



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

**MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANETOL OU ROBININA NA VITRIFICAÇÃO  
E INCUBAÇÃO IN VITRO DO TECIDO OVARIANO OVINO**

**FORTALEZA**  
**2018**

MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANETOL OU ROBININA NA VITRIFICAÇÃO  
E INCUBAÇÃO IN VITRO DO TECIDO OVARIANO OVINO**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, do departamento de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia da Reprodução.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA

2018

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)

---

- M826e Morais, Maria Luana Gaudencio dos Santos.  
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANETOL OU ROBININA NA VITRIFICAÇÃO E INCUBAÇÃO  
IN VITRO DO TECIDO OVARIANO OVINO / Maria Luana Gaudencio dos Santos Morais. – 2018.  
67 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.  
Coorientação: Profa. Dra. Valdevane Rocha Araújo.
1. Vitrificação. 2. Tecido ovariano. 3. Antioxidantes. 4. Foliculogênese. 5. Fertilidade. I. Título.  
CDD 615.1
-

**MARIA LUANA GAUDENCIO DOS SANTOS MORAIS**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANETOL OU ROBININA NA VITRIFICAÇÃO  
E INCUBAÇÃO IN VITRO DO TECIDO OVARIANO OVINO**

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: Biologia da Reprodução.

**Aprovada em:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Valdevane Rocha Araújo (Co-Orientadora)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Dra. Danielle Cristina Calado de Brito  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Amanda Cordova  
University of Guelph

Dedico a realização deste sonho, primeiramente, à Deus por ter me dado forças para vencer os percalços da vida. À Maria Gaudencio, pelo exemplo de perseverança e apoio em todos os momentos da minha vida. E à Samuel Moraes por toda sua compreensão e apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela sua infinita bondade, amor e por me dar esperanças, forças, coragem durante toda a minha vida.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais pelos conhecimentos e experiências proporcionados.

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.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE pela oportunidade e, toda contribuição científica.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues por me receber como aluna de mestrado, pelos seus ensinamentos, suporte e correções.

À minha Co-orientadora Valdevane Rocha Araújo pelos conselhos e assistência.

À minha segunda Co-orientadora Danielle Cristina Calado de Brito por toda sua dedicação, esforço, disponibilidade e atenção, muito obrigada por ter sacrificado feriados e finais de semana para me ajudar.

Aos membros da banca, doutoras Ana Paula Ribeiro Rodrigues, Valdevane Rocha Araújo, Danielle Cristina e Amanda Cordova pela disponibilidade e contribuições na avaliação deste trabalho.

Ao doutorando Yago Pinto da Silva pelo empenho dedicado a este trabalho, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Dr. Benner Geraldo e ao Professor Dr. Cláudio Cabral pela execução das análises estatísticas.

Aos Pós-docs do LAMOFOPA, Giovanna Quintino Rodrigues, Francisco Léo Nascimento, Laritza Ferreira, Geovania Canafistula e Heline Helen, por todo suporte.

À minha equipe de trabalho, Diego Viscarra, Yago Silva, Luciana Mascena, Renato Félix, Danielle Calado, por terem me dado todo apoio e ajuda na execução deste trabalho.

Ao meu marido Samuel Morais pelo companheirismo, apoio, conselhos e motivação ao longo da minha vida acadêmica.

À minha família, Bruno Alves, Nayane Kelly, Maria Eduarda, e em especial a minha mãe Maria Gaudêncio por sempre me dar forças e me encorajar em todos aspectos da minha vida.

Ao Sr. João Batista por sua solicitude, pelos cafés, almoços e disponibilidade em ajudar.

Aos meus queridos amigos Renato Félix, Kayse Najara, Talyne Emilia, Luciana Mascena, Naiza Ribeiro por tornarem o meu dia-a-dia mais leve, pela paciência, amparo e pelos inúmeros conselhos.

Ao meu querido amigo José Arnaldo Moreira Sousa quem me apresentou ao LAMOFOPA e sempre esteve presente ao longo dessa jornada.

Á Gildas Mbemya por todo auxílio com o meu artigo e por todo o seu altruísmo.

Aos colegas que fiz durante o mestrado, Olga Juliana, Nathali Jiatsa Lidiane Sales, Ivila Lorraine, Guerreiro, Hudson Correia, Victor Macedo, Deysi Dipaz, Jesus Cadenas, Anna Clara Acciolly, Andreza Sá, Letícia Ferreira, Rita Kelly pelas conversas, momentos de distrações, conselhos e risadas, etc.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis” (José de Alencar)



## RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito da adição dos antioxidantes naturais, anetol (AN) e robinina (RO), na solução de vitrificação e no meio de incubação *in vitro* de tecido ovariano ovino. Inicialmente (etapa 1), foi analisada a porcentagem de folículos pré-antrais morfolologicamente normais (FPMN) inclusos no tecido ovariano fresco (Controle - CTR), vitrificado na ausência de antioxidantes (VSA), apenas incubado *in vitro* (IIV) por 24 h ou vitrificado na presença de diferentes concentrações de anetol (AN: 30, 300, 2000 µg/mL) ou robinina (RO: 0,125; 0,25; 0,50 mg/mL), seguido de incubação *in vitro*, totalizando nove tratamentos. Na etapa 2, os tratamentos, CTR, VSA, IIV, AN2000 e RO1.25 foram mantidos e adicionados ambos tipos e concentrações de antioxidantes na incubação *in vitro*, resultando nos tratamentos AN2000<sup>+</sup> e RO1,25<sup>+</sup>, totalizando agora sete tratamentos. No final de 24 h de incubação, foram avaliados os seguintes parâmetros: ativação folicular, densidade de células no estroma (DCE), níveis de EROs nos fragmentos e meio de incubação *in vitro*, capacidade antioxidante total (CAT) e a atividade mitocondrial. Os dados foram submetidos ao pacote estatístico SAS, sendo as diferenças encontradas, consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Os dados da etapa 1 mostraram que a porcentagem de FPMN no AN2000 foi semelhante ao CTR e igual à RO0,125. Na etapa 2, a ativação folicular em todos os tratamentos foi superior ( $p < 0,05$ ) ao CTR e na RO0,125 foi menor do que ( $p < 0,05$ ) à VSA. Embora a DCE em todos os fragmentos vitrificados tenha sido inferior ( $p < 0,05$ ) ao CTR, nos tratamentos AN2000 e RO0.125 este parâmetro foi superior ao VSA. Os níveis de EROs no córtex ovariano oriundos do AN2000 ou AN2000<sup>+</sup> foram menores que ao CTR. Quanto aos níveis de EROS intracelulares, observou um aumento deste parâmetro nos tratamentos VSA, RO0,125 e IIV, comparados ao CTR. Por outro lado, esse parâmetro foi inferior no AN2000 quando comparado à VSA e semelhante ao CTR. No que concerne à CAT, a RO0,125 foi melhor do que a VSA, AN2000 e AN2000<sup>+</sup> e esse último foi menor do que o CTR. De acordo com os resultados obtidos, concluímos que é recomendável o uso de antioxidantes (anetol ou robinina) na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino; uma vez que o AN 2000 µg/mL preservou a morfologia folicular e RO 0,125mg/mL manteve uma CAT superior a vitrificação na ausência de antioxidantes.

**Palavras-chave:** Vitrificação. Tecido ovariano. Antioxidantes. Foliculogênese. Fertilidade

## ABSTRACT

The objective of the present work was to verify the effect of the addition of natural antioxidants, anethole (AN) and robinine (RO), in the vitrification and the in vitro incubation solution of ovine ovarian tissue. Initially (step 1), was analyzed the percentage of morphologically normal preantral follicles (MNPF) included in fresh ovarian tissue (Control - CTR), vitrified in the absence of antioxidants (VSA), only incubated in vitro (IIV) for 24 h or vitrified in the presence of different concentrations of anethole (AN: 30, 300, 2000  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) or robinin (RO: 0.125, 0.25, 0.50  $\text{mg} / \text{mL}$ ), followed by in vitro incubation, totaling nine treatments. In stage 2, the treatments, CTR, VSA, IIV, AN2000 and RO1.25 were maintained and added both types and concentrations of antioxidants in the in vitro incubation, resulting in treatments AN2000<sup>+</sup> and RO1,25<sup>+</sup>, totaling seven treatments. After 24 h of incubation, the following parameters were evaluated: follicular activation, stromal cell density (SCD), ROS levels in the ovarian fragments and in the incubation medium, total antioxidant capacity (TAC) and mitochondrial activity. Data were submitted to the SAS statistical package, and the differences were found statistically significant when  $P < 0.05$ . The data from step 1 showed that the percentage of MNPF in AN2000 was similar to CTR and similar to RO0.125. In step 2, foilicular activation in all treatments was superior ( $p < 0.05$ ) to CTR and in RO0.125 decrease to compare ( $p < 0.05$ ) VSA. Although the DCE in all the vitrified fragments was inferior ( $p < 0.05$ ) to the CTR, in the traces AN2000 and RO0.125 this parameter was superior to the VSA. The ROs levels in the ovarian cortex from the AN2000 or AN2000<sup>+</sup> were lower than the CTR. The intracellular ROS levels was increase in the VSA, RO0,125 and IIV treatments, compared to the CTR. On the other hand, this parameter was lower in AN2000 when compared to VSA and similar compare to CTR. Regarding TAC, the RO0.125 was better than the VSA, AN2000 and AN2000<sup>+</sup>. According to the results obtained, we conclude that the use of antioxidants (anethole or robinine) in the vitrification solution of ovine ovarian tissue is recommended; since AN 2000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  preserved the follicular morphology and RO 0.125  $\text{mg} / \text{mL}$  maintained a higher TAC than vitrification in the absence of antioxidants.

**Keywords:** Vitrification. Ovarian tissue. Antioxidants. Folliculogenesis. Fertility

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema ilustrativo da organização do ovário de mamíferos representando a sequência de desenvolvimento desde os folículos primordiais até a formação da cavidade antral e ovulação, corpos lúteos, albicans, estroma ovariano na região cortical e artérias e veias na região medular.....20
- Figura 2-** Esquema de formação do folículo primordial desde a migração das CGPs para gônada até o encapsulamento dos oócito por células somáticas da pré-granulosa (CSGP) e formação do folículo primordial.....22
- Figure 3-** Esquematisação do processo de foliculogênese no ovário mamífero, mostrando desde a formação do folículo primordial até a ovulação ou atresia .....24
- Figura 4-** (A) Imagem ilustrativa da espécie *cróton zehntneri* (*Euphorbiaceae*). (B) Figura ilustrativa da estrutura química do anetol.....30
- Figura 5-** (A) Imagem ilustrativa da espécie *Solanum asperum* (*Solanaceae*). (B) Figura ilustrativa da estrutura química da robinina.....31
- Figure 6-** Imagens representativas da morfologia dos folículos pré-antrais ovinos, FPMN são mostrados no controle (A), IIV (B), AN2000 (F) e RO0.125 (G), enquanto que FPMD são representados em VSA (C), AN30 (D), AN300 (E), RO0.25 (H) e RO0.50 (I). O: oócito; Cg: células da granulosa; (400 x). Setas indicam folículos normais; cabeças de setas indicam folículos degenerados. Após coloração com ácido periódico Schiff-hematoxilina. Barra de escala =50.....43
- Figure 7-** Percentagem (média±DP) de FPMN no tecido ovariano fresco (controle), após incubação, vitrificação sem ou com antioxidantes(AN ou RO), seguida de incubação por 24 h com ou sem antioxidantes (AN ou RO).<sup>\*</sup> Diferem do CTR, <sup>†</sup>Diferem do IIV, <sup>β</sup>Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação(P

<0,05).....44.

**Figura 8-** Imagens representativas do estroma ovariano ovino (A) Controle, (B) IIV, (C) VSA, (D) AN2000, (E) RO0.125, (F) AN2000<sup>+</sup>, (G) RO0.125<sup>+</sup>. Coloração PAS. Barra de escala 50 µm. \* indica perda de células estromais.....46

**Figure 9-** **Figure 9.** Níveis de EROs (MÉDIA ±EP) em unidades de fluorescências relativas produzidas no córtex ovariano fresco e no meio de incubação, nos diferentes tratamento após incubação, vitrificação sem ou com antioxidantes (AN ou RO), seguida de incubação por 24 h. \*Diferem do CTR, †Diferem do IIV, <sup>β</sup>Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação(P <0,05).....47

**Figure 10-** (A) Quantificação dos níveis de EROs intracelular e atividade mitocondrial (B) Correlação entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de EROs. Cada ponto do gráfico representa uma amostra de tecido ovariano, r = 0,42; P = 0,001. (C) Imagens representativas dos níveis de EROs intracelular representado pela intensidade fluorescência do DCFH-DA (1-5), atividade mitocondrial representada pela intensidade de fluorescência do Mitotracker (6-10), e sobreposição das duas sondas (11-15) nos diferentes tratamentos (Controle, IIV, VSA, AN2000 e RO0.125). Barra de escala 20 µm.....48

**Figure 11-** Capacidade antioxidante total mensurada pela análise de FRAP. \*Diferem do CTR, †Diferem do IIV, <sup>β</sup>Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação(P <0,05).....49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Percentagem (Média± DP) de ativação follicular e densidade de células do estroma (células/ 100µm <sup>2</sup> ) in tecido ovariano fresco (controle), após a incubação , vitrificação sem ou com antioxidantes(AN e RO), seguido de incubação (24 h) sem ou com antioxidantes(AN ou RO).....	45
------------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACPs:</b>	Agentes crioprotetores
<b>AN:</b>	Anetol
<b>ATP:</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BMP-15:</b>	Proteína morfogenética óssea 15
<b>CAT:</b>	Catalase
<b>CGPs:</b>	Células Germinativas Primordiais
<b>CSGPs:</b>	Células Somáticas da Pré-Granulosa
<b>DCF:</b>	Diclorofluorescina
<b>DCFH-DA:</b>	2', 7'-diidrodiclorofluoresceína diacetato
<b>CTO:</b>	Criopreservação de tecido ovariano
<b>DMSO:</b>	Dimetilsufóxido
<b>DNA:</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EG:</b>	Etilenoglicol
<b>EROs:</b>	Espécies Reativas a Oxigênio
<b>FRAP:</b>	Ferro Reducing Antioxidant Power
<b>FOPA:</b>	Folículos Ovarianos Pré-antrais
<b>FPMN:</b>	Folículos pré-antrais morfologicamente normais
<b>FSH:</b>	Hormônio Folículo Estimulante
<b>FGF-2:</b>	Fator de crescimento de fibroblasto
<b>GDF-9:</b>	Fator de crescimento e diferenciação-9
<b>GPx:</b>	Glutathione Peroxidase
<b>GSH:</b>	Glutathione
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>IARC:</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>KGF:</b>	Fator de crescimento de queratinócito
<b>KL:</b>	Kit Ligand
<b>LH:</b>	Hormônio Luteinizante
<b>LIF:</b>	Fator inibidor de leucemia
<b>MDA:</b>	Malonaldeído
<b>MEM:</b>	Meio Essencial Mínimo
<b>MOIFOPA:</b>	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b>	Ânio Superóxido

<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical Hidroxila
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>OTC</b>	Ovarian Tissue Cryosystem
<b>POF</b>	Premature Ovarian Failure
<b>RL</b>	Radicais livres
<b>RO</b>	Robinina
<b>ROS</b>	Reactive Oxigen Species
<b>SAC</b>	Sacarose
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>SV</b>	Solução de Vitrificação
<b>ZP</b>	Zona Pelúcida

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO OVÁRIO DE MAMÍFEROS .....	20
2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	21
2.3 MORTE OU ATRESIA FOLICULAR.....	23
2.4 CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO .....	25
2.5 VITRIFICAÇÃO.....	26
2.6 RADICAIS LIVRES, ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E AGENTES ANTIOXIDANTES .....	27
2.6.1 Anetol.....	29
2.6.2 Robinina.....	30
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>4. HIPÓTESE CIENTIFICA .....</b>	<b>36</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 GERAL.....	37
5.2 ESPECÍFICOS.....	37
<b>6 METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
6.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO E PROCESSAMENTO .....	38
6.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
6.2.1 <i>Etapa 1: Morfologia de folículos pré-antrais vitrificados em diferentes concentrações de anetol (AN) ou Robinina (RO) .....</i>	<i>38</i>
6.2.2 <i>Etapa 2: Análises histológicas e bioquímicas após a vitrificação e/ou incubação de tecido ovariano .....</i>	<i>39</i>
6.3 VITRIFICAÇÃO.....	39
6.4 INCUBAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	40
6.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS POR HISTOLOGIA CLÁSSICA ...	40
6.6 DENSIDADE DE CÉLULAS DO ESTROMA.....	40
6.7 DETERMINAÇÃO DE EROS .....	41
6.8 ATIVIDADE MITOCONDRIAL E NÍVEIS INTRACELULARES DE EROS .....	41
6.9 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO FÉRRICA (FRAP) .....	42
6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>



7.1 ETAPA I- MORFOLOGIA FOLICULAR .....	43
7.2 ETAPA 2- ANÁLISES HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICAS.....	44
7.2.1 Ativação folicular.....	44
7.2.2 Densidade das células do estroma.....	45
7.2.3 Níveis de EROs no meio de incubação e nos fragmentos ovarianos.....	46
7.2.4 Níveis intracelulares de EROs Atividade mitocondrial .....	47
7.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante total.....	48
<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação do tecido ovariano (CTO) é uma ferramenta que tem demonstrado uma grande relevância para a reprodução assistida nos últimos anos, pois permite a preservação da fertilidade, tanto de mulheres que necessitam imediatamente de terapias contra o câncer (KARAVANI et al., 2017), quanto de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção (SANTOS et al., 2008), que podem vir a óbito de maneira inesperada. A CTO permite a preservação de um grande *pool* de folículos pré-antrais inclusos no córtex do ovário, os quais representam cerca de 90 a 95% de toda a população de folículos ovarianos, além de serem fonte doadora de oócitos, utilizados na reprodução medicalmente assistida (GERAVANDI, 2017). A CTO pode ser realizada através da congelação lenta ou da vitrificação. Diferentemente da congelação lenta, o processo de vitrificação é realizado sem ou com um mínimo de formação de cristais de gelo intra e extracelular (SADAT et al., 2017).

