recent years the treatments used against cancer have resulted in high rates of healing and survival. However, the patients who need to undergo chemotherapy and/or radiotherapy are likely to suffer problems, such as premature ovarian failure and consequently early menopause, reducing the production of hormones. This leads to osteoporosis, cardiovascular diseases, psychosexual dysfunction (Duffy *et al.* 2009, Jeong *et al.* 2012) and infertility.

With the purpose of restoring reproductive function after cancer treatment compared with embryo and oocyte cryopreservation, the ovarian tissue cryopreservation is the best option. This strategy does not require any substantial delay in the start of anticancer treatments and it may save not only fertility but also hormonal gonadal function ([Lambertini et al. 2015](#)). The ovarian tissue cryopreservation allows to safeguard a large number of oocytes present in ovarian follicles and also preserves the structural and functional integrity of the ovary, thus enabling the restoration of endocrine and exocrine functions with the advantage of being able to retrieve ovarian tissue regardless of the stage of the estrous or menstrual cycle ([Posillico et al. 2010](#)).

Since the last decade, several researchers have reported the birth of healthy individuals after the transplantation of human ovarian tissue cryopreserved and in farm animals such as sheep. The vast majority of these studies have used the slow freezing (human: [Donnez et al. 2004](#); colocar pelos menos mais dois aqui mais recentes, ovine: [Gosden et al. 1994](#); [Salle et al. 2002](#); [2003](#), [Campbell et al. 2014](#)), however, the success of vitrification has also been reported in recent years, including the birth of healthy individuals in ovine ([Bordes et al. 2005](#)) and human ([Kawamura et al. 2013, 2015](#)). Despite these results, the ovarian cryopreservation is still considered as an experimental technique ([Lambertini et al. 2015](#)) and the rate of pregnancy from the ovarian tissue transplant cryopreserved is only 20-30% ([Schmid et al. 2011](#)). Independently of the method (slow freezing or vitrification) used, the cryopreservation process can cause an imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS) and consequently DNA damage. These are due to injuries in the cell membrane and mitochondrial dysfunction ([Tatone et al. 2010](#)). Such injuries compromise the potential of oocyte development and consequently the competence of a future embryo ([Fabbri et al. 2006](#), [Hashimoto et al. 2010](#), [Kim et al. 2011](#), [Santos et al. 2007](#)).

One of the forms to minimize the generation of ROS during the process of

cryopreservation is through the addition of antioxidants in slow freezing solution (Luz *et al.* 2012, Brito *et al.* 2014) or vitrification (Carvalho *et al.* 2013; 2014). Previous studies have shown that the catalase present in freezing and vitrification solution was able to reduce lipid peroxidation (Luz *et al.* 2012) and control the production of ROS (Carvalho *et al.* 2014) respectively. Another prominent antioxidant agent is the alpha lipoic acid, though, it has not yet been used in ovarian tissue cryopreservation procedures. Some studies have shown that this antioxidant has been favorable to the follicular and oocyte structures when manipulated *in vitro*. Alpha lipoic acid added to the culture medium of fresh or vitrified follicles of mice, decreases levels of ROS and increased the total antioxidant capacity (Talebi *et al.* 2012, Hatami *et al.* 2014 a,b). In a study with goat oocytes, Zhang *et al.* (2013) reported that alpha lipoic acid when added to maturation medium has significantly increased the oocyte maturation rate (69.8%) when compared to non-treated oocytes (control : 57.8%).

Although it has been shown that the use of antioxidants minimizes the cryoinjuries during cryopreservation of ovarian tissue, these supplements have not yet been used for vitrification of sheep ovarian tissue. Considering the lack of information in the literature, as well as the beneficial effects of both catalase and alpha lipoic acid on preantral follicles, we decided to investigate these antioxidants in this study. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of both antioxidants on vitrification solution of sheep ovarian tissue, on the following parameters: morphology and development follicular, levels of ROS and finally mitochondrial function.

Materials and methods

This experiment was approved and performed under the guidelines of Ethics Committee for Animal Use of the State University of Ceará (N°6004631/2015). The cryoprotectants (ethylene glycol and dimethyl sulfoxide) were obtained from Dinâmica

(Dinâmica Química, Diadema, SP, Brazil) and the other chemicals were purchased from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

Ovaries and experimental design

Ovaries (n=16) were collected from eight adult non pregnant sheep at a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed once in 70% ethanol for 10 s and then washed twice in HEPES-buffered minimum essential medium (MEM) supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Ovaries were then transported to the laboratory in MEM at 20 °C within 1 h after collection (Carvalho *et al.* 2014). At the laboratory, ovaries were stripped of the surrounding fat and fibrous tissue and the ovarian cortex from each ovarian pair was cut into small fragments (approximately 3 × 3 × 0.5 mm) using a tissue slicer (Thomas Scientific, USA) under sterile conditions.

This experiment was carried out in two steps. In the first one, 18 ovarian fragments from four ovarian pairs were used. Two fragments were immediately fixed in paraformaldehyde 4 % and considered as control or fresh tissue. Other two fragments were submitted to *incubation* (INC) during 24 hours and later fixed in the same way as the other. The remaining fragments (n = 14) were distributed into seven vitrification conditions: *vitrification without antioxidant agents* (WAA) or vitrification with different concentrations of *catalase* – CAT (10, 20 or 40 UI/mL) or *alpha lipoic acid* – ALA (25, 50 or 100 µM/mL). After vitrification, the fragments (2/vitrification condition) were warmed, incubated during 24 hours and fixed. Therefore, nine treatments (control, INC, WAA, CAT10, CAT20, CAT40, ALA25, ALA50 and ALA100) were compared into four repetitions. All fragments were destined for morphological analysis and evaluation of follicular development. The incubation medium collected was used for ROS analysis.

On the second step, 15 ovarian fragments from others four ovarian pairs were used.

Based on the best treatments (higher percentage of morphological normal, development preantral follicles and lower ROS levels) obtained on first step, only five treatments were repeated in this step. Therefore, three fresh fragments were immediately fixed (control) while three others were incubated (INC). The remaining fragments (n = 9) were distributed into three vitrification conditions (WAA, CAT40 and ALA100). All fragments from these five treatments were submitted to robust analyses such as ovarian stromal cell density, DNA damage, mitochondrial activity and intracellular ROS levels on ovarian tissue.

Vitrification/warming procedures

The vitrification was performed using the Ovarian Tissue Cryosystem (OTC), a closed system to vitrification solid surface technique described before by our team ([Carvalho *et al.* 2013](#)). Briefly, the fragments were exposed to two vitrification solutions (VS). The VS1 consisted of MEM supplemented with 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.25 M sucrose, 10 % ethylene glycol (EG) and 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO). The VS2 had a similar composition of VS1 but with higher concentration of cryoprotectants (20 % EG and 20 % DMSO). Both solutions (VS1 and VS2) were prepared without or with antioxidant agents (CAT or ALA) in different concentrations as mentioned above. However, the ovarian fragments were initially exposed to VS1 for 4 min followed by VS2 for 1 min. Both exposures were performed using the OTC. The vitrification solution was then removed and the OTC containing the ovarian tissue was closed and immediately immersed vertically into liquid nitrogen.

After cryostorage for up to 7 days, OTCs containing the vitrified ovarian tissue were warmed in air at room temperature (RT ~25°C) for 1 min, followed by immersion in a water bath (37 °C) for 30 s. After warming, the cryoprotectants were removed by a three-step

washing solutions (WS; 5 min each) in WS1: MEM + 3 mg/mL BSA + 0.5 M sucrose, WS2: MEM + 3 mg/mL BSA + 0.25 M sucrose and WS3: MEM + 3 mg/mL BSA. These three WS did not contain antioxidants.

Incubation conditions

Fresh or vitrified ovarian fragments were incubated in 1 mL of culture medium for 24 hours in a humidified incubator at 39 °C with 5 % CO₂. The culture medium consisted of α -MEM supplemented with ITS (10 μ g/mL Insulin, 5.5 μ g/mL Transferrin, 5 ng/mL Selenium), Glutamine (2 mM), Hypoxanthine (2 mM), BSA (1.25 mg/mL), LIF - Leukemia Inhibitory Factor (50 ng/mL), KL -Kit Ligand Kit (50 ng/mL) FSH - Follicle Stimulating Hormone (100 ng/mL), according to [Lunardi *et al.* \(2015\)](#).