Apesar dessa grande vantagem da vitrificação, diversos fatores podem afetar a qualidade do tecido submetido a esse procedimento, como, por exemplo, os danos metabólicos, provenientes dos processos de desidratação; o choque osmótico e o aquecimento. Esses danos resultam no desbalanço do sistema de defesa antioxidante, culminando no acúmulo excessivo de espécies reativas a oxigênio (EROs), e conseqüentemente gerando estresse oxidativo. Além de severos danos em vários componentes celulares (FOROUZANFAR et al., 2013), o desequilíbrio oxidativo pode causar também disfunções mitocôndrias (ZHAO et al., 2012; WU et al., 2016) que podem resultar na morte da célula (ROUTHEM et al., 2015). Por essa razão, o uso de antioxidantes na solução de vitrificação pode exercer efeitos benéficos reduzindo as injúrias causadas pelo excesso de EROs (SINDHI et al., 2013). Não apenas na vitrificação, mas também no cultivo *in vitro* o qual pode levar a um aumento na produção de EROs no tecido ovariano (ZAVAREH et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram que antioxidantes naturais como *anetol* (fenilpropanóide encontrado no óleo essencial da planta *Cróton zehntneri*) e a *robinina* (substância presente na fração flavonoide da planta *Solanum asperum*), têm sido eficazes no controle e combate de EROs (MANSUY et al., 1986; PARDO-ABREU et al., 2008; JANEESH & ABRAHAM., 2014). No cultivo *in vitro* de longa duração de folículos pré-antrais isolados (Sá et al., 2017) ou inclusos no tecido ovariano caprino (Sá et al., 2017), o anetol reduziu os níveis de EROs. Um estudo *in vivo*, realizado em ratos tratados com doxorubicina (quimioterápico anticancerígeno), mostrou que a robinina reduziu o malonaldeído (marcador de estresse oxidativo) e aumentou os níveis de enzimas antioxidantes no músculo estriado

cardíaco (JANEESH & ABRAHAM., 2014).

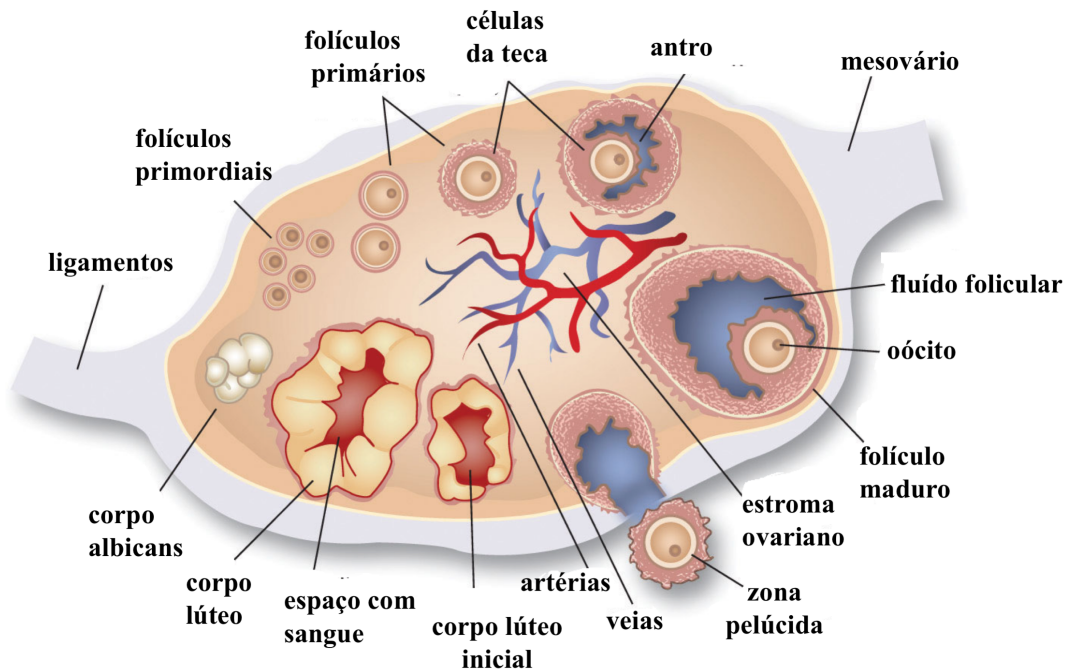
Considerando a importância dos folículos pré-antrais para a reprodução assistida; o controle da geração de EROs na manipulação desses folículos presentes no córtex ovariano, seja pela vitrificação ou pelo cultivo *in vitro*, bem como o efeito positivo do anetol e da robinina em sistemas biológicos, um profundo esclarecimento sobre esses temas se faz necessário. Portanto, a revisão de literatura apresentada nesta Dissertação aborda os seguintes tópicos: estrutura e função do de ovário mamíferos; os processos de formação de oócitos (oogênese) e folículos ovarianos (foliculogênese); morte ou atresia folicular, criopreservação do tecido ovariano, vitrificação; importância das espécies reativas de oxigênio e agentes antioxidantes, bem como análise do tecido ovariano após a criopreservação. Nessa Dissertação também será mostrada a contribuição científica deste estudo para o processo de criopreservação do tecido ovariano ovino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Estrutura e função do ovário de mamíferos

O ovário mamífero é um órgão duplo e crítico para a função reprodutiva que contém e suporta o desenvolvimento do gameta feminino, isto é, o oócito (VANORNÝ e MAYO, 2017). A morfologia deste órgão é estruturalmente organizada em duas regiões: a *medular*, localizada internamente, e a *cortical*, situada externamente. A região medular é encarregada por nutrir e sustentar o ovário, e é caracterizada pela presença de nervos, artérias e veias que se estendem até o córtex ovariano (CORMACK *et al.*, 1991). Já, a região cortical, além de conter corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos, é principalmente, constituída por folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento e, alguns em fase de regressão ou atrésicos (ERICKSON e CHANG 2007). A figura 1 mostra, esquematicamente, como se apresenta a estrutura ovariana.

**Figura 1.** Esquema ilustrativo da organização do ovário de mamíferos representando as regiões medular e cortical, bem como a sequência de desenvolvimento folicular e demais estruturas.



Fonte: <http://muvag.info/anatomy-of-the-ovaries.html#>

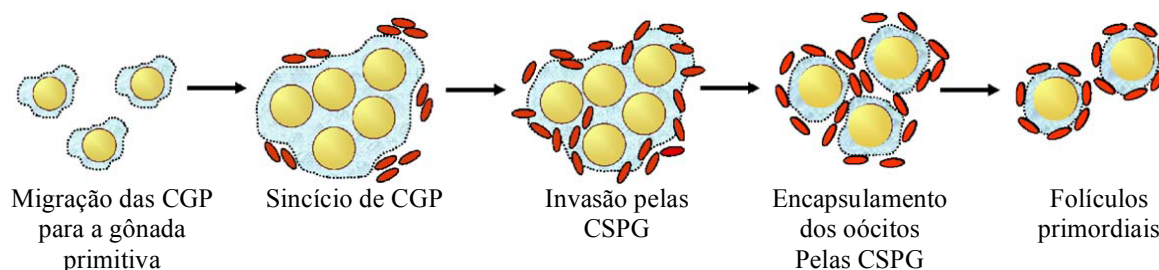
Os ovários são responsáveis por desempenhar uma função exócrina e uma endócrina. A

unidade funcional do ovário, que é o folículo ovariano, gera um nicho especializado, necessário para o desenvolvimento e liberação de um oócito maturo (VANORNY e MAYO, 2017) apto à fertilização, caracterizando, assim, a função exócrina (MCGEE *et al.*, 2001). O folículo ovariano também é essencial para a produção de hormônios esteróides, os quais regem e suportam a saúde reprodutiva da fêmea (VANORNY e MAYO, 2017), caracterizando a função endócrina (McGEE *et al.*, 2001). A morfogênese e o desenvolvimento de ambos, oócito e folículo, estão relacionados, respectivamente, com os processos de oogênese e foliculogênese, cujos processos estão resumidamente descritos a seguir.

## 2.2 Oogênese e Foliculogênese

O fenômeno de formação do gameta feminino ou oócito é denominado ***oogênese***, cujo evento inicia-se durante o desenvolvimento embrionário com a migração das células germinativas primordiais (CGPs) para a crista gonadal conhecida também como gônada primitiva ou indiferenciada (JAGARLAMUDI e RAJKOVIC, 2012). A partir deste momento, as CGPs colonizam a gônada indiferenciada e após um processo de redistribuição de organelas e crescimento celular, essas células se multiplicam ativamente e passam a ser denominadas oogônias (VAN DEN HURK *et al.*, 1997; SANCHEZ e SMITZ, 2012). Após um intenso período de mitose, as oogônias param de se multiplicar e entram em meiose, se diferenciando e produzindo os oócitos primários, os quais permanecem parados em meiose I na fase de prófase (diplóteno) até que ocorra a maturidade reprodutiva (ELKOUBY e MULLINS, 2017). A partir dessa fase, sob influência dos picos de FSH e LH, alguns os oócitos retomam a meiose. Esse processo é caracterizado pelo rompimento da vesícula germinal e, subsequente progressão nas fases da meiose até metáfase II, momento no qual é liberado o primeiro corpúsculo polar. Nesse estágio, o oócito estaciona pela segunda vez e é classificado como maturo ou secundário, permanecendo nessa condição até que ocorra a ovulação. A migração de CGP para a gônada indiferenciada para formação do oócito e do folículo ovariano é apresentado, resumidamente na figura 2. A continuação, bem como a finalização do processo meiótico, depende da fertilização do oócito. A partir do contato com o espermatozoide, o oócito retoma a meiose, libera o segundo corpúsculo polar e forma uma estrutura denominada oócito haploide fecundado (SILVA *et al.*, 2002; MANNING *et al.*, 2008).

**Figura 2.** Esquema resumido da migração das células germinativas para a gônada primitiva e formação dos oócitos e folículos primordiais.



FONTE: Adaptado de BRISTOL-GOULD et al (2006, p. 133)

A **foliculogênese** é um processo concomitante ao da oogênese, pois inicia durante a vida fetal (maioria dos mamíferos) ou na vida neonatal (roedores), no qual o oócito fica envolvido por uma camada de células somáticas da pré-granulosa (CSPG), esta estrutura é denominada folículo ovariano primordial (Fig. 2), o qual permanece quiescente por meses ou anos (McLAUGHLIN *et al* 2010). A formação e o recrutamento de um folículo do *pool* de folículos quiescentes (folículos primordiais) para o *pool* de folículos em crescimento é finalizada a partir da puberdade com a ovulação ou atresia (morte folicular). A foliculogênese é dividida em duas fases. A primeira fase, denominada de *pré-antral* ou *independente de gonadotropina*, caracteriza-se pelo crescimento e diferenciação do oócito (WILLIAMS e ERICKSON, 2012) e compreende os folículos pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário). A segunda fase denominada de antral ou dependente de gonadotropina, é caracterizada pelo intenso crescimento do tamanho do folículo até aproximadamente 25 a 30 mm (WILLIAMS e ERICKSON, 2012). Os folículos são classificados como folículos terciários e pré-ovulatórios. Os processos de foliculogênese pré-antral e antral estão representados na figura 3.

No que concerne à foliculogênese pré-antral, os *folículos primordiais* representam cerca de 95% da população folicular do ovário e, morfológicamente são caracterizados por possuírem um oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (ERICKSON, 1986; HULSHOF *et al.*, 1994). A partir da idade reprodutiva, um grupo de folículos primordiais começa a crescer após a ativação do oócito. Até o presente momento não está estabelecido como ocorre a ativação, entretanto sabe-se que os folículos primordiais são independentes de gonadotropinas, porém, regulados por fatores autócrinos e parácrinos como por exemplo, o fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), fator de crescimento de diferenciação-9 (GDF-9),

fator de crescimento de fibroblasto 2, (FGF2), dentre outros (JONH *et al.*, 2007; MCLAUGHLIN *et al.*, 2010; ROSARIO *et al.* 2017).

Após a ativação folicular, as células da granulosa que envolvem o oócito sofrem diferenciações tais como: aumento de tamanho, mudança na conformação do citoesqueleto, mudança de formato pavimentoso para cúbico. Quando há a presença de células da granulosa com formato pavimentoso e cúbico, o folículo é classificado como de *transição* (SILVA *et al.*, 2004). Porém, quando todas as células da granulosa adquirem o formato cúbico e envolvem completamente o oócito, o folículo passa a ser denominado *folículo primário*.

A progressão do desenvolvimento folicular é acompanhada pela proliferação das células da granulosa e quando duas ou mais camadas dessas células circundam o oócito, o folículo é classificado como *folículo secundário* (PAN *et al.*, 2012; HAAG *et al.*, 2013). Nesse estágio já é possível observar a zona pelúcida (ZP), uma matriz extracelular transparente de natureza glicoproteica importante para oogênese, fertilização e pré-implantação do embrião (CHOI *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017). Adicionalmente nesta fase é possível ver a diferenciação das células do estroma para a categoria de células tecais, as quais são importantes para esteroidogênese ovariana. (WICKENHEISSER *et al.*, 2006; QIU *et al.*, 2014). Com a secreção de fatores androgênicos, além do acúmulo de água e sais minerais reorganizam as células da granulosa, ocorre a formação da cavidade antral, caracterizando, portanto, a primeira categoria de folículos antrais, ou seja, os *folículos terciários*. Por fim, o último estágio do crescimento folicular, culmina com a formação do *folículo pré-ovulatório*, caracterizado por apresentar um aumento na cavidade antral e um oócito em metáfase II, diferentemente das fases anteriores que apresentavam oócitos em prófase I (GREEN ., 2016).

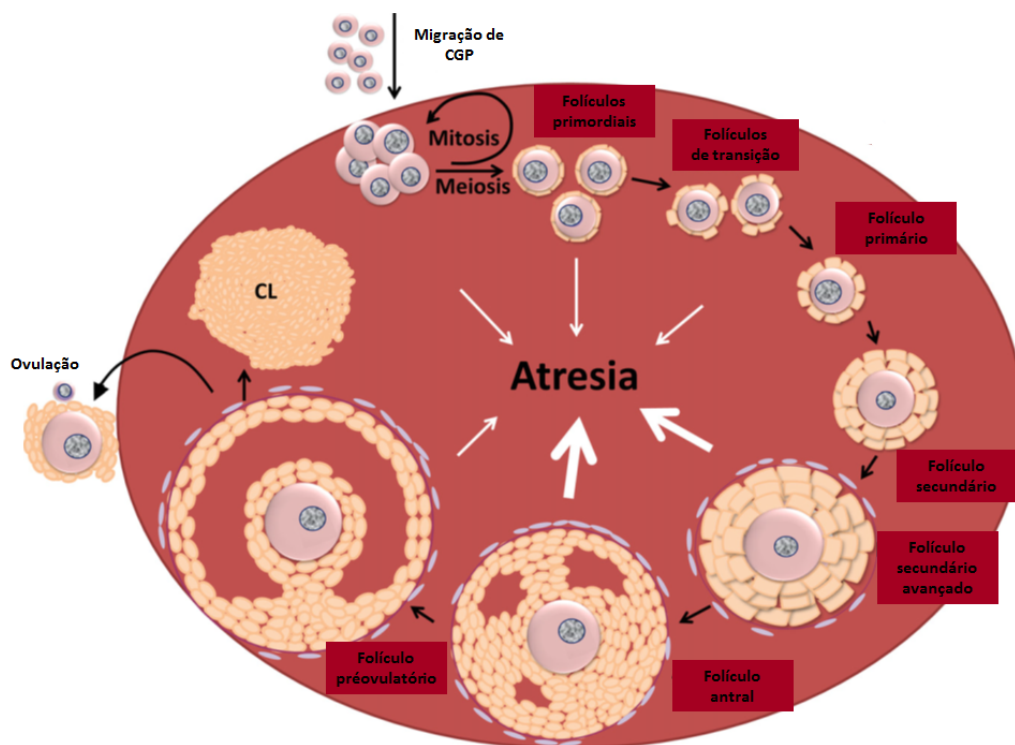
Ao contrário da população de folículos antrais, que é pouco representativa no ovário, os folículos pré-antrais constituem 90% da população folicular em todas as espécies (FIGUEIREDO *et al.*, 1999). Entretanto, apesar de existir *in vivo* um grande *pool* de folículos aptos a ativação, a maioria desses folículos não completa o desenvolvimento, pois sofrem durante o período reprodutivo da fêmea, um processo conhecido como atresia (MARKSTRÖM *et al.*, 2002) ou morte folicular.

### **2.3 Morte ou atresia folicular**

A atresia é um fenômeno complexo de perda folicular, responsável pela morte de 99,9% dos folículos ovarianos (MAO *et al.*, 2002). Embora a atresia resulte na perda de grande parte da população folicular, esse fenômeno é de grande importância para controlar o número de

células em desenvolvimento, regulando a homeostase do ovário dos mamíferos (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). A atresia é um processo regulado por fatores endócrinos e parácrinos e pode ocorrer por meio de dois processos independentes, necrose ou apoptose (ALAN- POZOS *et al.*, 2003). Apoptose é um tipo de morte celular programada dependente de energia, caracterizada por encolhimento celular, condensação do núcleo, fragmentação no DNA, e formação de bolhas na membrana da célula (CAROU *et al.*, 2015). No ovário, as características morfológicas que identificam a apoptose podem ser observadas nos folículos ovarianos ao longo de toda a vida reprodutiva da fêmea. A figura 3 mostra que independente do estágio de desenvolvimento, os folículos podem sofrer atresia.

**Figure 3.** Esquemática do processo de foliculogênese no dos ovário mamíferos, mostrando desde a formação do folículo primordial até a ovulação ou atresia



Fonte: Adaptação de STEFFANSDOTTIR *et al* (2014, p.119).

Independente do mecanismo de morte celular, a atresia resulta na diminuição considerável do potencial reprodutivo da fêmea. Diante disso, a biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) visa resgatar esses folículos que seriam normalmente perdidos *in vivo*. A MOIFOPA, envolve a recuperação folicular, criopreservação e/ou cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais, tornando-



os aptos a serem maturados e fertilizados (FIGUEIREDO., 2007). No tocante a criopreservação, esta tem um papel muito importante na MOIFOPA, haja vista que nem sempre é possível manipular os folículos imediatamente após a recuperação. A criopreservação, atualmente tem sido empregada para a preservação dos folículos pré-antrais presentes no tecido ovariano, com a finalidade de restauração da função reprodutiva de crianças ou mulheres jovens que se submetem às drogas gonadotóxicas, comumente utilizados para o tratamento do câncer. Além dessa aplicabilidade, a criopreservação de tecido ovariano também tem um impacto muito grande na preservação do material genético de espécies raras ou em risco de extinção (CHATTERJEE *et al.*, 2017).

## 2.4 Criopreservação do tecido ovariano

A criopreservação consiste em um processo pelo qual células ou tecidos são preservados a temperaturas ultrabaixas, o que resulta em uma diminuição da taxa metabólica, e possibilita a estocagem de materiais biológicos por tempo indeterminado (AMORIM *et al.*, 2011; MANDAWALA *et al.*, 2016). A criopreservação tem sido uma técnica auxiliar e de grande valor para as técnicas de reprodução assistida, seja em humanos ou em animais domésticos. No que concerne à reprodução de fêmeas ou à fertilidade feminina, embriões, gametas (oócitos) e até mesmo o tecido ovariano têm sido criopreservados com sucesso (ANDERSEN *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Jensen *et al.* (2016) afirmou que na espécie humana, aproximadamente 95 indivíduos já nasceram após a criopreservação seguida do transplante de tecido ovariano.

A criopreservação de tecido ovariano (CTO) tem como objetivos a restauração das funções endócrina e gametogênica (POIROT *et al.*, 2012; HATAMI *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). Além da possibilidade de salvaguardar um grande *pool* de folículos pré-antrais, em humanos, a CTO apresenta diversas vantagens, comparada à criopreservação de embriões ou oócitos, dentre as quais podem ser destacadas: **1)** é a única opção disponível para a preservação da fertilidade de jovens pré-púberes e que não respondem ao tratamento hormonal quando é necessário a coleta de oócitos maduros (JOHNSON *et al.*, 2017; HICKMAN *et al.*, 2016) ou **2)** para pacientes que necessitam iniciar o tratamento quimioterápico de forma imediata; **3)** pode ser recomendada para mulheres que sofrem de falha ovariana prematura (LI *et al.*, 2013), como um método alternativo à terapia hormonal (ANDERSEN *et al.*, 2015); **4)** pode ser realizada em qualquer fase do ciclo menstrual ou estral e **5)** além de tudo, o ovário é de fácil acesso por laparoscopia (LOTZ *et al.*, 2016; KARAWANI., 2017).

Exceto aqueles relatados por Kawamura *et al* (2013) e Suzuki *et al* (2015), praticamente

todos os casos de sucesso relatados com a criopreservação e transplante de tecido ovariano têm sido utilizados a congelação lenta como método de escolha (DONNEZ e DOLMANS., 2004; RIVEL *et al.*, 2011; MEIROW *et al.*, 2016). No entanto, de acordo com SILBER *et al.* (2016), agora o método escolhido tem sido a vitrificação, devido aos excelentes resultados das análises de viabilidade *in vitro*, bem como aos estudos *in vivo* (transplante) realizados não somente em humanos (SUZUKI *et al.*, 2015), como também em bovinos (KAGAWA *et al.*, 2009) e ovinos (BORDES *et al.*, 2005).

## 2.5 Vitrificação

Como mencionado acima, a congelação lenta tem sido um método largamente aplicado na criopreservação não somente de tecido ovariano, mas também de células germinativas e embriões (ASGARI *et al.*, 2015). No processo de congelação lenta, normalmente são usadas baixas concentrações de agentes crioprotetores (AMBROSINI *et al.*, 2006) e a redução da temperatura ocorre de forma lenta e gradual. Porém, o maior entrave desse método é a grande incidência de formação de cristais de gelo intracelular (WANG, *et al.*, 2008), o que leva a sérias injúrias do material congelado.

Como uma alternativa a congelação lenta, foi introduzido em meados dos anos 80 a vitrificação, que surgiu como um procedimento mais simples, potencialmente rápido e menos oneroso (HERRAIZ, *et al.*, 2014). As principais diferenças entre esses métodos são as altas concentrações dos agentes crioprotetores, bem como a alta velocidade de taxa resfriamento de 15.000 – 30.000° C/min. (WANG *et al.*, 2016). Essas duas características associadas, permitem que a solução de vitrificação do material seja criopreservada em um estado vítreo, resultando em um mínimo de formação de cristais de gelo (YAVIN e ARAV, 2007). Desde a sua introdução, a vitrificação tem sido alvo de muitas investigações as quais demonstram resultados positivos com o uso desse método. Na espécie humana, a vitrificação vem possibilitando o nascimento de crianças saudáveis (KAWAMURA *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2015), a obtenção de embriões de alta qualidade a partir de oócitos vitrificados (ISACHENKO *et al.*, 2017) e a manutenção das características histológicas, ultraestruturas e viabilidade de células foliculares e estromais ovarianas (TALEVI *et al.*, 2016).

Em animais, a aplicação da vitrificação de tecido ovarino também tem apresentado resultados promissores, como a manutenção de características morfológicas e porcentagem de folículos normais semelhantes as encontradas no tecido fresco (SARD *et al.*, 2015; TING *et al.*, 2013), preservação de funções críticas e de atividade transcricional (MOUTTHAM, 2016),

preservação da viabilidade tecidual e folicular (GUEDES *et al.*, 2017), e integridade de células do estroma (GASTAL *et al.*, 2017). Quando associado ao transplante de tecido ovariano, permitiu a ovulação em primatas (AMORIM *et al.*, 2011), assim como o nascimento de crias saudáveis na espécie ovina (BORDES *et al.* 2005).

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com a vitrificação de tecido ovariano, todo material biológico vitrificado sofre com os danos causados pelo estresse oxidativo. Esse efeito ocorre porque a vitrificação altera o potencial antioxidante enzimático do tecido ovariano ou induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido às altas concentrações de crioprotetores utilizadas (BEST, 2015). Estudos têm mostrado que a adição de substâncias antioxidantes à solução de vitrificação pode ser uma excelente estratégia para minimizar os efeitos causados pelos radicais livres (RLs) durante o processo de vitrificação (MOAWAD *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2016).

## **2.6 Radicais livres, espécies reativas de oxigênio e agentes antioxidantes**

Os RLs são moléculas instáveis ou fragmentos de moléculas que possuem um número ímpar de elétrons na sua órbita exterior (CORDOVA e NAVAS., 2000), sendo representados tanto pelas espécies reativas ao nitrogênio (ERNs) quanto pelas espécies reativas ao oxigênio (EROs). As EROs compreendem ambas as moléculas reativas radicais não-livres e radicais livres derivadas do oxigênio (AGARWAL *et al.*, 2014), e nos organismos aeróbicos, a produção de moléculas acontece de forma natural, sendo geradas tanto no citoplasma (mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos), quanto na membrana plasmática (IDELCHIK *et al.*, 2016). A maior produção de EROs acontece, principalmente, nas mitocôndrias durante o processo de fosforilação oxidativa, reação responsável pela produção de ATP (DAVIES *et al.*, 1995). De acordo com Ray e Shah, (2005), os tipos mais comuns de EROs pertencem a uma família de moléculas que incluem os radicais: ânion superóxido ( $O_2\bullet$ ), radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

Apesar dos perigos que o excesso de EROs oferece para a célula, sob condições normais, essas moléculas são importantes na manutenção de várias funções fisiológicas e exercem um papel crítico na regulação de processos celulares como, resposta imunológica, crescimento, proliferação e sinalização celular. Além disso, atuam de forma indireta na regulação de morte celular e em processos bioquímicos como a transferência de elétrons, fertilização de oócitos, ativação de genes e defesa contra infecções (SHAMI e MOREIRA, 2004). Apesar de promoverem o processo celular normal sob condições fisiológicas, quando há um desbalanço

entre a produção de EROs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante, o excesso de EROs pode gerar estresse oxidativo (SAHEBKAR *et al.*, 2015; SCHAFER e BUETTNER, 2001; QINGMING *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é responsável por alterar diversas moléculas intracelulares e causar prejuízos entre os quais podemos citar, danos no DNA, nas proteínas e nos lipídios (VAANHOLT *et al.*, 2015, MURPHY *et al.*, 2011).

Na reprodução *in vivo*, altas concentrações de EROs podem comprometer a capacidade do oócito ser fecundado pelo espermatozoide (HAMMADEH *et al.*, 2008). Quanto se trata de da reprodução *in vitro*, estudos mostraram que altas concentrações de EROs podem produzir gametas defeituosos (DU PLEISSIS *et al.*, 2008) além de afetar de forma negativa a competência do desenvolvimento embrionário (LINVINGSTON *et al.*, 2009).

Especificamente, no que se refere à vitrificação, já foi observado que esse procedimento aumenta os níveis de EROs intracelulares (GUPTA *et al.*, 2010; MOSTEK *et al.*, 2017), levando as células a sofrerem estresse oxidativo e, conseqüentemente comprometendo a qualidade do tecido crioestocado (ZHAO *et al.*, 2012). Conforme mencionado anteriormente, essa condição é causada principalmente pelas altas concentrações de agentes crioprotetores, além do estresse osmótico e térmico, aos quais as células são submetidas durante o processo de vitrificação (MOSTEK *et al.*, 2017). Alguns autores demonstraram que a vitrificação causou aumento dos níveis de EROs, afetando o desenvolvimento folicular, bem como levando a danos no DNA (CARVALHO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016).

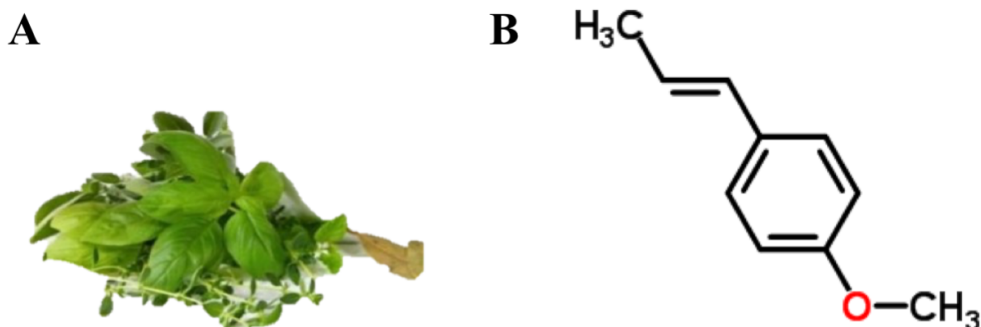
A produção e o desbalanço de EROs podem ser controladas por meio do uso de substâncias antioxidantes, que mesmo em pequenas concentrações possuem a função de inibir ou atrasar a oxidação de um substrato (IDELCHIK *et al.*, 2017). O sistema de defesa antioxidante pode ser classificado como *enzimático* e *não enzimático*, sendo biossintetizados pelo organismo ou obtidos pela alimentação, respectivamente (OKEDIRAM *et al.*, 2017). O sistema de defesa antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (LAGUERRE *et al.*, 2007). A enzima SOD age transformando dois ânions de superóxido ( $O_2^-$ ) em oxigênio e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Já a CAT e a GPx agem de forma simultânea com a glutathiona (GSH) para transformar o peróxido de hidrogênio em água (YOUNG e WOODSIDE., 2001). Em contrapartida, os antioxidantes não enzimáticos são compostos que podem ser obtidos a partir de nutrientes exógenos, como os elementos naturais ou suplementos alimentares (FANG *et al.*, 2002), como por exemplo, os fenilpropanóides e os flavonóides (AMAROWICZ *et al.*, 2004). Na presente dissertação foram investigados os antioxidantes Anetol e Robinina, um dos representantes dos fenilpropanóides e flavonóides, respectivamente.

### 2.6.1 Anetol

O anetol é extraído do óleo essencial de plantas, que são produtos que apresentam uma mistura de substâncias lipofílicas voláteis, cuja composição química inclui monoterpenos, sesquiterpenos e os fenilpropanóides (CARVALHO *et al.*, 2014). Esses últimos compreendem uma grande classe de compostos orgânicos, derivados da fenilalanina (FENG *et al.*, 2017) e apresentam uma ampla variedade de atividade biológica dentre estas incluem atividade anti-tumoral (ITOIGAWA *et al.*, 2004), anti-inflamatória (KORKINA *et al.*, 2011) e antioxidante (KORKINA *et al.*, 2007). No que concerne ao mecanismo de ação, os fenilpropanóides atuam como antioxidantes sinérgicos aumentando a atividade de antioxidantes primários como a SOD, a CAT e a GSH (KHAN *et al.*, 2011). Dentre os fenilpropanóides com atividades antioxidantes destaca-se o anetol.

O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) representa um dos principais componentes do óleo essencial da planta *Croton zehntneri*, conhecida popularmente como “canela de cunhã” ou “canelinha” (figura 4). Estudos prévios mostraram que o anetol é um eficiente antioxidante (CHAINY *et al.*, 2000; ABRAHAM, 2001; DUVOIX *et al.*, 2004; FREIRE *et al.*, 2005) que age reduzindo a peroxidação lipídica (MANSUY *et al.*, 2000), aumentando os níveis das enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT (DONGARE *et al.*, 2012), bem como diminuindo os níveis de GSH (KHANNA *et al.*, 1998). Recentes estudos, demonstraram que o anetol presente no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (folículos secundários isolados) caprinos, além de reduzir os níveis de EROs foi também capaz de estimular o desenvolvimento folicular e aumentar as taxas de retomada da meiose de oócitos oriundos desses folículos (SÁ *et al.*, 2017). Com relação aos seus efeitos na solução de vitrificação até o presente momento não foram investigados.

**Figura 4.** (A) Imagem ilustrativa da planta *cróton zehntneri* (*Euphorbiaceae*) e (B) estrutura química do anetol.



Fonte: (A) Adaptado de <http://produtosnaturais.info/plantas-medicinais/> (B) <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.553166.html>

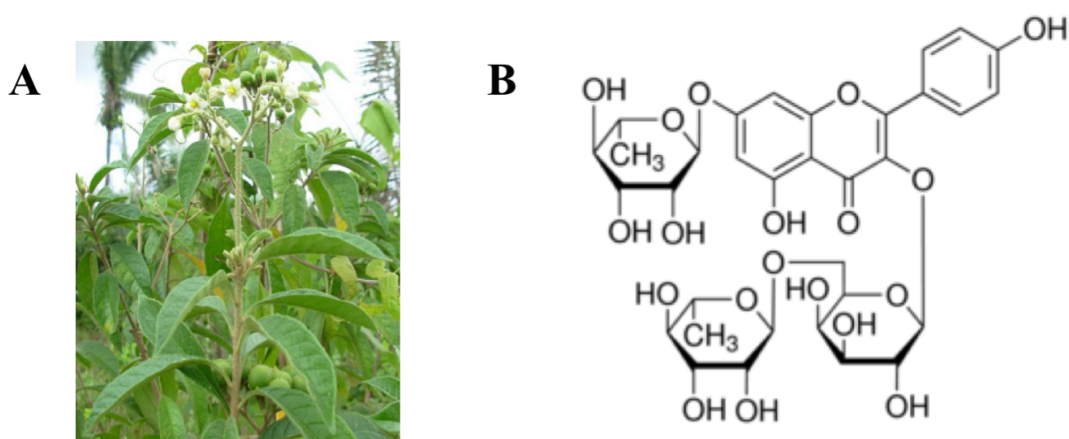
### 2.6.2 Robinina

A robinina é considerada um flavonóide, nome dado a um grupo de metabólitos secundários, naturalmente, sintetizados por plantas (fitoquímicos), a partir dos aminoácidos aromáticos, L-fenilalanina e L-tirosina. Estruturalmente, esse grupo de substância é caracterizado por apresentar dois anéis fenólicos e um anel heterocíclico (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Esses fitoquímicos são categorizados em seis classes (antocianina, flavan-3-óis, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonas), de acordo com sua estrutura química (SEBASTIAN *et al.*, 2017). A principal diferença entre esses compostos, consiste no padrão de distribuição de hidroxilas, na posição do segundo anel aromático e na saturação do anel heterocíclico (GROTEWOLD *et al.*, 2006). Quanto ao combate às EROs, os flavonóides possuem vários mecanismos de ação distintos, os quais são influenciados pela presença de hidroxilas em sua estrutura. Desta forma, os flavonoides podem atuar através da neutralização e eliminação de forma direta das EROs; pelo aumento dos níveis intracelulares de GSH e ainda pela prevenção das modificações oxidativas causadas por reativos a oxigênio (FRANDENSES *et al.*, 2018). Além da rutina, genisteína, hesperetina, quercetina e catequina, a robinina também é classificada como um flavonóide e tem sido facilmente obtida a partir da planta *Solanum asperum* (PINTO *et al.*, 2011), mostrada na figura 5.