Follicular morphology and development

Fresh or vitrified ovarian tissue were fixed in 4 % paraformaldehyde (PAF) for 2 hours at 37 °C, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, embedded in paraffin wax and cut into 7 μ m thick. The cuts were stained with Periodic Acid Schiff (PAS) - hematoxylin. For morphological evaluation, the blades were coded and examined under a microscope (Nikon, Japan) with a magnification of 400X, and the follicles were classified according to the integrity and development stage.

The follicle development stages were defined as: *primordial*, one layer of flattened pregranulosa cells surrounding the oocyte; *transitional*, one layer of flattened and cuboidal granulosa cells; *primary*, one layer of cuboidal granulosa cells and *secondary*, two or more layers of cuboidal granulosa cells ([Wright *et al.* 1999](#)).

Preantral follicles were morphologically classified as (i) *normal* if they contained an intact oocyte and intact granulosa cells and (ii) *degenerate* if they contained a pyknotic oocyte

nucleus, shrunken ooplasm, accompanied or not by disorganized granulosa cells (e.g. increase in volume with or without detachment from the basement membrane). The presence of at least one of the aforementioned features was indicative of atresia (Carvalho *et al.* 2014).

ROS levels in incubation medium

The reactive oxygen species levels were determined by a spectrofluorimetric method (Loetchutinat *et al.* 2005), using 2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, D6883, Sigma-Aldrich) assay. Sample aliquot (50 μ L of the incubation medium) was incubated with 5 μ L of DCFH-DA (1 mM) at room temperature. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of ROS. The 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 2 hrs after the addition of DCFH-DA to the medium, using spectrofluorometer (Shimadzu model RF-5301PC, Tokyo, Japan).

Ovarian stromal cell density

Ovarian stroma cell density was evaluated by calculating the number of stromal cells in an area of $100 \times 100 \mu\text{m}$. For each treatment, 10 fields per animal were assessed, resulting a total of 40 fields per treatment, and the mean number of stromal cells per field was calculated (Carvalho *et al.* 2014). All evaluations and measurements were performed by a single operator.

Gamma H2AX staining for detection of damage of DNA

For this analysis, we used a mouse monoclonal primary antibody for the detection of H2AXph139 (1:200 ab26350, Inc. Abcam, Cambridge, MA, EUA) protein, which is involved in DNA-damage. The secondary antibody was Alexa 488 Fluor® anti-rabbit IgG (ab150113,

Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) diluted 1:500 for detection of H2AXph139. The negative control was obtained by omitting the primary antibodies. The ovarian tissues derived from control, as well as from INC and vitrified fragments (WAA, CAT40 and ALA100) were prepared as described for the TUNEL technique. Following antigen retrieval, slides were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (H2AXph139). Then, slides were incubated with the secondary antibody Alexa Fluor® 488 for 1 h at RT and stained with Evans blue (1: 10.000). The slides were mounted with Vectashield Mounting Medium® (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Immunostaining was evaluated using a confocal laser scanning microscope (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Germany). All analyzes were performed using the same configurations ([Guerreiro et al. 2016](#)).

DNA fragmentation assay for the detection of apoptotic cells (TUNEL staining)

The DNA fragmentation was analyzed by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphates nick end-labeling) assay, using the In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche Applied Science, Mannheim, BW, Germany), according to the manufacturer's instructions. Samples from control, as well as from INC and vitrified fragments (WAA, CAT40 and ALA100) were fixed in 4 % paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) and subsequently dehydrated and embedded in paraffin wax. Tissue sections (5 mm) mounted on Superfrost Plus slides (Knittel Glass, Bielefeld, NW, Germany) were deparaffinized with Citrisolve (Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada) and rehydrated in a graded ethanol series. Antigen retrieval was performed by incubating the tissue sections in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) for 5 min, in a pressure cooker. To block endogenous peroxidase the slides were incubated with 3 % H₂O₂ in methanol and then blocked for 1 h at room temperature (RT) using PBS containing 1 % BSA. After washing, the slides were incubated with the TUNEL reaction mixture (50 µL) for 1 h at 37°C. Converter

POD was added and the location of the protein expression was demonstrated by incubation with DAB (0.05% DAB in Tris/HCl, pH 7.6, 0.03% H₂O₂). Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. The follicles were considered with fragmented DNA when the oocytes were detected having dark brown stained nuclei (Yucebilgin *et al.* 2004). As an internal positive control, the sections were treated with 10 U/mL DNase I (Invitrogen™, Carlsbad, CA) in 1 mg/mL BSA, for 10 min at RT, before incubation with the TUNEL reaction mixture to induce the nonspecific breaks in the DNA. The negative control sections omitted the terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme (Tarumi *et al.* 2009).

Mitochondrial activity and intracellular ROS levels

This analysis was performed according to Fabbri *et al.* (2014), with some modifications. Briefly, the quantification of MitoTracker Orange CMTMRos and DCF fluorescence intensities, indicating apparent energy status (mitochondrial activity) and intracellular ROS levels, respectively was evaluated. The ovarian tissue samples from control, as well as from INC and vitrified fragments (WAA, CAT40 and ALA100) were incubated for 30 minutes in 998 µL of PBS with 2 µL of MitoTracker Orange CMTMRos (M7510; Molecular Probes) at 39 °C under 5 % CO₂ to detect and localize actively respiring mitochondria. After incubation with the mitochondria specific probe, ovarian samples were incubated for 15 minutes in 999 µL of PBS with 1 µL of DCF to detect and localize intracellular sources of ROS. The sample were fixed in 4 % paraformaldehyde for 12 hours at 4 °C, dehydrated in sucrose for 72 h intercalated, inserted in tissue tek and subsequently stored at -80 °C. After that, the slides were fixed in 3 % formaldehyde for 15 minutes, washed in PBS for 5 minutes, and mounted with Fluoroshield Mounting Medium with Propidium Iodide (ABCAM-ab104129) and evaluated using a confocal laser scanning microscope (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Germany).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., USA). Data that were not normally distributed (Shapiro-Wilk test) were transformed to natural logarithms. Comparison of means was performed between treatments by Kruskal-Wallis test. The proportion of morphologically normal follicles and follicle class distribution (primordial and developing) among treatments were analyzed by chi-square or Fisher's exact test. Pearson correlation coefficient was performed to evaluate the association between MitoTracker and DCFH-DA fluorescence intensity. In addition, the odds ratio and 95% confidence interval (CI) were calculated to determine the effect of treatments performed on presence of normal follicles. Data were presented as mean (\pm standard error of mean) and percentage, unless otherwise indicated. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ (two-sided).

Results

Follicular morphology

In the experiment, a total of 888 preantral follicles were analyzed. Morphologically normal or degenerated follicles were observed in the fresh (control), incubated (INC) or vitrified ovarian tissue without (WAA) or with antioxidants (CAT or ALA), as shown in figure 1.