A robinina (Kaempferol 3- O -robinoside-7- O -rhamnoside) pode ainda ser isolada a partir de várias plantas (FARKAS *et al.*, 1976), tais como *Robinia pseudoacacia*, *Pueraria hirsuta*, *Vinca erecta* e *Astrágalo shikokianus* (TSIKLAURI *et al.*, 2011), daí a facilidade de poder trabalhar com esse flavonóide. Pesquisas realizadas com a robinina comprovaram a sua

capacidade antioxidante (LAU *et al.*, 2005). Janeesh e Abraham (2014) demonstraram que os níveis de EROs no tecido cardíaco de ratos, diminuíram de maneira significativa, quando a robinina (50 mg/mL) foi associada ao tratamento com a Doxorubicina, um quimioterápico comumente utilizado para o tratamento de câncer de ovário. Nesse mesmo estudo foi observado que a administração de robinina, aumentou os níveis da SOD, CAT, GPX e GSH, além de ter aumentado a expressão do gene BCL-2 (anti-apoptótico) e diminuído a expressão dos genes Bax (pró-apoptótico) e p53 (supressor de tumor). Nas membranas de células sanguíneas foi constatado que a robinina exerceu um papel protetor, diminuindo a peroxidação lipídica, através da redução da quebra de lipídios da membrana e pela eliminação de RL (PARDO-ABREU *et al.*, 2008). Apesar desses relatos, estudos com a robinina são limitados e, até o presente momento não existe nenhum estudo sobre os efeitos dessa substância na criopreservação de tecido ovariano. Portanto, os resultados apresentados na presente dissertação são inéditos na literatura.

**Figura 5.** (A) Imagem ilustrativa da planta *Solanum asperum* (Solanaceae) (B) estrutura química da robinina.



Fonte: (A) <http://plantasdomaranhao.blogspot.com.br/2007/06/solanum-asperum-l-c-rich.html>

(B) <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/53609?lang=pt&region=BR>

## 2.7 Análises in vitro do tecido ovariano após a criopreservação

Embora a CTO já seja uma técnica utilizada em alguns países como uma alternativa viável para a restauração da função endócrina e preservação da fertilidade feminina, ainda tem sido considerada como uma técnica de reprodução assistida experimental. Isso se deve não

somente aos desafios relacionados ao procedimento de transplante, mas também aos desafios próprios do processo de criopreservação, seja pela congelamento lento ou pela vitrificação. Vários investigadores têm advertido para a qualidade do tecido ovariano que pode ou deve ser criopreservado e, subsequentemente transplantado. Desta forma, diferentes ferramentas têm sido utilizadas para a avaliação do tecido ovariano após a criopreservação. O uso das mais variadas técnicas são complementares e de grande importância para verificar a eficiência dos protocolos testados, bem como, ajustar os parâmetros que ainda necessitam ser aperfeiçoados. Dentre as técnicas disponíveis, a histologia clássica se destaca como uma primeira abordagem para verificar a qualidade folicular após esse processo (KLOCKE *et al.*, 2014).

As técnicas histológicas possibilitam a avaliação de parâmetros tais como: **1)** integridade morfológica dos folículos ovarianos, caracterizada pela normalidade do citoplasma, núcleo, membrana basal, organização das células da granulosa ao redor do oócito (ABDI, *et al* 2014; SMITZ *et al.*, 2010); **2)** desenvolvimento folicular (avaliado pela proliferação das células da granulosa e aumento no tamanho do folículo, bem como do oócito) e **3)** densidade de células do estroma por área (MBEMYA *et al.*, 2017).

Quando um dos fatores a serem controlados durante um procedimento de criopreservação é a geração de EROs, diferentes sondas têm sido utilizadas para avaliar esse parâmetro. Essas sondas são capazes de avaliar as alterações no sistema de defesa antioxidante, as quais culminam na produção e acúmulo de EROs (CHEN *et al.*, 2017). Além disso, alguns trabalhos têm mostrado que o processo de criopreservação pode causar danos às mitocôndrias (FABBRI *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016; TRAPPHOF *et al.*, 2016), principais organelas celulares implicadas no fornecimento de energia e outras funções como a homeostase. Danos nessas organelas resultam em alterações no status energético mitocondrial, o qual pode ser verificado com o uso do fluoróforo MitoTracker® Orange CMTMRo.

A mitoTracker consiste em uma sonda que se difunde através da membrana de células metabolicamente ativas (BUCKMAN *et al.*, 2001; BERREIDGE *et al.*, 2017). Ao entrar nas células, esta sonda é oxidada e posteriormente absorvida pelas mitocôndrias. Dentro dessas organelas, os grupamentos clorometil da Mitotracker reagem covalentemente com tióis presentes em peptídeos e proteínas formando conjugados fluorescentes de aldeído-fixável (AGNELLO *et al.*, 2008). Esses conjugados permanecem mesmo após a morte ou fixação das células (CHAZZOTE *et al.*, 2011) e podem ser visualizados e avaliados por microscopia confocal.

Muito embora as mitocôndrias sejam as principais fontes de EROs, apenas o monitoramento da atividade mitocondrial não é suficiente para prever a produção dessas



moléculas em um sistema biológico, por isso a análise dos níveis dessas substâncias se torna complementar. Existem vários ensaios bioquímicos que são utilizados para mensurar os níveis de EROs intracelulares, dentre os quais, o ensaio fluororimétrico da sonda diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) é um método bem difundido e aceito e, tem sido utilizado em diferentes estudos (CORREIA *et al.*, 2017; AGUIAR *et al.*, 2016; PAES *et al.*, 2016). O DCFH-DA é um composto polar não iônico que ao penetrar nas membranas celulares interage com esterases celulares, tornando-o em diclorofluoresceína hidrolisada (DCFH). A DCFH, não fluorescente, ao ser oxidado por EROs intracelulares é transformada em diclorofluoresceína (DCF) fluorescente, que pode ser visualizada microscopicamente, ao sofrer excitação (MENG *et al.*, 2017).

Outro ensaio de grande importância é a avaliação da capacidade antioxidante total do sistema, que dentre outras formas pode ser realizada pela análise do poder antioxidante de redução do ferro, comumente conhecido como FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*). O teste de FRAP se baseia na capacidade de o antioxidante produzir  $\text{Fe}^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  presente no complexo 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina, conhecido também como TPTZ (JONES *et al.*, 2017). Desta forma, esse ensaio é um indicador do efeito protetor dos antioxidantes presentes em um sistema biológico (BORZEI *et al.*, 2017).

Por fim, a incubação ou o cultivo *in vitro* do tecido ovariano é um método bastante relevante e eficiente para verificar a viabilidade folicular (KLOCKE *et al.*, 2014). Embora, quando realizado a longo prazo, possibilite o crescimento e desenvolvimento de ambos, folículo e oócito, a curto prazo (24h), permite que o tecido ovariano retorne a sua atividade metabólica e até mesmo possa superar alguns danos leves, sofridos durante o processo de criopreservação (KIM *et al.*, 2017).

### 3. JUSTIFICATIVA

A incidência de câncer tem se tornado crescente em todo mundo. De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC) foram registrados 14,1 milhões de novos casos de câncer só no ano de 2012, com uma projeção de que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos. Proporcionalmente ao aumento da incidência de câncer, têm sido observados avanços no tratamento dessa doença, seja com o uso da radioterapia e/ou com a quimioterapia. Entretanto, esses tratamentos comprometem a função reprodutiva feminina, levando à necessidade de intervenções tecnológicas para a preservação da fertilidade dessas pacientes, sobretudo de mulheres jovens em idade reprodutiva, que ainda não construíram suas famílias e desejam engravidar. Ademais, o desenvolvimento dessas tecnologias também é importante para a preservação do potencial reprodutivo de animais, notadamente as espécies raras, ameaçadas de extinção ou animais de alto valor zootécnico.

Embora, ainda necessite de ajustes nos protocolos já empregados, um dos métodos para a CTO, isto é, a vitrificação, vem ganhando grande destaque na comunidade científica. Um dos motivos é que a vitrificação previne a formação de cristais de gelo, um dos fatores mais preocupantes no processo de criopreservação de um material biológico, o qual é comumente observado quando se usa a congelação lenta. Apesar da vitrificação anular ou minimizar a cristalização de gelo intracelular, um problema ainda enfrentado e que deve ser controlado é a produção excessiva de EROs, as quais são provenientes das altas concentrações dos agentes crioprotetores. Considerando que as altas concentrações de crioprotetores no processo de vitrificação são absolutamente necessárias, uma solução sugerida para minimizar os efeitos causados pelo excesso de EROs é a adição de antioxidante nas soluções de vitrificação.

Dentre os antioxidantes disponíveis, podemos destacar aqueles obtidos comercialmente, como a catalase e o ácido alpha lipóico, os quais já foram utilizados nos meios de criopreservação e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos (CARVALHO *et al.*, 2014) e murinos (HATAMI *et al.*, 2014), respectivamente. Antioxidantes naturais, porém, obtidos sinteticamente, como é o caso do *anetol* já foi utilizado no meio de cultivo *in vitro* desses folículos, nas espécies, caprina (SÁ *et al.*, 2017) e ovina (MBEMYA *et al.*, 2017). Entretanto, antioxidantes totalmente naturais como é o caso da *robinina* ainda não foram empregados visando o sucesso da manipulação de folículos pré-antrais *in vitro*, seja durante o processo de vitrificação ou cultivo *in vitro*. Estudos anteriores demonstraram que ambos os antioxidantes (*anetol* e *robinina*) aumentam a atividade da CAT e da SOD, reduzindo a peroxidação lipídica (MANSUY *et al.*, 1986; PARDO- ABREU *et al.*, 2008; JANEESH E ABRAHAM, 2014;

DONGARE., 2016). Desta forma, a utilização desses antioxidantes poderá melhorar os resultados obtidos com a vitrificação do tecido ovariano.

Esse estudo foi realizado na espécie ovina por duas razões. Primeiro, vislumbrando contribuir com o avanço da CTO humano. Desta forma, considerando as questões éticas, bem como a baixa disponibilidade de material humano e a similaridade do ovário (tamanho, consistência) e duração do processo de foliculogênese da ovelha à espécie humana, acredita-se que a ovelha seja um excelente modelo experimental para a espécie humana. Segundo, os resultados obtidos também poderão ser de extrema relevância para a própria espécie ovina ou outras espécies, visando a preservação do material genético de animais e/ou raças de grande valor genético ou em risco de extinção.

#### **4. HIPÓTESE CIENTIFICA**

A adição de anetol ou robinina na solução de vitrificação e/ou no meio de incubação *in vitro* do tecido ovariano ovino pode reduzir a geração de EROs, e conseqüentemente, minimizar os danos causados por essas moléculas nos folículos pré-antrais, manipulados *in vitro*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Geral

- Avaliar o efeito da adição do anetol (AN) ou da robinina (RO) na solução de vitrificação e acrescidos ou não no meio de incubação *in vitro* de tecido ovariano ovino

### 5.2 Específicos

- Avaliar a morfologia de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano vitrificado na ausência ou presença de AN ou RO, seguido de incubação *in vitro*;
- Avaliar no tecido ovariano previamente vitrificado com AN ou RO, a incubação *in vitro*, na ausência ou presença desses antioxidantes, os seguintes parâmetros:
  - 1) Ativação folicular;
  - 2) Densidade das células do estroma;
  - 3) Níveis de EROs no meio de incubação e no tecido ovariano;
  - 4) Capacidade antioxidante total e
  - 5) Atividade mitocondrial

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Obtenção de material biológico e processamento

Todo o experimento foi realizado respeitando os princípios éticos de bem-estar animal, sendo o projeto aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará sob o número (N°5586150/2016). Quatorze (foram obtidos em abatedouro local a partir de ovelhas adulta sem raça definida. Após a obtenção dos mesmos, estes foram lavados, brevemente, uma vez em álcool 70%, seguido por duas vezes em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de HEPES (solução tampão) e antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/L de estreptomicina). Para o transporte até o laboratório os ovários foram imersos em MEM-HEPES e guardados em caixas térmicas a 20°C, tendo o transporte sido realizado no período de 1 hora (CARVALHO *et al.*, 2014).

No laboratório, os ovários foram limpos e o tecido gorduroso retirado, após isso os ovários foram divididos em pequenos fragmentos (1 × 1 × 0,5 mm) utilizando o TissueSlicer (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, EUA). Os fragmentos foram posteriormente armazenados em placa de Petri contendo MEM-HEPES e antibióticos (100 µg/L de penicilina e 100 µg/L de estreptomicina) (CARVALHO *et al.*, 2014) até o momento do procedimento de vitrificação, o qual ocorreu imediatamente.

### 6.2 Desenho experimental

#### **6.2.1 Etapa 1: Morfologia de folículos pré-antrais vitrificados em diferentes concentrações de anetol (AN) ou Robinina (RO)**

Dezoito fragmentos obtidos a partir de cada par de ovário (n=18), foram aleatoriamente distribuídos em diferente tratamentos: controle fresco (CTR), incubado (IIV), e nos grupos vitrificados sem antioxidantes (VSA) ou vitrificado em diferentes concentrações do NA [30 µg /mL (AN30), 300 µg /mL (AN300) e 2000 µg /mL (AN2000)] ou RO [0,5 mg /mL (ROB 0.5), 0,25 mg /mL (ROB0.25) e 0,125 mg /mL (ROB0.125) ]. Com exceção do controle fresco, todos os fragmentos a partir de todos os tratamentos (IIV, VSA, AN30, AN300, AN2000, ROB0.5, ROB0.25 and ROB0.125) foram submetidos a incubação de 24 h. Os fragmentos frescos e todos os outros, após a incubação, foram submetidos a análises histológicas.

### **6.2.2 Etapa 2: Análises histológicas e bioquímicas após a vitrificação e/ou incubação de tecido ovariano**

Baseado nos melhores tratamentos (alta percentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais) obtidos na etapa 1, apenas as seguintes condições foram realizadas novamente CTR, IIV, VSA e vitrificação na presença de AN 2000 µg/mL e RO 0.125 mg/mL. Após o aquecimento, os fragmentos vitrificados com antioxidantes foram incubados por 24 horas na ausência ou presença (+) do mesmo tipo e concentração de antioxidante. Os fragmentos de todos os sete tratamentos foram destinados: a avaliação da ativação folicular, densidade de células do estroma, níveis de EROs nos tecidos ovarianos e meio de incubação, capacidade antioxidante total pelo método de FRAP (*Ferro Reducing Antioxidant Power*), atividade mitocondrial e níveis intracelulares de EROs com uso das sondas mitoTracker e DFCH-DA, respectivamente.

### **6.3 Vitrificação**

Para o procedimento de vitrificação, os fragmentos de tecido ovariano foram expostos às soluções de vitrificação dentro do dispositivo *Ovarian Tissue Crysystem* (OTC) sendo primeiramente expostos por 4 minutos à solução de vitrificação 1 (SV1), composta de Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 10% de etilenoglicol (EG) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), podendo ou não ser acrescida de antioxidante. A solução de vitrificação 2 (SV2) teve uma composição semelhante a SV1, contudo a concentração dos agentes crioprotetores foi de 20%.

Após a exposição com os agentes crioprotetores, a solução de vitrificação foi removida e o OTC contendo o tecido ovariano foi fechado e imerso em nitrogênio líquido (~160°C) por um período de 7 dias. Após este período, os OTCs foram retirados do nitrogênio e aquecidos à temperatura ambiente (~25 °C) por 1 minuto e, em seguida, imersos em banho-maria (37 °C) por 30 segundos. Na sequência, os fragmentos foram lavados por 5 minutos em três diferentes soluções de aquecimento (SA), sendo as mesmas compostas por MEM-HEPES (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) acrescido de 3 mg/ml de BSA e concentrações decrescentes de SAC (0,5, 0,25 e 0M). Para uma melhor retomada do metabolismo dos fragmentos ovariano, estes foram incubados por 24 horas (PAYNTER *et al.*, 1999).