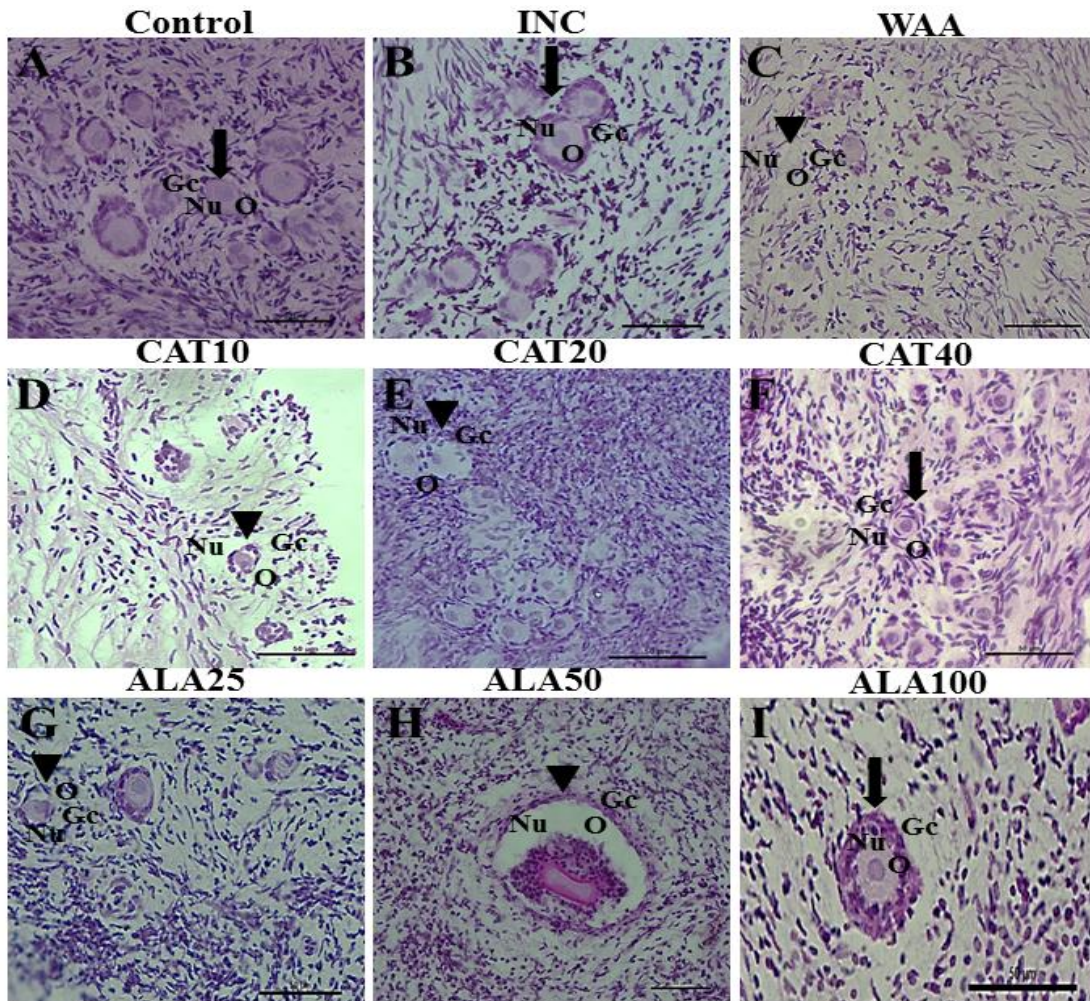


Figure 1: Representative images of the morphology of ovine preantral follicles after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin. Normal follicles are shown in control (A), INC (B), CAT40 (F) and ALA100 (I), while degenerate follicles are represented in SAA (C), CAT10 (D), CAT20 (E), ALA25 (G) And ALA50 (H). O: oocyte; Nude: oocyte nucleus; Cg: granulosa cells (400x). Arrows indicate normal follicles; Arrowhead indicates degenerate follicles. Scale bars = 50 μ m.

The percentage of morphologically normal follicles in vitrified ovarian tissue in the presence of ALA at all concentrations tested (25, 50, 100 μ M/mL) did not differ ($P > 0.05$) from the control, neither the tissue incubated (INC) for 24 h. On the other hand, this percentage in vitrified tissue without antioxidant (WAA), as well as in the presence of catalase

in all concentrations (10, 20, 40 UI/mL) was lower ($P < 0.05$) than the control or INC treatment (Figure 2A).

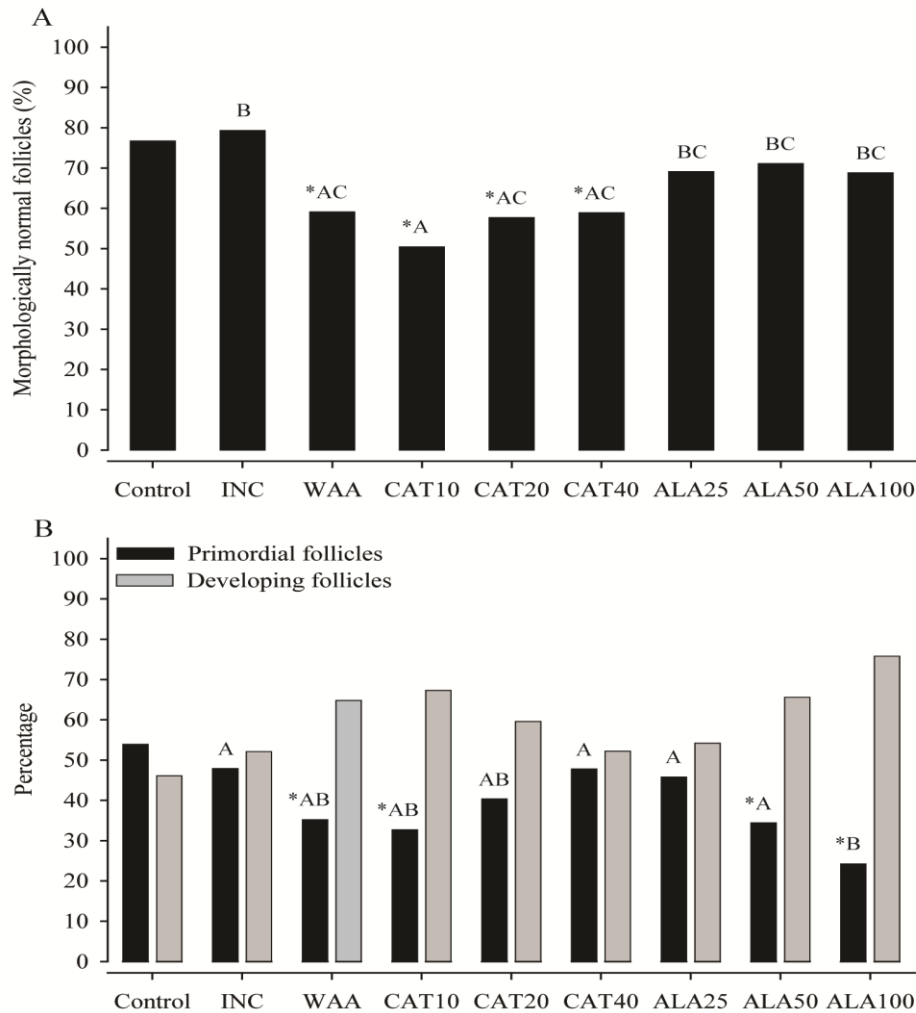


Figure 2. Percentage of morphology normal (A) and development follicular (B) in fresh (control), incubated (INC) or vitrified ovarian tissue without (WAA) or with antioxidants (CAT or ALA). *Differ from control. ^{A,B,C} Differ among treatments ($P < 0.05$).

Association analyses between treatments

The association between the percentage of normal preantral follicles in fresh and incubated ovarian tissue and the antioxidants groups adopted was further analyzed by odds ratio (Table 1). Observed that CAT (all combined data from three concentrations) and WAA treatments, had a similar odds ratio ($P > 0.05$) to the percentage of normal preantral follicles

after vitrification. In contrast, the likelihood of having morphologically normal preantral follicles in ALA (all combined data from three concentrations) was 1.6 and 1.8 times higher compared with the WAA ($P < 0.05$) and CAT ($P < 0.01$) groups, respectively. Moreover, the INC had superior ($P < 0.01$) odds ratio to normal preantral follicles than WAA (2.6 times) and CAT (3.1 times) groups. Finally, ALA and INC showed a similar ($P > 0.05$) probability to have normal preantral follicles.

Table 1. Association analysis between incubated (INC) or vitrified ovarian tissue without (WAA) or with antioxidants (CAT or ALA).

Comparisons	Normal preantral follicles (%)	Odds ratio	CI 95%	P value
WAA	59.1 (71/120)			
†CAT	55.2 (153/277)	1.1	0.7 – 1.8	0.53
WAA	59.1 (71/120)			
‡ALA	69.6 (209/300)	1.6	1.0 – 2.4	0.05
CAT	55.2 (153/277)			
ALA	69.6 (209/300)	1.8	1.3 – 2.6	0.01
INC	79.3 (73/92)			
WAA	59.1 (71/120)	2.6	1.4 – 4.9	0.01
INC	79.3 (73/92)			
CAT	55.2 (153/277)	3.1	1.7 – 5.4	0.01
INC	79.3 (73/92)			
ALA	69.6 (209/300)	1.6	0.9 – 2.9	0.09

CI: 95% intervalo de confiança.

† Dados dos tratamentos com catalase (CAT 10, CAT 20, and CAT 40 IU/mL) combinados.

‡ Dados dos tratamentos com ALA (ALA 25, ALA 50, and ALA 100 μ M/mL) combinados.

Follicular development

The percentage of primordial and developing follicles are shown in Figure 2B. The

vitrified ovarian tissue in WAA or in CAT10, ALA50 and ALA100, showed a higher ($P < 0.05$) activation and follicular development (represented by high percentage of developing follicles) in comparison with control. Moreover, It was observed that, the percentage of developing follicles was higher in the ALA100 treatment than in the INC as well as in the CAT40, ALA25 and ALA50 treatments ($P < 0.05$).

ROS levels in incubation medium

The data showed that INC and ALA100 were the only two situations in which ROS levels did not differ from each other ($P > 0.05$) and were significantly lower than the CAT10 and CAT20 at the same time (Figure 3).

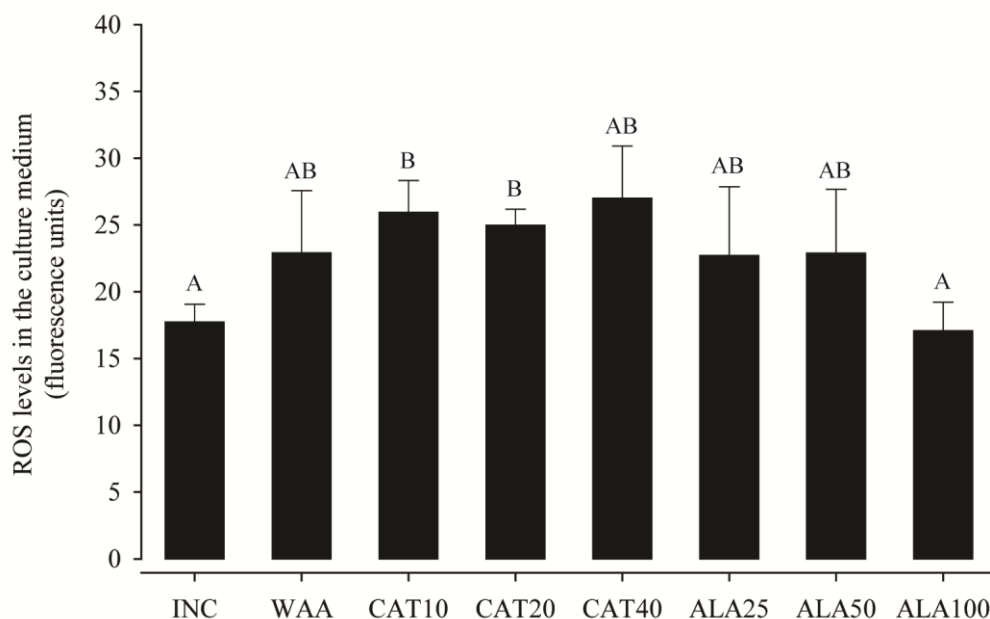


Figure 3. Mean (\pm standard error of the mean) reactive oxygen species (relative fluorescence units) produced by ovine ovarian tissue fragments after vitrification and incubation for 24 hours. ^{A,B} Uppercase letters indicate difference among treatments ($P < 0.05$).

Ovarian stromal cell density

Images of stromal cells of control groups, INC, WAA, CAT40 and ALA100 are shown in Figure 5. The analysis showed that, compared to control, cell density significantly reduced

in all treatments except in the WAA. In addition, among the vitrified treatments, the density significantly reduced in CAT40 in relation to treatments WAA and ALA100.

Gamma H2AX foci detection in preantral follicles

Immunofluorescence analysis was performed in order to localize a protein involved in signaling (γ H2AX) of DNA damage (Table 2) in preantral follicles included on ovarian tissue (Figure 4). The percentage of follicles positive immunostaining for γ H2AX in CAT40 was higher than control and INC treatments. Similar result was found between vitrified tissue without antioxidant (WAA) and incubated tissue (INC) as well. It should be noted that, among cryopreserved tissues, only ALA100 was able to maintain similar damage signaling ($P > 0.05$) to those found in the tissue only incubated (INC).

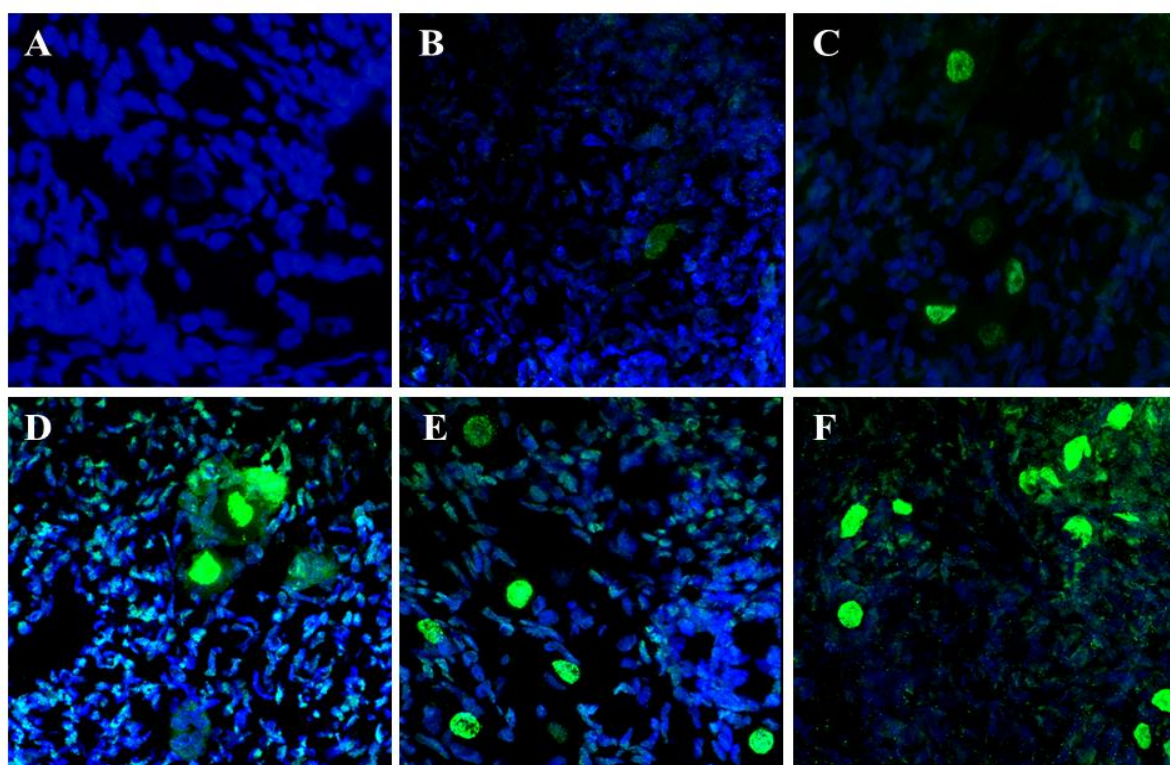


Figure 4. Representative images of the immunodetection of the H2AXph139 protein (fluorescent green colors) in preantral follicles included in ovarian sheep tissue. (A) Negative control of the technique, (B) Control, (C) INC, (D) SAA, (E) CAT40, (F) CAT100. Scale bar

50 μ m.

Assessment of DNA fragmentation by TUNEL staining

The TUNEL test revealed the presence of apoptotic cells in preantral follicles (Figure 5). The percentage of sheep preantral follicles positive for the TUNEL showed that the fragments from INC treatment presented a percentage of TUNEL-positive cells significantly higher than the control, as well as to other treatments (table 2).