#### 6.4 Incubação *in vitro*

Com exceção do tecido fresco (controle), todos os fragmentos foram submetidos a incubação. Para isso, os fragmentos foram colocados individualmente em placas de 24 poços, por um período de 24 horas. Os fragmentos foram cultivados em um 1 mL de meio de cultivo  $\alpha$ -MEM, suplementado com ITS(10  $\mu$ g/ml insulina, 5,5  $\mu$ g/ml transferrina; 5 ng/ml selênio), Glutamina(2 mM), Hipoxantina(2 mM), BSA– Albumina sérica bovina (3 mg/ml), Ácido ascórbico (50 $\mu$ g/mL), LIF - fator inibidor de leucemia (50ng/mL), KL - Kit Ligant (50ng/mL), FSH – Hormônio Folículo Estimulante (ng/mL) (LUNARDI *et al.*, 2016). A incubação foi realizada em estufa a 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

#### 6.5 Avaliação morfológica dos folículos pré-antrais por histologia clássica

Para avaliações histológicas, os fragmentos de todos os tratamentos foram fixados em 4% de paraformaldeído em PBS durante 2 horas (etapa 1), e em Carnoy por 4 horas (etapa 2). Subsequentemente as amostras foram desidratadas numa série gradual de etanol, clarificados com xilol, embebidos em cera de parafina e seccionados em 7  $\mu$ m de espessura. Os cortes foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS) - hematoxilina. Para avaliação morfológica, as lâminas foram examinadas em um microscópio (Nikon, Japão) com uma ampliação de 400 X, e os folículos classificados de acordo com a integridade e estágio de desenvolvimento.

De acordo com a integridade os folículos foram classificados como *folículos pré-antrais morfolologicamente normais* (FPMN) ou como *folículos pré-antrais morfolologicamente degenerados* (FPMD), Em termos de estágio de desenvolvimento, os folículos foram classificados como *quiescentes* ou *primordiais* (uma camada de células da granulosa achatadas em torno do oócito) e como *folículos ativados* (transição: uma camada de células da granulosa achatada com algumas cubóides; primário: uma camada completa de células da granulosa cubóides; e secundário: duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides em todo o oócito-SILVA *et al.*, 2004)

#### 6.6 Densidade de células do estroma

Na etapa 2, a densidade de células do estroma foi avaliada pela contagem de células do estroma por 100  $\mu$ m<sup>2</sup>. Para cada tratamento, dez campos por lâmina foram avaliados, resultando em um total de 40 campos, o número médio das células estromais foi calculado em cada campo



(CARVALHO *et al.* 2014). Todas as avaliações e medições foram realizadas por um único operador.

### **6.7 Determinação de EROs**

Os níveis de EROS foram avaliados nos fragmentos ovarianos e no meio de incubação utilizando o ensaio do 2', 7'-diidrodiclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, D6883, Sigma-Aldrich). Para mensurar os níveis de EROs nos fragmentos estes foram primeiramente macerados em tampão Tris-HCL ETDA, e em seguida centrifugados, o sobrenadante obtido (homogenato), foi destinado a análise. Para a avaliação meio incubação foi realizado uma alíquota de cada amostra coletada a qual foi destinada a análise. O ensaio foi realizado através da incubação de 50 µl do homogenato e da alíquota do meio, com 5 µl de DCFH-DA (1 mM) à temperatura ambiente. A oxidação de DCHF-DA a diclorofluoresceína fluorescente foi medida para a detecção de EROs. A emissão de intensidade de fluorescência de 2', 7'-diclorofluorescina (DCF) foi registrada a 520 nm (com excitação de 480 nm) 2 horas após a adição de DCFH-DA ao meio, usando espectrofluorômetro (modelo Shimadzu RF-5301PC, Tóquio, Japão)

### **6.8 Atividade mitocondrial e níveis intracelulares de EROs**

Para avaliação da atividade mitocondrial e níveis intracelulares de EROS, os tecidos ovarianos dos grupos CTR, IIV e vitrificados (CTR, AN2000, ROB0.125) 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<sub>2</sub> para detectar e localizar mitocôndrias ativas, em seguida o mesmo tecido foi incubado durante 15 minutos em 999 µL de PBS com 1 µL de DCF para detectar e localizar fontes intracelulares de EROs. Depois disso o material foi fixado 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 tissue 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 confocal de varredura a laser (LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para avaliar a intensidade de fluorescência foi utilizado software Zen lite 2.3 SP1.

## 6.9 Potencial antioxidante de redução férrica (FRAP)

A atividade antioxidante total nos fragmentos foi avaliada por meio do ensaio de FRAP com pequenas modificações (BENZIE E STRAIN, 1996). A capacidade antioxidante foi determinada como o "potencial antioxidante de redução férrica", onde os antioxidantes presentes no tecido foram avaliados como redutores de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , que é quelado por 2,4,6-tri-(2-piridil) S-triazina (TPTZ) para formar o complexo  $Fe^{2+}$ -TPTZ, avaliado utilizando a absorção máxima a 593 nm. Uma curva padrão de ácido ascórbico foi realizada, e os resultados foram expressos como o equivalente a microgramas de ácido ascórbico.

## 6.10 Análise estatística

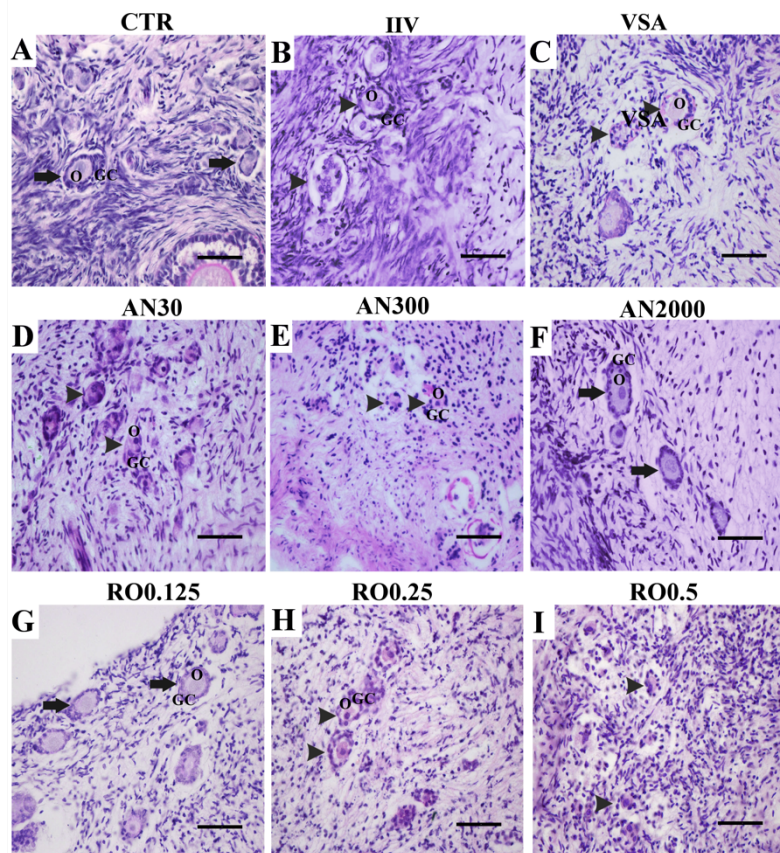
Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para confirmação de atendimento dos requerimentos para realização da análise de variância (ANOVA). Confirmados tais requerimentos, a ANOVA foi executada por meio do PROC GLM do Programa SAS (2002). As comparações entre os tratamentos experimentais e cada um dos grupos controle de referência foram feitas pelo teste de Dunnett, enquanto as comparações múltiplas entre os tratamentos experimentais foram feitas aplicando-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  e os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou média  $\pm$  erro padrão.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Etapa I- Morfologia folicular

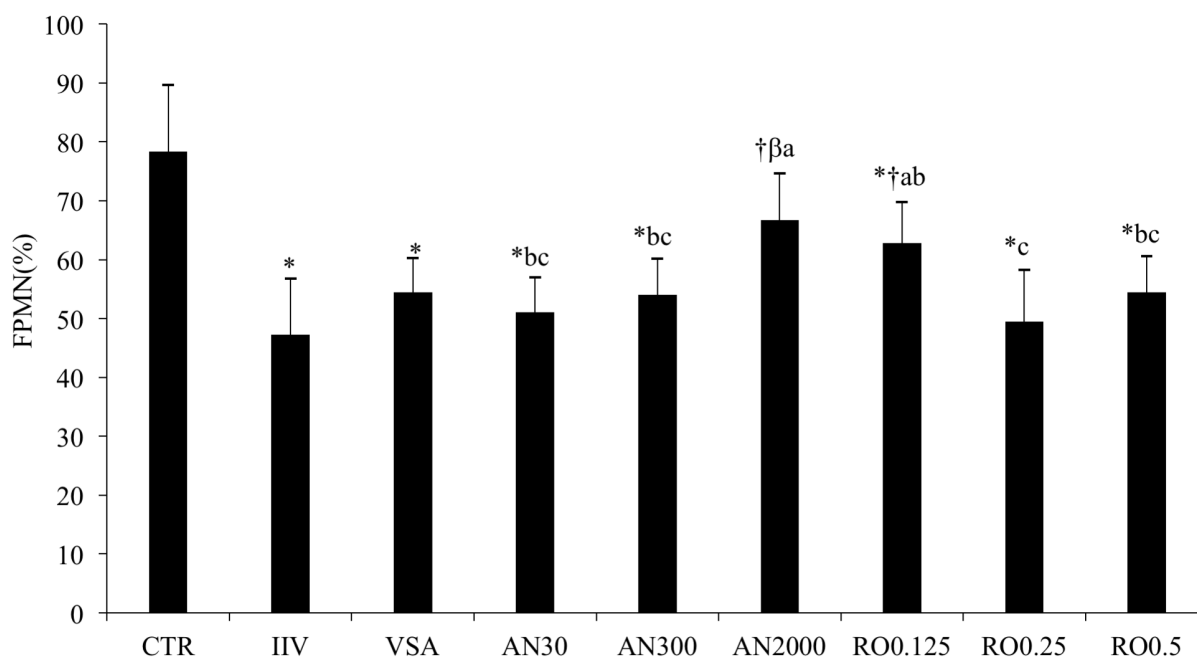
Um total de 1.620 folículos pré-antrais (180 folículos/tratamento) foram avaliados. A figura 6 demonstra que ambos os FPMN e FPMD foram encontrados em todos os tratamentos. Os dados da figura 7 mostram que quando a solução de vitrificação foi suplementada com AN2000, a porcentagem de FPMN foi similar ( $p < 0,05$ ) ao controle e a RO0.125. Por outro lado, o AN2000 foi superior ( $p < 0,05$ ) ao IIV e VSA. Com base nesses achados, as concentrações de 2000  $\mu\text{g/mL}$  de AN e 0.125  $\text{mg/mL}$  de RO foram utilizadas na etapa 2.

**Figure 6.** Imagens representativas da morfologia dos folículos pré-antrais ovinos, após coloração com ácido periódico Schiff-hematoxilina. FPMN são mostrados no controle (A), IIV (B), AN2000 (F) e RO0.125 (G), enquanto que FPMD são representados em VSA (C), AN30 (D), AN300 (E), RO0.25 (H) e RO0.50 (I). O: oócito; Cg: células da granulosa; (400 x). Setas indicam folículos normais; cabeças de setas indicam folículos degenerados. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .



Fonte: dados da pesquisa

**Figure 7.** Percentagem (média±DP) de FPMN no tecido ovariano fresco (controle), após incubação, vitrificação sem ou com antioxidantes(AN ou RO), seguida de incubação por 24 h. \*Diferem do CTR, †Diferem do IIV, βDiferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação(P <0,05).



Fonte: dados da pesquisa

## 7.2 Etapa 2- Análises histológica e bioquímicas

### 7.2.1 Ativação folicular

Com relação à ativação folicular, podemos observar que o percentual de folículos ativados em todos os tratamentos foi superior ( $p < 0,05$ ) ao controle, além disso observou-se ainda que o percentual de folículos ativados in RO0.125<sup>†</sup> foi inferior ao VSA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentagem de ativação folicular e densidade de células do estroma (células/ $100\mu\text{m}^2$ ) em tecido ovariano fresco (controle), após a incubação, vitrificação sem ou com antioxidantes (AN e RO), seguido de incubação (24 h) sem ou com antioxidantes(AN ou RO).

<b>Tratamentos</b>	<b>Ativação folicular (% de folículos em desenvolvimento)</b>	<b>Densidade de células do estroma (células/100 <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
Control	13,33 $\pm$ 6,67	177,4 $\pm$ 3,8
IIV	56,67 $\pm$ 3,3 <sup>*</sup>	151,3 $\pm$ 2,7 <sup>*<math>\beta</math></sup>
VSA	61,67 $\pm$ 5,77 <sup>*</sup>	136 $\pm$ 3,6 <sup>*<math>\dagger</math></sup>
AN2000	61,67 $\pm$ 5,78 <sup>*a</sup>	161,3 $\pm$ 3,2 <sup>*<math>\dagger</math><math>\beta</math>a</sup>
RO0.125	52,22 $\pm$ 3,85 <sup>*a</sup>	147,3 $\pm$ 3,5 <sup>*<math>\beta</math>b</sup>
AN2000 <sup>+</sup>	56,66 $\pm$ 5,77 <sup>*a</sup>	134,2 $\pm$ 1,6 <sup>*<math>\dagger</math>c</sup>
RO0.125 <sup>+</sup>	45,56 $\pm$ 12,62 <sup>*<math>\beta</math>a</sup>	141,0 $\pm$ 2,3 <sup>*<math>\dagger</math>b</sup>

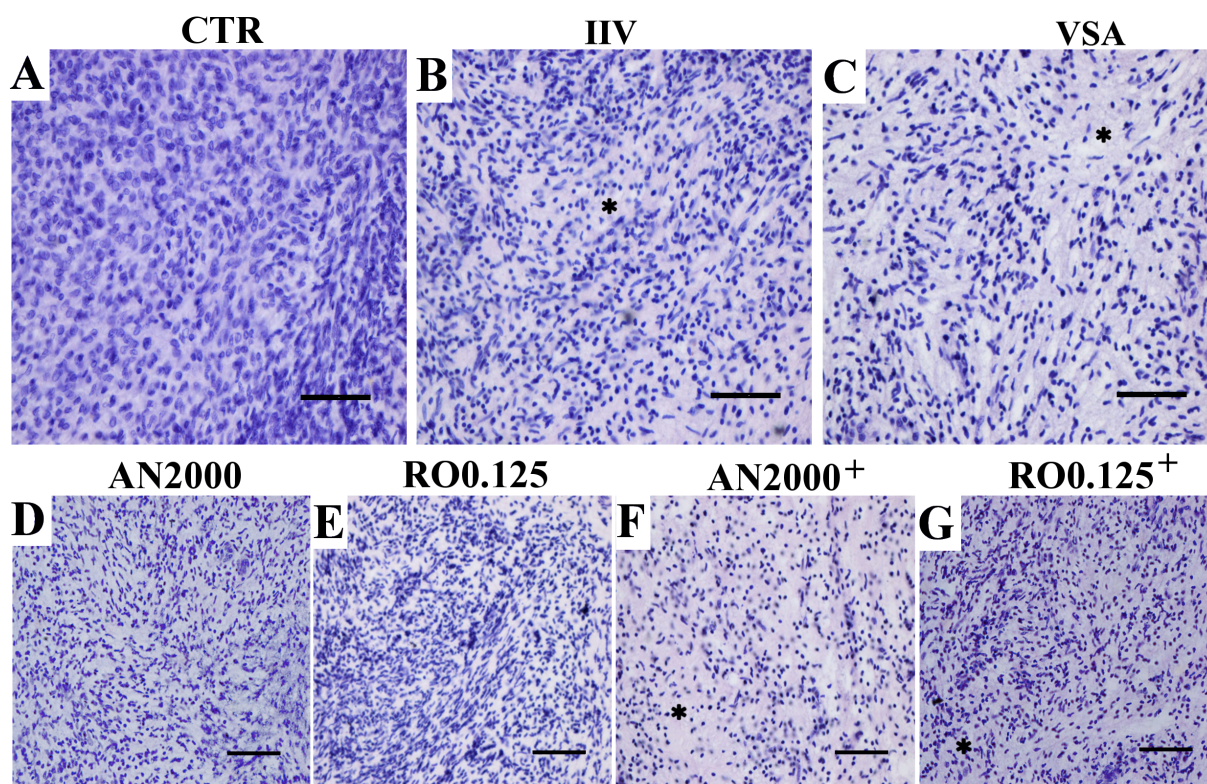
\*Diferem do CTR, <sup>†</sup>Diferem do IIV,  <sup>$\beta$</sup> Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação (P < 0,05).

### 7.2.2 Densidade das células do estroma

A densidade das células do estroma (tabela 1) reduziu significativamente em todos os fragmentos ovarianos previamente vitrificados, comparados ao controle. Entretanto, a adição de antioxidantes somente na solução de vitrificação promoveu maior (p < 0,05) preservação de células do estroma quando comparado ao tecido ovariano vitrificado na ausência desses compostos (VSA). Além disso, a densidade de células do estroma ovariano nos tratamentos RO0.125 e AN2000 foi, respectivamente similar (p < 0,05) e superior (p < 0,05), à observada no tecido ovariano apenas incubado (IIV). Imagens das células do estroma podem ser observadas na figura 8.