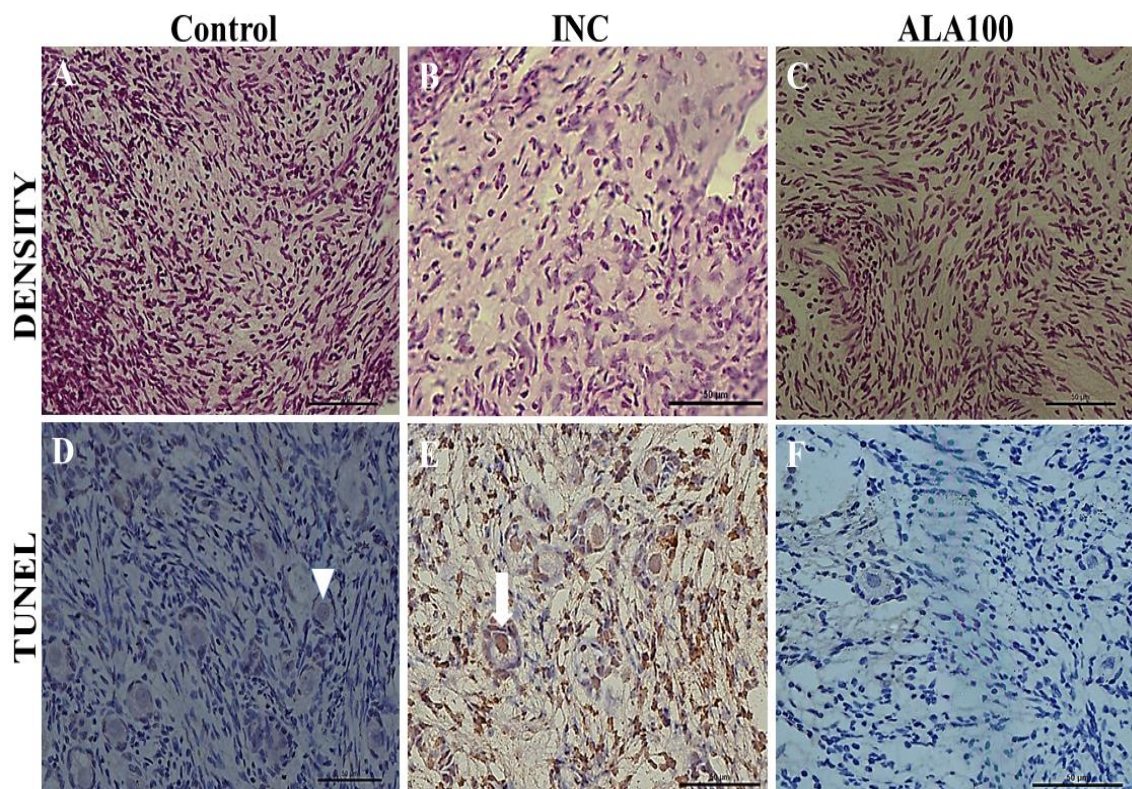


Figure 5. Representative images of ovarian stromal cell density (A,B and C) and images of the cell death analysis by apoptosis in preantral follicles included in ovarian ovine tissue, using the TUNEL technique (D, E and F) in Control, INC and ALA100 groups. Arrows indicate TUNEL-positive reaction; Arrowhead indicates TUNEL-negative reaction. Scale bars = 50 μ m.

Table 2. Percentage of preantral follicles with γ H2AX foci and TUNEL signal positive (mean \pm SEM) and stromal cell density in fresh (control) incubated (INC) or vitrified tissue without

(WAA) or with antioxidants (CAT or ALA).

Treatments	Stromal cells density	Preantral follicles with γ H2AX foci (%)	TUNEL positive preantral follicles (%)
Control	170.6 \pm 4.8 ^A	62.5 (10/16) ^{AB}	2.8 (2/71) ^A
INC	145.3 \pm 5.6 ^B	45.2 (33/73) ^A	42.1 (24/57) ^B
WAA	162.2 \pm 6.8 ^{AB}	82.1 (23/28) ^{BC}	5.4 (4/73) ^A
CAT40	126.0 \pm 5.0 ^C	92.3 (24/26) ^C	5.4 (2/37) ^A
ALA100	145.7 \pm 5.4 ^B	80.0 (4/5) ^{AC}	0.0 (0/19) ^A

^{A,B,C} Uppercase letters indicate difference among treatments ($P < 0.05$).

Mitochondrial activity and intracellular ROS levels

The mitochondrial activity and intracellular ROS levels were analyzed by fluorescence intensity probes Mitotracker Orange and DCFH-DA respectively (figure 6). Regarding the mitochondrial activity (Figure 7A), only INC treatment was significantly higher ($P < 0.05$) than control. In addition, CAT40, ALA100 e WAA treatments were similar to control and INC. In relation to the levels of intracellular ROS (Figure 7B), we observed that the fluorescence intensity was significantly higher ($P < 0.05$) in INC, CAT40 and ALA100 compared to the control. Furthermore, INC was significantly higher ($P < 0.05$) than WAA and similar to CAT40 and ALA100.

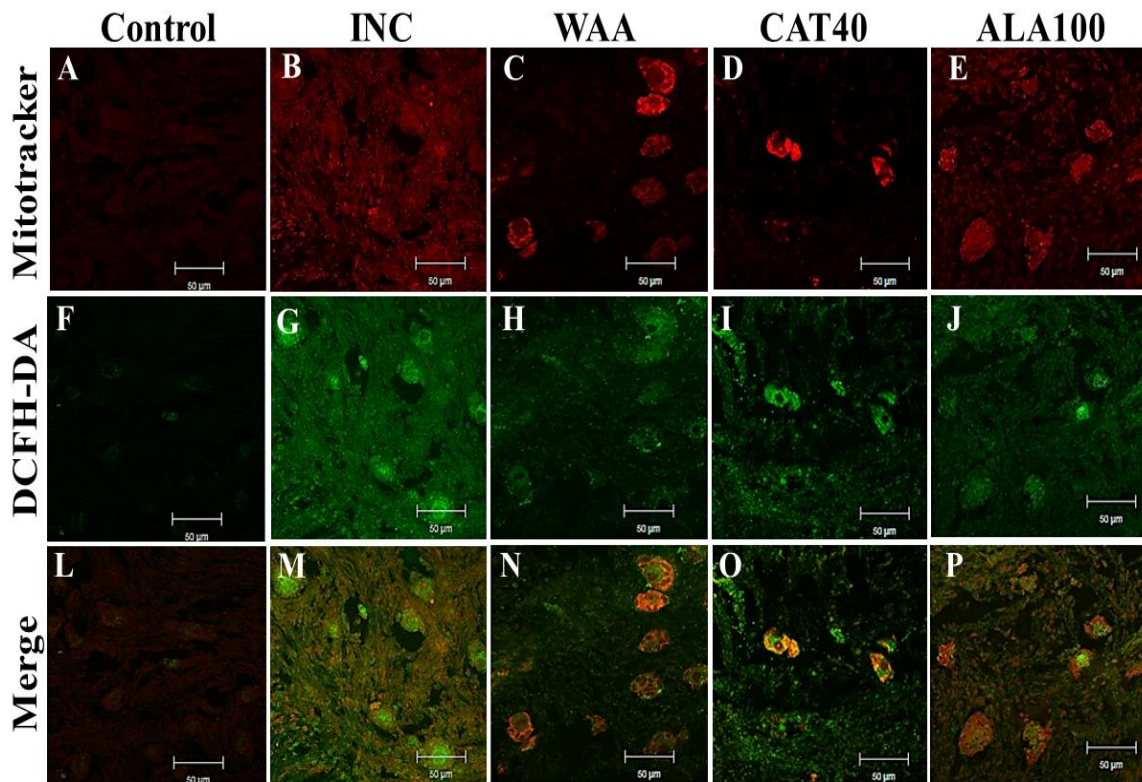


Figure 6. Representative images of mitochondrial activity represented by the fluorescence intensity of Mitotracker (A-E), intracellular ROS levels represented by fluorescence intensity of DCFH-DA (F-J) and overlapping of two probes (L-P) in the different treatments (Control, INC, WAA, CAT40 And ALA100). Scale bars = 50 μm.

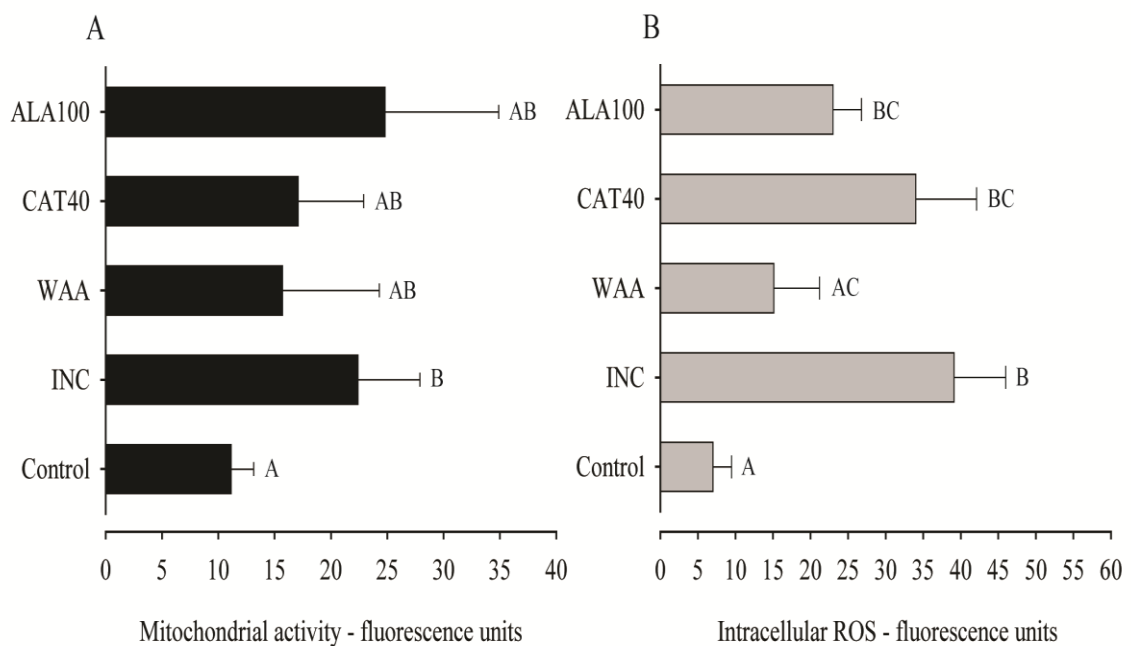


Figure 7. Quantification of active mitochondrial-specific fluorescence intensity of the Mitotracker stain (A) and intracellular ROS levels fluorescence intensity of the DCFH-DA (B) in control, INC and vitrified ovarian tissue WAA and CAT or ALA. Values are expressed as fluorescence units (Mean \pm SE); Different letters indicate a statistical difference ($P < 0.05$).

As shown in figure 9, increase of mitochondrial activity (Mitotracker) results in the increase in the percentage of ROS levels (DCFH-DA), simultaneously.

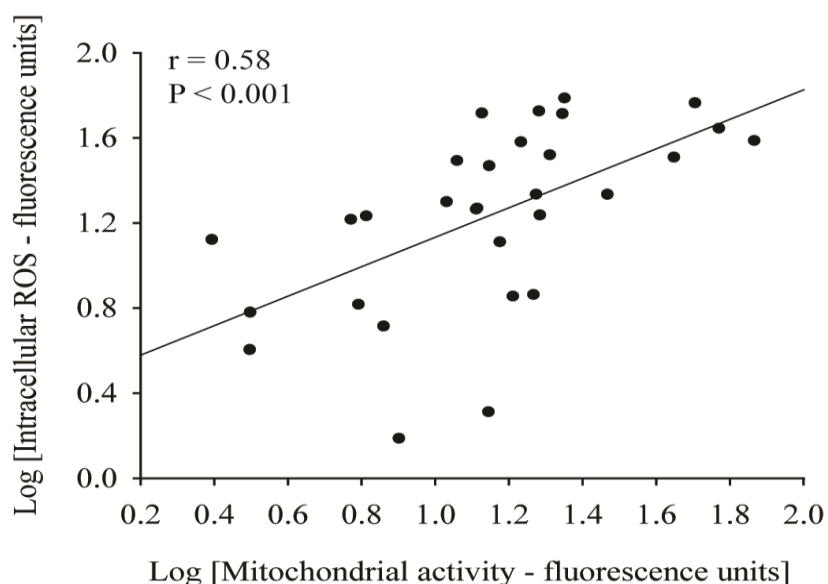


Figure 8. Correlation between the mitochondrial activity and intracellular levels ROS. Each point of the graph represent a sample of ovarian tissue ($n=30$), $r = 0,58$; $P = 0.001$.

Discussion

Many reports have shown that transplantation of ovarian tissue cryopreserved by slow freezing (Donnez *et al.* 2004, 2011; 2012, Callejo *et al.* 2013, Campbell *et al.* 2014) or vitrification (Bordes *et al.* 2005, Kawamura *et al.* 2013, Suzuki *et al.* 2015) provides great benefits to regenerative medicine, including the restoration of reproductive function. However, both cryopreservation methods cause a significant increase of oxidative stress which can lead

to degeneration of oocytes and follicles present in the ovary. Therefore, current efforts in the improvement of ovarian tissue cryopreservation, in part, concentrate on establishment of an optimal protocol. It may be possible by supplementation of antioxidants into vitrification solution. Therefore, in this study, we investigated the effects of addition of catalase and alpha lipoic acid in the solution of vitrification of sheep ovarian tissue on the follicular morphology and development, stromal cells density, levels of ROS, DNA damage, as well as mitochondrial function of preantral follicles.

This study showed that, unlike vitrified follicles in ALA (25, 50, 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$), those vitrified without antioxidant (WAA) or with CAT (10, 20, 40 UI/mL), presented a percentage of morphological normal follicles lower than control or alone incubated (INC) tissue. These data show the relevance of antioxidants, as well as the type and the concentration of these supplements in the vitrification solution. This is the first study showing the beneficial effect of ALA in the vitrification solution of sheep ovarian tissue. However, previous studies in mice have shown that this antioxidant maintained the normal follicular morphology, when added to the *in vitro* culture medium of fresh (Talebi *et al.* 2012) or vitrified ovarian tissue (Hatami *et al.* 2014a). With regard to catalase, according to studies carried out by our team, the addition of 20 IU/mL in slow freezing solution reduced lipid peroxidation (Luz *et al.* 2012) and in the solution of vitrification has been able to control the production of ROS (Carvalho *et al.* 2014) in goat ovarian tissue.

Regarding to percentage of development follicles, it was observed that, although the treatments WAA, CAT10 and CAT20 have been similar to ALA100, this was the only treatment that presented a percentage of developing follicles higher than INC treatment. It is known that during the cryopreservation procedures the endogenous protection system fails (Fabbri *et al.* 2014), therefore, we suggest that the use of exogenous antioxidants investigated during vitrification procedure, especially ALA at 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ could constitute a helpful

strategy to protect the function of endogenous cellular systems in the ovary. Comparing different concentrations (50, 100, 250 or 500 $\mu\text{M}/\text{mL}$) of ALA in the *in vitro* culture of fresh preantral follicles, present in the mice ovarian tissue, [Talebi et al. \(2012\)](#) showed that the concentration of 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ was better than the other regards to the follicular development. Based on these findings, we believe that concentration of ALA below than 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ was not able to eliminate the sufficient amount of free radicals, so that those who remain, represent danger to the cell, causing consequently injury to the cellular function.

In the present study, it was observed that the ROS levels in incubation medium in INC and ALA100 treatments were similar to each other and lower than that found for CAT10 and CAT20 at the same time. This result could be explained by the fact that the ALA synthesizes glutathione and increases the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase ([Akpınar et al. 2008](#)), being so more effective than catalase. Previous studies carried out in mice also showed that ALA decreased the ROS level, increased the total antioxidant capacity and improved survival rate and developmental competence of vitrified-warmed or fresh isolated preantral follicles after long-term *in vitro* culture, compared to follicles cultured without this antioxidant ([Hatami et al. 2014b](#)). All these data show the positive effect of ALA on preantral follicles. As we can see in the present study, ALA at 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ was superior to catalase regarding the parameters of morphology (CAT10), follicular development and density of stromal cells (CAT40), as well as levels of ROS (CAT10 and CAT20). According to [Hatami et al. \(2014b\)](#) the ovarian tissue suffers some morpho/functional deficits in consequence of hypoxia or production of free radical during freezing/thawing procedures. Therefore, according to the type and concentration of antioxidant used in the solution of vitrification, the follicular cryoinjuries can be attenuated.

Regarding the stromal cells density, it was observed that only in CAT40, the number of cells was significantly lower than all other treatments. A recent study realized by our team in

goat showed that vitrification in the presence of 20 IU/mL of catalase not reduced the cell density (Carvalho *et al.* 2013). This could be due to the lowest concentration used. On the other hand, studies in humans (Gook *et al.*, 1999, Hreinsson *et al.* 2003, Eyden *et al.* 2004), as well as in goat and sheep (Faustino *et al.* 2010), cryopreservation without antioxidants also reduced the stromal cells density. This suggests that it is essential to define the type and concentration of antioxidant in vitrification solution for a good preservation not only of the follicles, as well as stromal cells because these cells are very important in the production of peptides and growth factors that are essential for cell growth and development (Picton *et al.* 2008). Besides, stromal cells together to cellular extra matrix components are important for the maintenance of cellular interactions thereby providing the necessary signaling for the formation, development and migration of the follicles within the ovary (West & Shea 2007).