**Figura 8.** Imagens representativas do estroma ovariano ovino (A) Controle, (B) IIV, (C) VSA,

(D) AN2000, (E) RO0.125, (F) AN2000<sup>+</sup>, (G) RO0.125<sup>+</sup>. Barra de escala 50  $\mu$ m. \* indica perda de células estromais

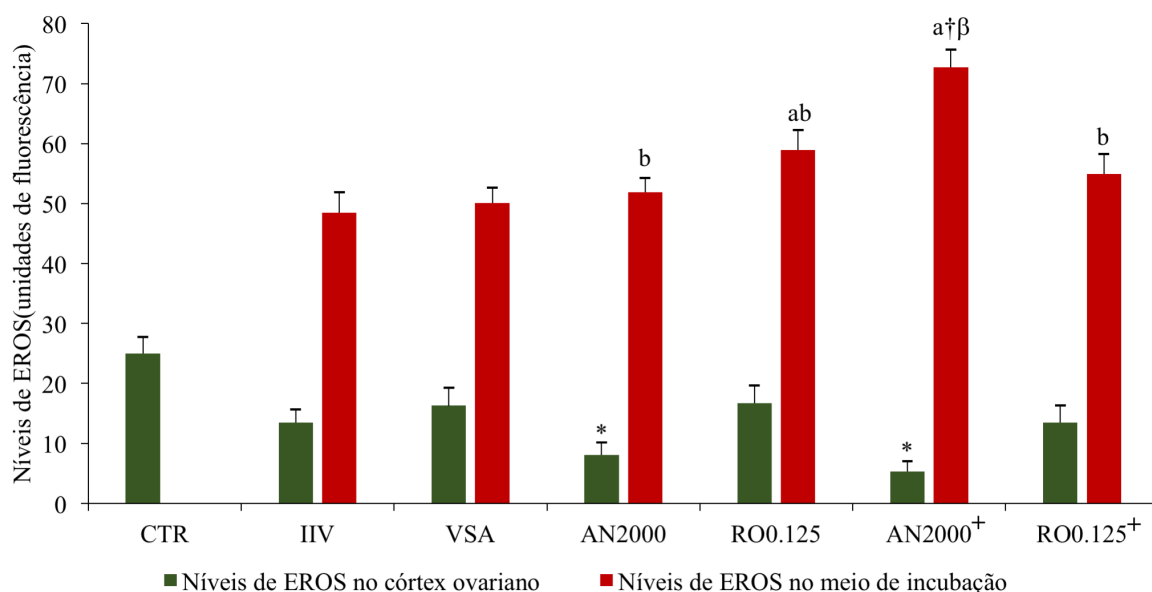


Fonte: dados da pesquisa

### 7.2.3 Níveis de EROs no meio de incubação e nos fragmentos ovarianos

A figura 9 mostra que no córtex ovariano, o níveis de EROs no AN2000 e AN2000<sup>+</sup> foram inferiores ( $p < 0,05$ ) aos observados no controle. No entanto, entre os fragmentos vitrificados e incubados *in vitro* na presença de antioxidantes não foram observadas diferenças significativas. Já a análise do meio de incubação, revelou que os níveis de EROs no tratamento AN2000<sup>+</sup> foi superior ( $p < 0,05$ ) aquele encontrado para os tratamentos VSA, IIV, AN2000 e RO0.125<sup>+</sup>

**Figure 9.** Níveis de EROs (MÉDIA  $\pm$ EP) em unidades de fluorescências relativas produzidas no córtex ovariano fresco e no meio de incubação, nos diferentes tratamento após incubação, vitrificação sem ou com antioxidantes (AN ou RO), seguida de incubação por 24 h. \* Diferem do CTR, <sup>†</sup>Diferem do IIV, <sup>β</sup>Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação ( $P < 0,05$ ).

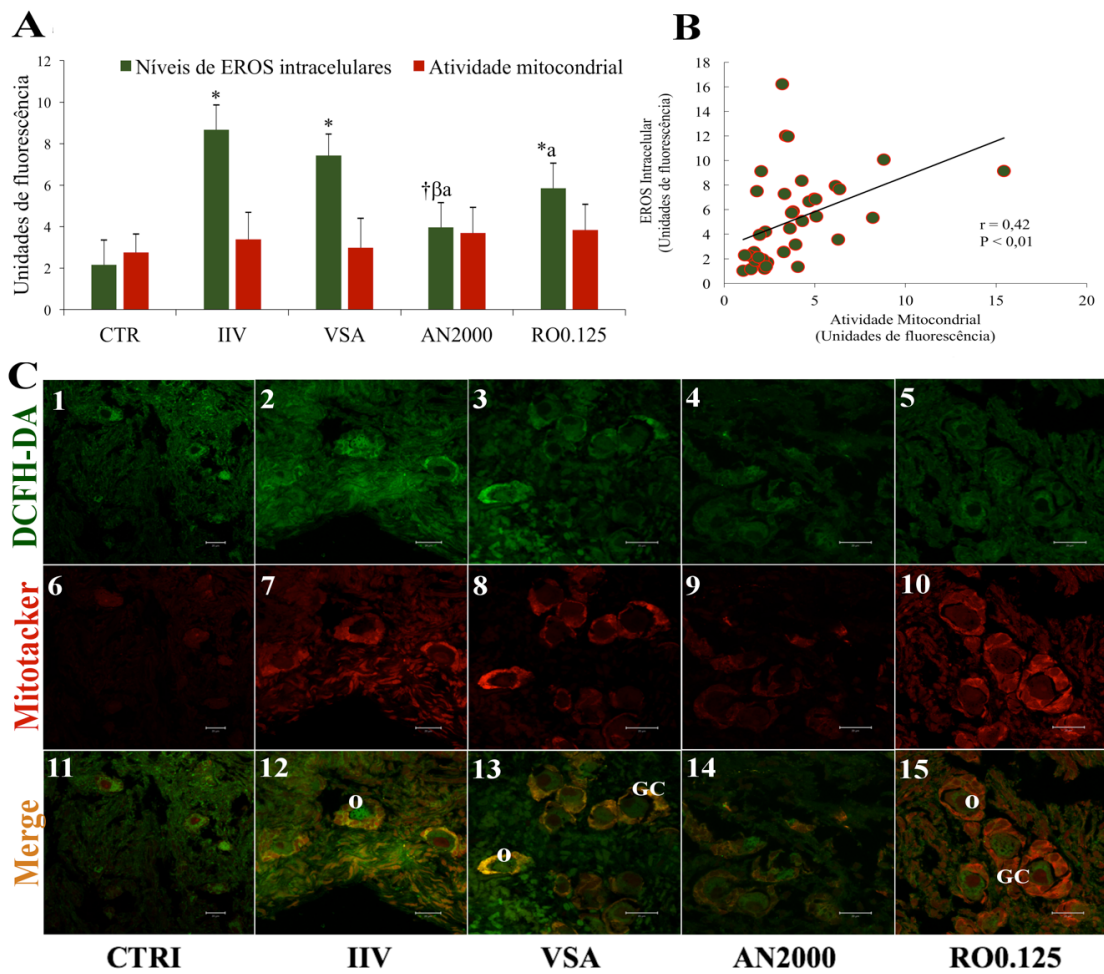


Fonte: dados da pesquisa

#### 7.2.4 Níveis intracelulares de EROs Atividade mitocondrial

Os dados (Fig. 10) mostraram que nos tratamentos IIV, VSA e RO0.125, os níveis intracelulares de EROs analisados pela intensidade de fluorescência da sonda DCFH-DA foi significativamente superior ao controle, enquanto que no AN2000, foi igual ao CTR e significativamente inferior à VSA. Com relação a atividade mitocondrial analisados pela intensidade de fluorescência da sonda Mitrotracker, nenhuma diferença significativa foi observada entre os diferentes tratamentos (Fig.10). Adicionalmente, foi observada uma correlação linear positiva entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de EROs (Fig.10). Imagens representativas podem ser observadas na figura 5.

**Figure 10.** (A) Quantificação dos níveis de EROs intracelulares e atividade mitocondrial (B) Correlação entre a atividade mitocondrial e os níveis intracelulares de EROs. Cada ponto do gráfico representa uma amostra de tecido ovariano,  $r = 0,42$ ;  $P = 0,001$ . (C) Imagens representativas dos níveis de EROs intracelular representado pela intensidade fluorescência do DCFH-DA (1-5), atividade mitocondrial representada pela intensidade de fluorescência do Mitotracker (6-10), e sobreposição das duas sondas (11-15) nos diferentes tratamentos (Controle, IIV, VSA, AN2000 e RO0.125). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .



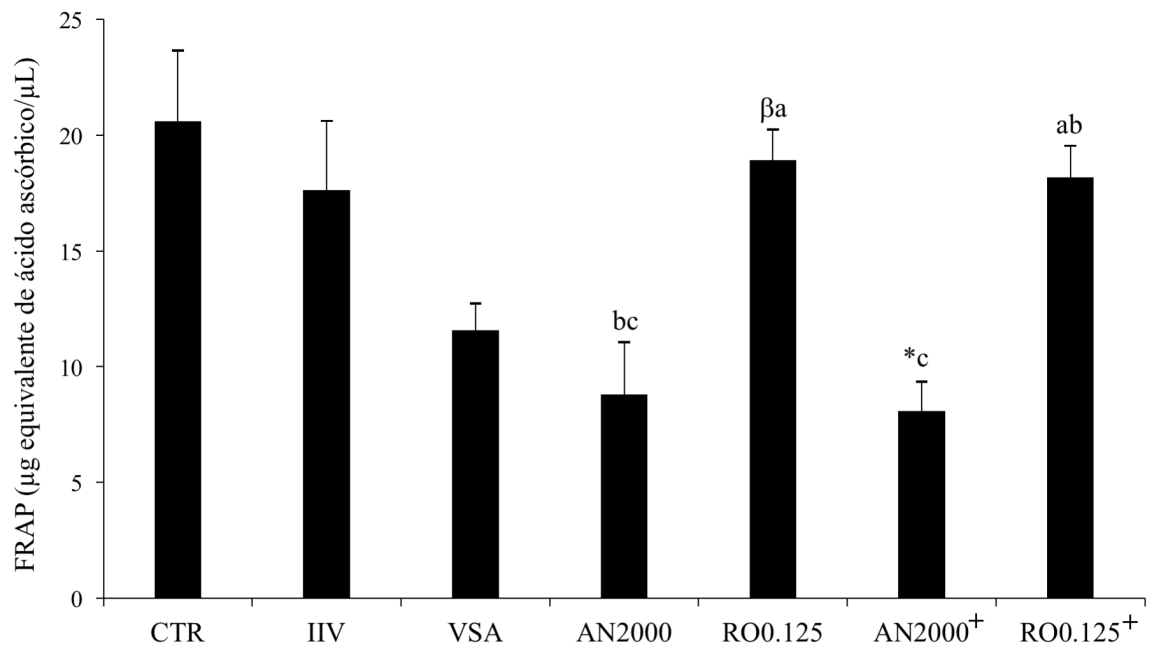
Fonte: dados da pesquisa

### 7.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante total

Os fragmentos ovarianos oriundos de todos os tratamentos (CTR, IIV, VSA, AN2000, RO0.125, AN2000<sup>+</sup> e RO0.125<sup>+</sup>) foram submetidos à análise de FRAP para verificar a capacidade antioxidante total (CAT) demonstrada na Figure 11. Os valores de FRAP revelaram que a CAT no tratamento RO0.125 foi superior aos seguintes tratamentos: VSA, AN2000 e AN2000<sup>+</sup>. Além disso, a CAT no AN2000<sup>+</sup> foi inferior ( $p < 0,05$ ) ao controle.

**Figure 11.** Capacidade antioxidante total mensurada pela análise de FRAP <sup>\*</sup>Diferem do CTR, <sup>†</sup>Diferem do IIV, <sup>β</sup>Diferem do VSA, <sup>a,b,c</sup> letras minúsculas indicam diferença entre tratamentos no meio de incubação ( $P < 0,05$ ).





Fonte: dados da pesquisa

## 8. DISCUSSÃO

Apesar do sucesso já obtido com a CTO na medicina reprodutiva (KAWAMURA et al 2013, SILBER et al., 2015), esta ainda é considerada experimental (SON et al., 2017). Dentre os fatores limitantes para esta técnica, cabe destacar o estresse oxidativo, a qual pode levar à alteração estruturais e morfológicas (CARVALHO et al., 2014; LUZ et al., 2011) culminado, com a morte do folículo ovariano (ISACHENKO et al. , 2015). Portanto, o uso de antioxidantes é necessário para conter a produção de EROs (TATONE et al 2010, SILVA et al., 2011). Até o momento, os esforços atuais na melhoria do CTO, em parte, se concentram na adição de antioxidantes na solução de vitrificação (CARVALHO et al., 2014, GERAVANDI et al., 2017). Os antioxidantes são conhecidos por diminuir o nível de EROs produzidos em excesso durante a vitrificação e, conseqüentemente, reduzir os danos celulares (HATAMI et al., 2014; HEMADI et al., 2009). Desse modo, no presente estudo, investigamos o efeito de diferentes concentrações de anetol ou robinina na solução de vitrificação de folículos pré-antrais ovinos inclusos no tecido ovariano (etapa 1), além disso, avaliamos o efeito de adição desses antioxidantes nos meios de vitrificação e incubação (etapa 2).

Entretanto, apesar de alguns estudos mostrarem que a percentagem de FPMN normalmente se reduz após o processo de criopreservação (TING et al., 2013; SANFILIPPO et al., 2015; Lunardi et al., 2012), nossos resultados mostraram, de forma bem interessante, que o antioxidante Anetol permitiu a preservação estrutural do tecido. Corroborando, dessa forma, com Melo et al. (2011), que demonstrou que a adição do antioxidante ácido ascórbico (50µg/mL) na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino também foi capaz de manter a morfologia de folículos pré-antrais semelhantes a folículos frescos. Acreditamos que a manutenção da morfologia no tratamento AN2000 deve-se as suas características estruturais, a qual apresenta uma molécula pequena e lipofílica capaz de atravessar a membrana plasmática e reduzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GALICKA et al., 2014), diminuindo, assim, os níveis de EROs e, conseqüentemente, protegendo a membrana celular contra o dano oxidativo (KAYANOKI et al., 1996).

No que diz respeito à ativação folicular, após a vitrificação e incubação *in vitro*, observamos uma redução na porcentagem de folículos primordiais em todos os tratamentos com concomitante aumento dos folículos de desenvolvimento (transição, primário e secundário) em comparação com o controle. A ativação folicular é um processo extremamente comum durante incubação *in vitro* de tecidos ovarianos frescos (GOMES *et al.*, 2015; PAES *et al.*, 2016) ou vitrificados / aquecidos (SILVA *et al.*, 2017). Este fenômeno pode ser devido aos efeitos de hormônios e fatores de crescimento normalmente presentes na composição do meio

de incubação. Neste trabalho, utilizamos o FSH e os fatores de crescimento, LIF e KL, uma vez que na literatura essas substâncias têm sido relatadas por desempenharem um papel proeminente na foliculogênese, estimulando a ativação folicular (REDDY *et al.*, 2005; NILSSON *et al.*, 2002), desenvolvimento de folículos pré-antrais (LUZ *et al.*, 2012; ROSSETO *et al.*, 2016) e sobrevivência folicular (CARLSSON *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2016).

No que se refere à densidade das células estromais do tecido ovariano, foi observado, no presente trabalho, que, em todos os grupos, este parâmetro reduziu significativamente em comparação com o controle. Resultados semelhantes foram relatados em tecido ovariano caprino (FAUSTINO *et al.*, 2010) e equino (GASTAL *et al.*, 2017), criopreservados. Acreditamos que isso pode ser devido à toxicidade de agentes crioprotetores e ao estresse osmótico, pois os agentes crioprotetores penetrantes, tais como EG e DMSO, interagem com células do ovário causando uma desidratação excessiva durante o processo de vitrificação (MARSELLA *et al.*, 2008; KEROS *et al.*, 2009). Curiosamente, a adição de antioxidantes (AN2000 e RO0.125) na solução de vitrificação mostrou uma alta porcentagem de densidade celular em comparação com VSA. Nossos achados confirmam claramente que a adição do anetol na solução de vitrificação possibilitou não apenas a preservação dos folículos, como também das células estromais.

Além disso, nos tratamentos AN2000 e AN2000<sup>+</sup> os níveis de EROs reduziram no tecido ovariano em comparação com o controle. Estes resultados podem ser explicados pelas características estruturais e funcionais do anetol, como mencionado anteriormente. Assim como também, pela capacidade desse antioxidante de inibir a peroxidação lipídica e induzir a síntese de catalase, superóxido dismutase (DONGARE *et al.*, 2012) e glutatona peroxidase (CHAINY *et al.*, 2000), as quais reduzem os níveis de EROs. Resultados semelhantes foram obtidos após a adição de catalase na solução de vitrificação do tecido ovino (CARVALHO *et al.*, 2014). Por outro lado, a adição de anetol nas soluções de vitrificação e na incubação aumentou o nível de EROs no meio de incubação. Na verdade, compostos antioxidantes em alta concentração podem ser convertidos em compostos pró-oxidantes. Vários autores relataram que os antioxidantes poderiam ter ação oxidativa dependendo da concentração (SADEGHIPOUR *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2011; SUCCU *et al.*, 2014).