The damage to the DNA of the follicles present in ovarian tissue detected through γ H2AX staining revealed that the signaling was similar between CAT40 and WAA. In addition, CAT40 and WAA showed more damage than the control and INC, respectively. On the other hand, only INC treatment was positive to TUNEL-test. We believe that in the case of two treatments (WAA and CAT40), the damage was still at the beginning. However, it is possible that in both treatments, the cellular machinery has been able to repair the damage that has occurred and did not show a high percentage of TUNEL-positive. γ H2AX plays an important role in recruiting and maintaining DNA repair molecules at sites of damage until repair is complete (Svetlova *et al.* 2010). Approximately 1% of these DNA breaks is converted into double-strand breaks (DSBs), mainly during DNA replication, while the 99 % remaining is repaired (Podhorecka *et al.* 2010). This may explain the low proportion of follicles marked for the TUNEL in the control, as well as in the other treatments (WAA, CAT40, and ALA100). On the other hand, in INC treatment, at the time of analysis, the damage could already be in an advanced stage. This could explain the low percentage of

labeled to γ H2AX concomitantly to high percentage of follicles TUNEL positive. Additionally, phosphorylation of histone H2AX in serine139 is an early event in the process of damage (Rogakou *et al.* 1998), while the TUNEL-positive represents a late event in the process of apoptosis (Loro *et al.* 1999, Gown & Willingham, 2012).

Due to the key role of mitochondria in the production of adenosine triphosphate (ATP), as well as in follicular development, cytoplasmic maturation and oocyte competence (Nagai *et al.* 2006), we analyzed the mitochondrial activity of preantral follicles present in the ovarian tissue. The mitochondrial activity of the tissue only incubated (INC) was significantly higher than the control. This probably indicate hyperactivity of cells which could leads to oxidative stress. These results are similar to that found by Fabbri *et al.* (2014). Interestingly the treatments submitted to vitrification (WAA, CAT40 e ALA100), were similar to control and INC groups, since the process of cryopreservation could compromise the mitochondrial activity due to thermal shock (Sohn *et al.* 2002), physical and chemical conditions, to which the material is exposed (Fabbri *et al.*, 2014), osmotic forces generated during vitrification and warming processes. This could be a strategy of the tissue to try to overcome the injuries suffered during the process of cryopreservation. As mitochondria are sources of ROS (Takahashi *et al.* 2013) and essential to many physiological processes (Bergamini *et al.* 2004), the incapacity of antioxidant defense of cells can increase the production of ROS and cause oxidative stress (Velez-Pardo *et al.* 2007, Akpinar *et al.* 2012). This may explain the increased production of ROS observed in this study after vitrification/warming. Similar results were observed after cryopreservation of oocytes of various species (cow: Zhang *et al.* 2011; porcine: Somfai *et al.* 2014, Gupta *et al.* 2010 and mice: Tatone *et al.* 2010), mice embryos (Martino *et al.* 2013), and in human ovarian tissue (Fabbri *et al.* 2014). In the present study, there was a positive correlation between mitochondrial activity and intracellular levels of ROS. In frozen human ovarian tissue, Fabbri *et al.* (2014) also found that the increase in mitochondrial

activity and levels of ROS increased oxidative stress conditions. This fact confirms that damage to the mitochondria can cause an imbalance between production and removal of ROS, as well as the excess of ROS can lead to mitochondrial dysfunction (Zhao *et al.* 2015). In conclusion, vitrification of sheep ovarian tissue in the presence of 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ of alpha lipoic acid preserved the follicular morphology, promoted the development, reduced levels of ROS in the culture medium and caused less damage to the DNA of the follicles. However, despite 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ of alpha lipoic acid maintained the mitochondrial activity it was not enough to control the production of intracellular ROS, so we suggest to conduct further studies to define the ideal concentration of this antioxidant in order to promote beneficial effect on all the parameters evaluated.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This study was supported by CNPq and CAPES, Brazil.

Acknowledgements

References

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar Bj, Shaman A & Gupta S 2012 The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* **10** 49. (doi:10.1186/1477-7827-10-49)

Akpinar D, Yargicoglu P, Derin N, Aliciguzel Y & Agar A 2008 The effect of lipoic acid on antioxidant status and lipid peroxidation in rats exposed to chronic restraint

stress. *Physiological Research* **57** 893–901.

Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A & Cervellati C 2004 Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Design* **10** 1611–1626. (doi:10.2174/1381612043384664)

Bordes A, Lornage J, Demirci B, Franck M, Courbiere B, Guerin Jf & Salle B 2005 Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Human Reproduction* **10** 2745-2748. (doi:10.1093/humrep/dei155)

Brito DC, Brito AB, Scalercio SR, Percário S, Miranda MS, Rocha RM, Diniz JA, Oskam IC, Van den Hurk R, Paris MC, Domingues SF, Santos RR 2014 Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen-thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). *Cell Tissue Research* **355(2)** 471-480. (doi: 10.1007/s00441-013-1764-x)

Callejo J, Salvador C, González-Nuñez S, Almeida L, Rodriguez L, Marqués L, Valls A & Laila JM 2013 Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *Journal of Ovarian Research* **7** 33. (doi:10.1186/1757-2215-6-33)

Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V, Pincott-Allen C, Aljaser F, Fisher J, Mcneilly A.S, Webb R & Picton HM 2014 Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Human Reproduction* **29** 1749 –1763. (doi:10.1093/humrep/deu144)

Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV & Lopes CAP 2013 Novel wide-

capacity method for vitrification of caprine ovaries: Ovarian Tissue Cryosystem (OTC). *Animal Reproduction Science* **138** 220-227. (doi:10.1016/j.anireprosci.2013.02.015)

Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Lobo CH, Santos FW, Santos RR, Campello CC, Bordignon V, Figueiredo JR & Rodrigues APR 2014 Catalase addition to vitrification solutions maintains goat ovarian preantral follicles stability. *Research in Veterinary Science* **97** 140–147. (doi:10.1016/j.rvsc.2014.05.006)

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B & Van Langendonck A 2004 Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* **364** 1405-1410. (doi:10.1016/S0140-6736(04)17222-X)

Donnez J, Squifflet J, Jadoul P, Demylle D, Cheron AC, Van Langendonck A & Dolmans MM 2011 Pregnancy and live birth after autotransplantation of frozen-thawed ovarian tissue in a patient with metastatic disease undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Fertility and Sterility* **95** 1787.e1–1787.e4. (doi:10.1016/j.fertnstert.2010.11.041)

Donnez J, Jadoul P, Pirard C, Hutchings G, Demylle D, Squifflet J, Smitz J & Dolmans MM 2012 Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease. *Fertility and Sterility* **98** 720–725. (doi:10.1016/j.fertnstert.2012.05.017)

Duffy C & Allen S 2009 Medical and psychosocial aspects of fertility after cancer. *Cancer Journal* **15** 27–33. (doi:10.1097/PPO.0b013e3181976602)

Eyden BJ, Radford SM, Shalet N, Thomas DR, Brison BA, Lieberman 2004 Preservation of ovarian cortical tissue cryopreserved in dimethylsulfoxide for subsequent transplantation into young female cancer patients. *Ultrastructure Pathology* **28(4)** 239-245.

Fabbri R 2006 Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. *Cell and Tissue Banking* **7** 113–122. (doi:10.1007/s10561-005-1969-7)

Fabbri R, Vicenti R, Martino NA, Dell'Aquila ME, Pasquinelli G, Macciocca M, Magnani V, Paradisi R & Venturoli S 2014 Confocal laser scanning microscopy analysis of bioenergetic potential and oxidative stress in fresh and frozen-thawed human ovarian tissue from oncologic patients. *Fertility and Sterility* **101** 795-804. (doi:10.1016/j.fertnstert.2013.11.032)

Fautino, LR, Santos, RR, Silva, CMG, Pinto, LC, Celestino, JJH, Campello, CC, et al., 2010 Goat and sheep ovarian tissue cryopreservation: effects on the morphology and development of primordial follicles and density of stromal cell. *Animal Reproduction Science* **122** 90–97. (doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.001)

Gook DA, Edgar DH & Stern C 1999 Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Human Reproduction* **14** 2061–2068. (doi:10.1093/humrep/14.8.2061)

Gosden RG, Baird DT, Wade JC & Webb R 1994 Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 degrees C. *Human Reproduction*

9 597–603.

Gown AM & Willingham MC 2002 Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **50** 449-54. (doi:<https://doi.org/10.1177/002215540205000401>)

Guerreiro DD, Lima LF, Rodrigues GQ, Carvalho AdeA, Castro SV, Campello CC, Pessoa C do Ó, Gadelha CR, Figueiredo JR, Bordignon V & Rodrigues AP 2016 In situ cultured preantral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. *Microscopy Research and Technique* **79** 773-81 (doi:[10.1002/jemt.22697](https://doi.org/10.1002/jemt.22697))

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. 2010 Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **93** 2602–2607. (doi:[10.1016/j.fertnstert.2010.01.043](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.043))

Hashimoto S, Suzuki N, Yamanaka M, Hosoi Y, Ishizuka B & Morimoto Y 2010 Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. *Reproductive BioMedicine Online* **21** 501–509. (doi:[10.1016/j.rbmo.2010.04.029](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.04.029))

Hatami S, Zavareh S, Salehnia M, Lashkarbolouki T, Ghorbanian MT & Karimi I 2014a The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified preantral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **12** 57-64.

Hatami S, Zavareh S, Salehnia M, Lashkarbolouki T, Ghorbanian MT & Karimi I

2014b Total Oxidative status of Mouse Vitrified Pre-Antral Follicles with Pre-Treatment of Alpha Lipoic Acid. *Iranian Biomedical Journal* **18** 181-188. (doi:10.6091/ibj.1258.2014)

Hreinsson J, Zhang P, Swahn ML, Hultenby K, Hovatta O. 2003 Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions. *Human Reproduction* **18** 2420–2428.

Jeong K, Aslan E, Ozkaya E, Sonmezer M & Oktay K 2012 Ovarian cryopreservation. *Minerva Medica* **103** 37–46.

Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, Ho CH, Kawamura N, Tamura M, Hashimoto S, Sugishita Y, Morimoto Y, Hosoi Y, Yoshioka N, Ishizuka B & Hsueh AJ 2013 Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110** 17474-9. (doi:10.1073/pnas.1312830110)

Kim BY, Yoon SY, Cha SK, Kwak KH, Fissore RA, Parys JB, YoonTK, Lee DR. 2011. Alterations in calcium oscillatory activity in vitrified mouse eggs impact on egg quality and subsequent embryonic development. *Pflugers Arch* **461** 515-526. (doi: 10.1007/s00424-011-0955-0)

Lambertini M, Ginsburg ES & Partridge AH 2015 Update on fertility preservation in young women undergoing breast cancer and ovarian cancer therapy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **27** 98-107. (doi:10.1097/GCO.0000000000000138)

Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin JP & Makhetkorn S 2005 Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry* **72** 323-331. (doi:10.1016/j.radphyschem.2004.06.011)

Lornage J, Courbiere B, Mazoyer C, Odagescu V, Baudot A, Bordes A, Poirel MT, Franck M & Salle B 2006 [Ovarian tissue vitrification: Cortex and whole ovary in sheep]. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **34** 746–753. (doi:10.1016/j.gyobfe.2006.07.024)

Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R & Johannessen AC 1999 Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl2/bax expression. Ratio and increased apoptosis. *Human Pathology* **30** 1097-1105. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90229-0)

Lunardi FO, Chaves RN, De Lima LF, Araújo VR, Brito IR, Souza CE, Donato MA5, Peixoto CA, Dinnyes A, Campello CC, De Figueiredo JR & Rodrigues AP 2015 Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell and Tissue Research* **362** 241-51. (doi:10.1007/s00441-015-2181-0)

Luz HK, Santos RR, Wanderley LS, Faustino LR, Silva CM, Carvalho AA, Campello CC, Santos FW, Figueiredo JR & Rodrigues AP 2012 Catalase Prevents Lipid Peroxidation

and Enhances Survival of Caprine Preantral Follicles Cryopreserved in a 1,2-Propanediol-Freezing Medium. *Biopreservation and Biobanking* **10** 338-42. (doi:10.1089/bio.2011.0046)

Martino NA, Dell'Aquila ME, Cardone RA, Somoskoi B, Lacalandra GM, Cseh S 2013 Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1311:1327. (doi: 10.1186/1477-7827-11-27)

Nagai, S, Mabuchi, T, Hirata S. et al., 2006 “Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence,” *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **210** 2 137–144.

Picton HM, Harris SE, Muruvi W & Chambers EL 2008 The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* **136** 703–715. (doi:10.1530/REP-08-0290)

Podhorecka M, Skladanowski A & Bozko P 2010 H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids* **2010** 920161. (doi: 10.4061/2010/920161)

Posillico S, Kader, A, Falcone, T, Agarwal, A. 2010 Ovarian Tissue Vitrification: Modalities, Challenges and Potentials. *Current Women's Health Reviews* **6** 4 352-366.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS & Bonner WM 1998 DNA doublestranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **10** 5858–5868. (doi:10.1074/jbc.273.10.5858)

Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF & Lornage J 2002 Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility* **77** 403-408. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02960-0)

Salle B, Demirci B, Franck M, Berthollet C & Lornage J 2003 Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility* **80** 172-177. (doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(03)00554-5)

Santos RR, Van Den Hurk R, Rodrigues AP, Costa SH, Martins FS, Matos MH, Celestino JJ & Figueiredo JR 2007 Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. *Animal Reproduction Science* **99** 53–64. (doi:10.1016/j.anireprosci.2006.05.013)

Sohn, IP, Ahn, JA, Park, DW, Gye MC, Jo, DH, Kim, SY, Min, CK and Kwon, HC. 2002 Amelioration of Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis of Two-Cell Mouse Embryos after Freezing and Thawing by the High Frequency Liquid Nitrogen Infusion. *Molecules and Cells* **13** 2 272-280.

Somfai T, Yoshioka K, Tanihara F, Kaneko H, Noguchi J, Kashiwazaki N, et al. 2014 Generation of Live Piglets from Cryopreserved Oocytes for the First Time Using a Defined System for *In Vitro* Embryo Production. *PLoS ONE* **9** 5 e97731

(doi.org/10.1371/journal.pone.0097731)

Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, Morimoto Y & Kawamura K 2015 Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction* **30** 608-615. ([doi:10.1093/humrep/deu353](https://doi.org/10.1093/humrep/deu353))

Svetlova MP, Solovjeva LV & Tomilin NV 2010 Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks. *Mutation Research* **685** 54–60. ([doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.08.001))

Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K & Kurachi H 2013 Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: mini review. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **39** 1431–1439. ([doi:10.1111/jog.12111](https://doi.org/10.1111/jog.12111))

Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T & Karimi I 2012 The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **29** 175–183. ([doi:10.1007/s10815-011-9706-6](https://doi.org/10.1007/s10815-011-9706-6))

Tarumi W, Suzuki N, Takahashi N, Kobayashi Y, Kiguchi K, Sato K & Ishizuka BJ 2009 Ovarian toxicity of paclitaxel and effect on fertility in the rat. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **35** 414–420. ([doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01023.x](https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2009.01023.x))

Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R & Artini PG 2010 Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological Endocrinology* **26** 563-567. ([doi:10.3109/09513591003686395](https://doi.org/10.3109/09513591003686395))

Velez-Pardo C, Morales AT, Del Rio MJ & Olivera-Angel M 2007 Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology* **67** 1285–1296. (doi:10.1016/j.theriogenology.2007.01.018)

West ER, Shea LD, Woodruff TK. 2007 Engineering the follicle microenvironment. *Seminars in Reproductive Medicine* **25** 4 287-299.

Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S & Hardy K 1999 Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction* **14** 1555–62. (doi:https://doi.org/10.1093/humrep/14.6.1555)

Yucebilgin S, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E & Erhan Y 2004 Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: An animal model of premature ovarian failure and infertility. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology* **44** 6–9. (doi:10.1111/j.1479-828X.2004.00143.x)

Zhang H, Wu B, Liu H, Qiu M, Liu J, Zhang Y & Quan F 2013 Improving development of cloned goat embryos by supplementing alpha-lipoic acid to oocyte in vitro maturation medium. *Theriogenology* **80** 228–233. (doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.027)

Zhang XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T, Zhu HB 2011 Recovery of mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Mol. Reprod. Dev.* **78**(12) 942-950.

Zhao XM, Hao HS, Du WH, Zhao SJ, Wang HY, Wang N, Wang D, Liu Y, Qin T, Zhu HB. 2015 Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes *Journal of Pineal Research* **60** 2 132-41. (doi: 10.1111/jpi.12290)