Com relação ao EROs intracelular, a análise de microscopia confocal mostrou maior intensidade de fluorescência nos tratamentos IIV, VSA e RO0.125 em comparação com o controle. Isso ocorre porque o processo de vitrificação aumentou o nível de EROs (HATAMI *et al.*, 2014; WEI *et al.*, 2016). Além disso, em AN2000 este parâmetro foi semelhante ao controle e menor do que o VSA. Este resultado suporta as propriedades antioxidantes do anetol como

mencionado anteriormente. Em contrapartida, a intensidade de fluorescência para a atividade mitocondrial não mostrou alteração entre todos tratamentos. Resultados semelhantes foram obtidos após a vitrificação de oócitos MII (Nohales-Córcoles *et al.*, 2016) e embriões (MARTINO *et al.*, 2016). Adicionalmente, observou-se uma relação positiva entre a atividade mitocondrial e a produção de EROs, indicando que o protocolo de vitrificação (ovarian tissue cryosystem- OTC) desenvolvido por Carvalho *et al.* (2013) para o ovário caprino, o qual foi utilizado neste estudo, não afetou a atividade mitocondrial. Estudos anteriores mostraram que o OTC também não oferece riscos para a atividade mitocondrial do ovário ovino (SILVA *et al.*, 2017) ou outras lesões profundas, como danos ao DNA, o que pode ser evidenciado pelos sinais de fosforilação da histona H2AX ou ensaio de TUNEL (CARVALHO *et al.*, 2014) em ovários caprinos.

De forma complementar, nossos resultados revelaram que RO0.125 apresentou alto nível de TAC em comparação com VWA, AN2000 e AN2000<sup>+</sup>. Isso pode ser atribuído às características estruturais da robinina, que é composta por doze grupos hidroxilas, os quais são doadores de hidrogênio e podem estar envolvidos na redução do ferro e, conseqüentemente, na estabilização dos radicais livres (PEREZ, 2001). Mecanismo semelhante foi descrito para flavonóides (KASHIMA, 1999).

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que é recomendado o uso de antioxidantes (anetol e/ou robinina) na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino. No entanto, para a otimização do potencial dos folículos pré-antrais mantidos em cultivo *in vitro*, visando o seu crescimento e desenvolvimento, é necessário definir previamente a concentração ideal para a sua utilização. Outros estudos poderiam ser executados para investigar a associação dos antioxidantes utilizados nesse estudo ou a associação com outros antioxidantes para a obtenção de resultados positivos em mais de um parâmetro em um mesmo protocolo.

## 9. CONCLUSÃO

- Recomenda-se o uso de antioxidantes (anetol ou robinina) na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino, haja vista que todos os parâmetros investigados nessa condição foram melhores do que na vitrificação sem antioxidantes;
- A adição de anetol na concentração de 2000 µg/mL na solução de vitrificação do tecido ovariano é benéfica para preservação da morfologia e folicular, mantendo similar a do folículo não vitrificado e, não afeta a ativação do folículo após aquecimento e incubação *in vitro*;
- O uso de robinina na concentração de 0,125mg/mL na solução de vitrificação do tecido ovariano é benéfica, uma vez que apresenta uma capacidade antioxidante superior à observada no tecido ovariano vitrificado sem antioxidantes;
- A utilização do mesmo tipo e concentração do antioxidante na incubação do tecido ovariano após a vitrificação/aquecimento não foi relevante para os parâmetros avaliados nesse estudo.

## 10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora, esse estudo tenha mostrado que a adição de antioxidante na solução de vitrificação seja de grande importância para manter o sucesso do procedimento, mantendo especialmente a morfologia folicular (com o anetol 2000 µg/mL) similar ao tecido ovariano não vitrificado e capacidade antioxidante total superior (com a robinina 0,125 mg/mL) à vitrificação na ausência dessas substâncias, acreditamos que a associação de ambos pode resultar na obtenção dessas características, de maneira concomitante. Esses antioxidantes também poderão resultar em dados satisfatórios se usados associados a outros antioxidantes, como é o caso do ácido alfa lipóico, ou mesmo associados a aditivos como os polímeros sintéticos, que são crioprotetores não penetrantes.

De acordo com os resultados, o tecido ovariano ovino vitrificado na presença do anetol e robinina, se cultivado por um médio ou longo período, poderá permitir o crescimento e desenvolvimento folicular até o estágio de folículos pré-antrais mais avançados, ou seja, os folículos secundários. Esses folículos secundários poderão futuramente, serem recuperados do tecido e crescidos *in vitro* para a obtenção de oócitos potencialmente fecundáveis. Desta forma, o tecido ovariano vitrificado pode ser uma fonte potencial para a produção e embriões *in vitro*, após a perda de um animal, ou mesmo quando em humanos não for possível a realização do transplante ovariano, previamente criopreservado.

## REFERÊNCIAS

ABDI, S.; SALEHNIA, M.; HOSSEINKHANI, S. Evaluation of apoptosis in long-term culture of vitrified mouse whole ovaries. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 1–4, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.09.016>>.

AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, n. 1, p. 112, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4258799&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

AGNELLO, M.; MORICI, G.; RINALDI, A. M. A method for measuring mitochondrial mass and activity. **Cytotechnology**, v. 56, n. 3, p. 145–149, 2008.

AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ISHAK, G. M.; GASTAL, M. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; FEUGANG, J. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124–133, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>>.

AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ISHAK, G. M.; GASTAL, M. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; FEUGANG, J. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124–133, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>>.

ALONSO-POZOS, I.; ROSALES-TORRES, A. M. Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size. 2003.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 551–562, 2004.

AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; PORCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. Oocytes cryopreservation: State of art. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 250–262, 2006.

AMORIM, C. A.; CURABA, M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J. Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 23, n. 2, p. 160–186, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.04.005>>.

ANDERSEN, C. Y.; KRISTENSEN, S. G. Novel use of the ovarian follicular pool to postpone menopause and delay osteoporosis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, n. 2, p. 128–131, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.05.002>>.

ASANO, T.; AIDA, S.; SUEMASU, S.; MIZUSHIMA, T. Anethole restores delayed gastric emptying and impaired gastric accommodation in rodents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 472, n. 1, p. 125–130, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.078>>.

ASGARI, F.; VALOJERDI, M. R.; EBRAHIMI, B.; FATEHI, R. Three dimensional in vitro culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 529–536, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.11.001>>.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>>.

BEST, B. P. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. **Rejuvenation Research**, v. 18, n. 5, p. 422–436, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/rej.2014.1656>>.

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.

BORZOEI, A.; RAFRAF, M.; NIROMANESH, S.; FARZADI, L.; NARIMANI, F.; DOOSTAN, F. Effects of cinnamon supplementation on antioxidant status and serum lipids in women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, p. 6–11, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.04.008>>.

BRISTOL-GOULD, S. K.; KREEGER, P. K.; SELKIRK, C. G.; KILEN, S. M.; COOK, R. W.; KIPP, J. L.; SHEA, L. D.; MAYO, K. E.; WOODRUFF, T. K. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology**, v. 298, n. 1, p. 132–148, 2006.

BUCKMAN, J. F.; HERNÁNDEZ, H.; KRESS, G. J.; VOTYAKOVA, T. V.; PAL, S.; REYNOLDS, I. J. MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: Influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 104, n. 2, p. 165–176, 2001.

C.S. Lau, D.J. Carrier, R.R. Beitle, L.R. Howard, J.O. Lay, R. Liyanage, E.C. Clausen, A glycoside flavonoid in Kudzu (*Pueraria lobata*): identification, quantification, and determination of antioxidant activity, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 121–124 (2005) 783–794

CAROU, M. C.; CRUZANS, P. R.; MARURI, A.; STOCKERT, J. C.; LOMBARDO, D. M. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 1, p. 92–103, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2014.11.006>>.

CARVALHO, A. A. Vitrificação de tecido ovariano caprino: efeito de um novo dispositivo fechado e adição de catalase. 2013. 191 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013. Cap. 4.

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, n. 1, p. 140–147, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.006>>.



CHAINY, G. B.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v. 19, n. 25, p. 2943–2950, 2000.

CHAZOTTE B. **Labeling mitochondria with MitoTracker dyes**. Cold Spring Harb Protoc., v.8, p. 990-992, 2011.

CHATTERJEE, A.; SAHA, D.; NIEMANN, H.; GRYSHKOV, O.; GLASMACHER, B.; HOFMANN, N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. **Cryobiology**, v. 74, p. 1–7, 2017.

CHEN, Y. F.; LIU, H.; LUO, X. J.; ZHAO, Z.; ZOU, Z.Y.; LI, J.; LIN, X.J.; LIANG, Y. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 112, p. 21–30, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040842817300549>>.

CHOI, J. K.; YUE, T.; HUANG, H.; ZHAO, G.; ZHANG, M.; HE, X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 350–355, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.012>>.

CÓRDOVA, A.; NAVAS, F. J. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. **Archivos de Medicina del Deporte**, v. 6, p. 204–208, 2000.

CORMACK DH. O sistema reprodutor feminino. In: Cormack DH. *Ham histologia*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.485-508

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society symposium**, v. 61, p. 1–31, 1995.

DEMANT M, TRAPPHOFF T, FRÖHLICH T, ARNOLD GJ, Eichenlaub-Ritter U. Vitrification at the pre-antral stage transiently alters inner mitochondrial membrane potential but proteome of in vitro grown and matured mouse oocytes appears unaffected. **Hum Reprod** 2012;27:1096–1111.

DONGARE, V.; KULKARNI, C.; KONDAWAR, M.; MAGDUM, C.; HALDAVNEKAR, V.; ARVINDEKAR, A. Inhibition of aldose reductase and anti-cataract action of trans-anethole isolated from *Foeniculum vulgare* Mill. fruits. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 385–390, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.005>>.

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.

DU PLESSIS, S. S.; MAKKER, K.; DESAI, N. R.; AGARWAL, A. Impact of oxidative stress on IVF. **Expet Rev Obstet Gynecol**, v.3, p.539–554, 2008.

ELKOUBY, Y. M.; MULLINS, M. C. Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis - New findings from early vertebrate oogenesis. **Developmental Biology**, n. September 2016, p. 0–1, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.06.029>>.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Sem. Reprod. Endocrinol.**, v. 3, p. 233-254, 1986.

FABBRI, R.; VICENTI, R.; MARTINO, N. A.; DELL'AQUILA, M. E.; PASQUINELLI, G.; MACCIOCCA, M.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; 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, p. 795–804.e1, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.032>>.

FANG, Z.; YANG, S.; WU, G. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Nutrição**, v.18, p. 872-879, 2002.

FARKAS, L.; VERMES, B.; NÓGRÁDI, M.; KÁLMÁN, A. The final structure of robinin and biorobin and their total synthesis. **Phytochemistry**, v. 15, n. 1, p. 215–218, 1976.

FAUSTINO, L. R.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M. G.; PINTO, L. C.; CELESTINO, J. J. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. 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, n. 1–2, p. 90–97, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.001>>.

FIGUEIREDO J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. **Zygote**. V.15,p.173–18, 2007

FIGUEIREDO JR, SILVA JRV, RODRIGUES APR. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciênc Anim**, v.9, p.11-25, 1999.

FOROUZANFAR, M.; ABID, A.; HOSSEINI, S. M.; HAJIAN, M.; NASR ESFAHANI, M. H. Supplementation of sperm cryopreservation media with cell permeable superoxide dismutase mimetic agent (MnTE) improves goat blastocyst formation. **Cryobiology**, v. 67, n. 3, p. 394–397, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.08.004>>.

FRANSEN, J. R.; NARAYANASAMY, P. Neuroprotection through flavonoid: Enhancement of the glyoxalase pathway. **Redox Biology**, v. 14, n. September 2017, p. 465–473, 2018.

FREIRE, R. S.; MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; PINHEIRO, D. C. S. N. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4353–4358, 2005.  
from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. *J Am Mosq Control*

GALICKA, A.; KRĘTOWSKI, R.; NAZARUK, J.; CECHOWSKA-PASKO, M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 394, n. 1–2, p. 217–224, 2014.  
GASTAL, G. D. A.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; DE TARSO, S. G. S.; ISHAK, G. M.; CAVINDER, C. A.; FEUGANG, J. M.; GASTAL, E. L. Equine ovarian tissue viability after cryopreservation and in vitro culture. **Theriogenology**, v. 97, p. 139–147, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.029>>.

GERAVANDI, S.; AZADBAKHT, M.; POURMORADI, M.; NOWROUZI, F. Zinc supplementation of vitrification medium improves in vitro maturation and fertilization of oocytes derived from vitrified-warmed mouse ovaries. **Cryobiology**, v. 74, p. 31-35, 2017.

GOMES, R. G.; SILVA, C. B.; GONZÁLEZ, S. M.; OLIVEIRA, R. L.; MAX, M. C.; LISBOA, L. A.; BARREIROS, T. R. R.; SANTOS, M. M.; SARAPIÃO, F. D.; GASTAL, E. L.; SENEDA, M. M. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. **Theriogenology**, v. 105, p. 169–173, 2018.

MBEMYA, G. T.; GUERREIRO, D. D.; DONFACK, N. J.; SILVA, L.M.; VIEIRA, L. A.; SOUSA, F. C.; ALVES, B. G.; IZAGUIRRY, A. P.; SANTOS, F. W.; TELEFO, P.H.; PESSOA, O. D. L.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Justicia insularis Improves the in vitro Survival and Development of Ovine Preantral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 9, p. 668–680, 2017. Disponível em: <<http://www.davidpublisher.org/index.php/Home/Article/index?id=32590.html>>.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.036>>.

FENG, Y.; GUO, S.; ZHAO, S.; LU, X.; FU, J.; SUN, X.; SUN, Y. Improved cryotolerance and developmental competence of human oocytes matured in vitro by transient hydrostatic pressure treatment prior to vitrification. **Cryobiology**, v. 75, p. 144–150, 2017.

GUEDES, J. D. S.; RODRIGUES, J. K.; LUISA, A.; CAMPOS, M.; MARINHO, R. M. Follicle Viability after Vitri fication of Bovine Ovarian Tissue Viabilidade folicular após a vitri fi cação de tecido ovariano bovino. p. 614–621, 2017.

GUPTA, S.; SEKHON, L.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Curr Women's Health Rev**, v.6, p.227–238,2010.

GUY, C.; Touil, Y. S.; Pham, M. H.; Dauzonne, D. Flavonoids in cancer prevention and

HAAG K.T.; MAGALHÃES-PADILHA D. M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL A.; GASTAL, M.O.; KING, K.K.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J.R.; , GASTAL, E.L. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method: Histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. **Theriogenology** , v. 79, p.735–743, 2013.

HAMMADEH, M. E.; AL HASANI, S.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W.; FISCHER HAMMADEH, C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 277, n. 6, p. 515–526, 2008.

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**, 2014.

HEMADI, M.; ABOLHASSANI, F.; AKBARI, M.; SOBHANI, A.; PASBAKHS, P.; L. AHLUND-RICHTER, L. MODARESI, M.H. SALEHNIA, M. Melatonin promotes the cumulus oocyte complexes quality of vitrified-thawed murine ovaries; with increased mean number of follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation, **Eur. J. Pharmacol.** v.618, p.84-90, 2009.

HERRAIZ, S.; NOVELLA-MAESTRE, E.; RODRÍGUEZ, B.; DÍAZ, C.; SÁNCHEZ-SERRANO, M.; MIRABET, V.; PELLICER, A. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: Slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 3, 2014.

HICKMAN, L. C.; UY-KROH, M. J.; CHIESA-VOTTERO, A.; DESAI, N.; FLYCKT, R. Ovarian Tissue Cryopreservation for Benign Gynecologic Disease: A Case of Ovarian Torsion and Review of the Literature. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 23, n. 3, p. 446–449, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmig.2015.12.011>>.

HULSHOF, S. C. J., FIGUEIREDO, J. R., BECKERS, J. B. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. Quarterly **Journal of Veterinary Science**, v. 16, p. 78-80, 1994.

IDELCHIK, M. del P. S.; BEGLEY, U.; BEGLEY, T. J.; MELENDEZ, J. A. Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, n. November 2016, p. 0–1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.005>>.

ISACHENKO, V.; TODOROV, P.; SEISENBAYEVA, A.; TOISHIBEKOV, Y.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; MALLMANN, P.; FOTH, D.; MERZENICH, M. Vitrification of human pronuclear oocytes by direct plunging into cooling agent: Non sterile liquid nitrogen vs. sterile liquid air. **Cryobiology**, n. November, p. 0–1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.11.009>>.

ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TOKUDA, H.; ENJO, F.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium* plants. **Cancer Letters**, v. 214, n. 2, p. 165–169, 2004.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, n. 1–2, p. 31–39, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.049>>.

JANEESH, P. A.; ABRAHAM, A. Robinin modulates doxorubicin-induced cardiac apoptosis by TGF- $\beta$ 1 signaling pathway in Sprague Dawley rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, n. 8, p. 989–998, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.010>>.

JANEESH, P. A.; SASIKALA, V.; DHANYA, C. R.; ABRAHAM, A. Robinin modulates TLR/NF- $\kappa$ B signaling pathway in oxidized LDL induced human peripheral blood mononuclear cells. **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 191–197, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2013.11.023>>.

JOHNSON, E. K.; FINLAYSON, C.; ROWELL, E. E.; GOSIENGFAO, Y.; PAVONE, M. E.; LOCKART, B.; ORWIG, K. E.; BRANNIGAN, R. E.; WOODRUFF, T. K. Fertility

Preservation for Pediatric Patients: Current State and Future Possibilities. **Journal of Urology**, v. 198, n. 1, p. 186–194, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2016.09.159>>.

JONES, A.; PRAVADALI-CEKIC, S.; DENNIS, G. R.; BASHIR, R.; MAHON, P. J.; SHALLIKER, R. A. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p. 93–101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.032>>.

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

KARAVANI, G.; SCHACHTER-SAFRAI, N.; CHILL, H. H.; MORDECHAI DANIEL, KASHIMA, M. Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 279-283, 1999.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; SUZUKI, N.; DEGUCHI, M.; SATO, Y.; TAKAE, S.; HO, C. -h.; KAWAMURA, N.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; SUGISHITA, Y.; MORIMOTO, Y.; HOSOI, Y.; YOSHIOKA, N.; ISHIZUKA, B.; HSUEH, A. J. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17474–17479, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1312830110>>.

KAYANOKI Y, Fujii J, Islam KN, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y and Taniguchi N. (1996) **J. Biochem.** (Tokyo), 119, 817–822.

KASHIMA, M.,. Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical. **Chem. Pharm. Bull.** 47, 279–283.

KEROS, V., XELLA, S., HULTENBY, K., PETTERSSON, K., SHEIKHI, M., VOLPE, A. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. **Human Reproduction** 24, 1670–1683, 2009.

KHAN, A.; AHMAD, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 1, p. 114–122, 2011.

KHANNA, S.; SEN, C. K.; ROY, S.; CHRISTEN, M. O.; PACKER, L. Protective effects of anethole dithiolethione against oxidative stress-induced cytotoxicity in human Jurkat T Cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 61–69, 1998.

KIM, H. J.; LEE, J. H.; HUR, Y. B.; LEE, C. W.; PARK, S. H.; KOO, B. W. Marine antifreeze proteins: Structure, function, and application to cryopreservation as a potential cryoprotectant. **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, 2017.

KLOCKE, S.; TAPPEHORN, C.; GRIESINGER, G. Effects of supra-zero storage on human ovarian cortex prior to vitrification-warming. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 29, n. 2, p. 251–258, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.03.025>>.

- KLÜVER JENSEN, A.; MACKLON, K. T.; FEDDER, J.; ERNST, E.; HUMAIDAN, P.; ANDERSEN, C. Y. 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [s.d.]
- KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, v. 53, n. 1, p. 15–25, 2007.
- KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 823–835, 2011. Disponível em: <[http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=WOS&search\\_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=4AEONdF8e2oINLE8k76&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=4AEONdF8e2oINLE8k76&page=1&doc=1&cacheurlFromRightClick=no)>.
- LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 244–282, 2007.
- LIVINGSTON, J. A. Alcohol Consumption and Women's Vulnerability to Sexual Victimization: Can Reducing Women's Drinking Prevent Rape?, *Substance Use & Misuse*, 44:9-10, 1349-1376, 2009. DOI: [10.1080/10826080902961468](https://doi.org/10.1080/10826080902961468)
- LOTZ, L.; MAKTABI, A.; HOFFMANN, I.; FINDEKLEE, S.; BECKMANN, M. W.; DITTRICH, R. Ovarian tissue cryopreservation and retransplantation - What do patients think about it? **Reproductive BioMedicine Online**, 2016.
- LUNARDI, F. O.; ARAÚJO, V. R.; FAUSTINO, L. R.; CARVALHO, A. de A.; GONÇALVES, R. F. B.; BASS, C. S.; BENTO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Morphologic, viability and ultrastructural analysis of vitrified sheep preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2–3, p. 121–130, 2012.
- LUNARDI, F. O., CHAVES, R. N., DE LIMA, L. F., ARAÚJO, V. R., BRITO, I. R., SOUZA, C. E., DONATO, M. A., PEIXOTO, C. A., DINNYES, A., RODRIGUES, A. P. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. **Cell and Tissue Res.** **362**, 241-51, 2015. doi:10.1007/s00441-015-2181-0
- LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; DA SILVA, C. M. G.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1–14, 2011.
- MANDAWALA, A. A.; HARVEY, S. C.; ROY, T. K.; FOWLER, K. E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1637–1644, 2016.
- MANNING, A. J.; BURTON, M. P. M.; CRIM, L. W. The timing of puberty in cultured female yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer): Oogenesis and sex steroid production in vivo and in vitro. **Aquaculture**, v. 279, n. 1–4, p. 188–196, 2008.
- MANSUY, D.; SASSI, A.; DANSETTE, P. M.; PLAT, M. A new potent inhibitor of lipid peroxidation in vitro in vivo, the hepatoprotective drug anthiolhione. **Biochemical and**

**biophysical research communication**, v. 135, p. 1015-1021, 1986.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; McCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRA THER, R. S.; DIDION, B. A.; DA Y, B. N. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle - Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation *In Vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1197–1203, 2002.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. **Reproduction**, v. 123, p. 23- 30, 2002.

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**, v. 11, n. 1, p. 27, 2013. Disponível em: <<http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-11-27>>.

**Masisi 2016**. , [s.d.].

MARSELLA, T., SENA, P., XELLA, S., LA MARCA, A., GIULINI, S., DE POL, A., VOLPE, A., MARZONA, L. Human ovarian tissue cryopreservation: effect of sucrose concentration on morphological features after thawing. **Reprod. Biomed**. Online 16, 257–267. 2008.

MCGEE, E.A.; SMITH, R.; SPEARS, N.; NACHTIGAL, M.W.; INGRAHAM, H.; HSUEH, A.J.W. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. **Biol Reprod**, v.64, p.293-298, 2001.

MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 644-653, 2010.

MEIROW, D.; RONESS, H.; KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, C. Y.; Optimizing outcomes from ovarian tissue cryopreservation and transplantation; activation versus preservation, **Human Reproduction**, Volume 30, Issue 11, 1 November 2015, Pages 2453–2456, <https://doi.org/10.1093/humrep/dev210>

MELO, M. A. P.; OSKAM, I. C.; CELESTINO, J. J. H.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SANTOS, R. R. Adding Ascorbic Acid to Vitrification and IVC Medium Influences Preantral Follicle Morphology, but Not Viability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 742–745, 2011.

MENG, D.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; WANG, H.; HO, C.T.; LI, S.; SHAHIDI, F.; ZHAO, H. Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 467-479, 2017.

MOAWAD, A. R.; XU, B.; TAN, S. L.; TAKETO, T. L. Carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. **Human Reproduction**, v. 29, n. 10, p. 2256–2268, 2014.

MOSTEK, A.; DIETRICH, M. A.; SŁOWIŃSKA, M.; CIERESZKO, A. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. **Theriogenology**, v. 92, p. 95–

102, 2017.

MOUTTHAM, L.; COMIZZOLI, P. The preservation of vital functions in cat ovarian tissues during vitrification depends more on the temperature of the cryoprotectant exposure than on the sucrose supplementation. **Cryobiology**, v. 73, n. 2, p. 187–195, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.07.013>>.

NILSSON, E.; KEZEL, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, p.65-73, 2002.

NOHALES-CÓRCOLES, M.; SEVILLANO-ALMERICH, G.; DI EMIDIO, G.; TATONE, C.; COBO, A. C.; DUMOLLARD, R.; DE LOS SANTOS MOLINA, M. J. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. **Human Reproduction**, v. 31, n. 8, p. 1850–1858, 2016.

OKEDIRAN, B. S.; BIOBAKU, K. T.; OLAIFA, F. H.; ATATA, A. J. Haematological and antioxidant enzyme response to Lead toxicity in male Wistar rats. **Ceylon Journal of Science** v. 46, n. 2, p. 31–37, 2017.

PAES, V. M.; VIEIRA, L. A.; CORREIA, H. H. V.; SA, N. A. R.; MOURA, A. A. A.; SALES, A. D.; RODRIGUES, A. P. R.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; SANTOS, F. W.; APGAR, G. A.; CAMPELLO, C. C.; CAMARGO, L. S. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994–1003, 2016.

PAN, Z.; ZHANG, J.; LI, Q.; LI, Y.; SHI, F.; XIE, Z.; LIU, H. Current Advances in Epigenetic Modification and Alteration during Mammalian Ovarian Folliculogenesis. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 39, n. 3, p. 111–123, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgg.2012.02.004>>.

PARDO-ANDREU, G. L.; PAIM, B. A.; CASTILHO, R. F.; VELHO, J. A.; DELGADO, R.; VERCESI, A. E.; OLIVEIRA, H. C. F. *Mangifera indica* L. extract (Vimang®) and its main polyphenol mangiferin prevent mitochondrial oxidative stress in atherosclerosis-prone hypercholesterolemic mouse. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 5, p. 332–338, 2008.

PAYNTER, S. J., COOPER, A., FULLER, B. J., SHAW, R. W. Cryopreservation of Bovine Ovarian Tissue: Structural Normality of Follicles after Thawing and Culture in Vitro. **Cryobiology**, v. 38, p. 301–309, 1999.

PEREZ, R. M. G. Anti-Inflammatory Activity of Compounds Isolated from Plants. p. 713–784, 2001.

PINTO, F. F.; DANIEL, D. E.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F. M. E.; THEODORO, P. N. E. T.; ESPÍNDOLA, L. S. Glicoalcaloides antifúngicos flavonoides e outros constituintes químicos de. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284–288, 2011.

POIROT, C.; ABIRACHED, F.; PRADES, M.; COUSSIEU, C.; BERNAUDIN, F.; PIVER, P. Induction of puberty by autograft of cryopreserved ovarian tissue. **The Lancet**, v. 379, n. 9815, p. 588, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61781-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61781-9)>.



QINGMING, Y.; XIANHUI, P.; WEIBAO, K.; HONG, Y.; YIDAN, S.; LI, Z.; YANAN, Z.; YULING, Y.; LAN, D.; GUOAN, L. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 84–89, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.094>>.

QIU, M.; LIU, J.; HAN, C.; WU, B.; YANG, Z.; SU, F.; QUAN, F.; ZHANG, Y. The influence of ovarian stromal/theca cells during in vitro culture on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of granulosa cells derived from the goat ovary. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 170–176, 2014.

RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 213–228, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.034>>.

RAY, R.; SHAH, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. **Clinical Science**, v. 109, p. 217–226, 2005.

REVEL, A.; LAUFER, N.; BEN MEIR, A.; LEOVICH, M.; MITRANI, E. Micro-organ ovarian transplantation enables pregnancy: A case report. **Human Reproduction**, v. 26, n. 5, p. 1097–1103, 2011.

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y. X.; SUN, Q. Y.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, v. 281, n. 2, p. 160–170, 2005.

RODRIGUEZ, A.; STRUCKO, T.; STAHLHUT, S. G.; KRISTENSEN, M.; SVENSSEN, D. K.; FORSTER, J.; NIELSEN, J.; BORODINA, I. Metabolic engineering of yeast for fermentative production of flavonoids. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1645–1654, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.043>>.

ROSARIO, R.; CHILDS, A. J.; ANDERSON, R. A. RNA-binding proteins in human oogenesis: Balancing differentiation and self-renewal in the female fetal germline. **Stem Cell Research**, v. 21, p. 193–201, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2017.04.008>>.

SÁ, N. A. R.; ARAÚJO, V. R.; CORREIA, H. H. V.; FERREIRA, A. C. A.; GUERREIRO, D. D.; SAMPAIO, A. M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F. W.; MOURA, A. A.; LÔBO, C. H.; CECCATTO, V. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 226–234, 2017.

SADAT, V.; JASEMI, K.; SAMADI, F.; EIMANI, H.; HASANI, S.; FATHI, R.; SHAHVERDI, A.; SADRABADI, F. S. Function of vitrified mouse ovaries tissue under static magnetic field after autotransplantation. v. 8, n. 3, p. 243–249, 2017.

SADR, S. Z.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSEINI, M.; FATEHI, R.; FAVAEDI, R. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive**

**Biology**, v. 194, p. 206–211, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.09.028>>.

SADEGHIPOUR, M., TERREUX, R., AND PHIPPS, J. Flavonoids and Tyrosine Nitration: Structure Activity Relationship Correlation with Enthalpy of Formation. **Toxicol.** 19: 155-65, 2005.

SAHEBKAR, A.; SERBAN, M. C.; URSONIU, S.; BANACH, M. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 898–909, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615000092>>.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1822, n. 12, p. 1896–1912, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>>.

SANFILIPPO, S.; CANIS, M.; SMITZ, J.; SION, B.; DARCHA, C.; JANNY, L.; BRUGNON, F. Vitrication of human ovarian tissue: A practical and relevant alternative to slow freezing. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12958-015-0065-5>>.

SANTOS, R. R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Viability of oocytes and granulosa cells from cryopreserved ovine ovarian primordial, primary and secondary follicles. **Small Ruminant Research**, v. 99, n. 2–3, p. 203–207, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.006>>.

SCHAFFER, F.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 1191-1212, 2001.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de nutrição**, v.17, p.227-236, 2004.

SEBASTIAN, R. S.; WILKINSON ENNS, C.; GOLDMAN, J. D.; STEINFELDT, L. C.; MARTIN, C. L.; CLEMENS, J. C.; MURAYI, T.; MOSHFEGH, A. J. New, publicly available flavonoid data products: Valuable resources for emerging science. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 64, n. July, p. 68–72, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.016>>.

SILBER, S.; PINEDA, J.; LENAHAN, K.; DEROSA, M.; MELNICK, J. Fresh and cryopreserved ovary transplantation and resting follicle recruitment. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 30, n. 6, p. 643–650, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.02.010>>.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; FIGUEREIREDO, J. R. Morphological features and control of follicular growth during folliculogenesis in domestic ruminants. **Ciência Animal**, v. 12, n. 2, p. 105–117, 2002.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA C, MORAES, M. O, FIGUEIREDO, J. R. Influences of fsh and egf on primordial follicles

During *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, 61:1691–1704, 2004.

SILVA, L. M. Adição de agentes antioxidantes na solução de vitrificação do tecido ovariano ovino: Uma perspectiva para refinar e aperfeiçoar o protocolo. Dissertação. Universidade Federal do Ceará, 2017.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants - A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>>.

SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, p. 395–414, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmp056>>.

SON, C. R. I. M.; PANKIEWICZ, K.; SZEWCZYK, G.; TM, M. Ovarian Tissue Cryopreservation as a Fertility Sparing Method in Oncological Patients-Current State and Controversy. p. 5–7, 2017.

SUCCU, S.; PASCIU, V.; MANCA, M. E.; CHELUCCI, S.; TORRES-ROVIRA, L.; LEONI, G. G.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; NAITANA, S.; BERLINGUER, F. Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitrified ovine embryos. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1058–1066, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.032>>.

SUZUKI, N.; YOSHIOKA, N.; TAKAE, S.; SUGISHITA, Y.; TAMURA, M.; HASHIMOTO, S.; MORIMOTO, Y.; KAWAMURA, K. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. **Hum Reprod**, v. 30, n. 3, p. 608–15, Mar 2015.

TALEVI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; DE STEFANO, C.; FERRARO, R.; SUDHAKARAN, S.; GUALTIERI, R. Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 6, p. 1523–1531.e1, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.043>>.

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.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; CAMPOS, J. R.; LAWSON, M. S.; MULLEN, S. F.; FAHY, G. M.; ZELINSKI, M. B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. **Human Reproduction**, v. 28, n. 5, p. 1267–1279, 2013.

TSIKLAURI, L.; AN, G.; RUSZAJ, D. M.; ALANIYA, M.; KEMERTELIDZE, E.; MORRIS, M. E. Simultaneous determination of the flavonoids robinin and kaempferol in human breast

cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, n. 1, p. 109–113, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.12.021>>. v.30, p.1191-1212, 2001.

TRAPPHOFF, T.; HEILIGENTAG, M.; SIMON, J.; STAUBACH, N.; SEIDEL, T.; OTTE, K.; FRÖHLICH, T.; ARNOLD, G. J.; EICHENLAUB-RITTER, U. Improved cryotolerance and developmental potential of *in vitro* and *in vivo* matured mouse oocytes by supplementing with a glutathione donor prior to vitrification. *Molecular Human Reproduction*, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gaw059>>.

VAANHOLT, L. M.; MILNE, A.; ZHENG, Y.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S. E.; VALENCAK, T. G.; ALLISON, D. B.; SPEAKMAN, J. R. Oxidative costs of reproduction: Oxidative stress in mice fed standard and low antioxidant diets. *Physiology and Behavior*, v. 154, p. 1–7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.11.009>>. VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Freezers são programáveis ainda precisava no laboratório embrião? Revisão sobre vitrificação *Reprod Biomed on-line*, v.12 , p.779-796, 2006.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. *In vivo* and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*, v. 47, p. 73-82, 1997.

VANORNY, D. A.; MAYO, K. **The role of Notch signaling in the mammalian ovary.** *Reproduction* v. **153**, 2017

WANG, Y.; XIAO, Z.; LI, L.; FAN, W.; LI, Sw. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod*, v. 23, p. 2256-2265, 2008.

WANG, T. R.; YAN, J.; LU, C. L.; XIA, X.; YIN, T. L.; ZHI, X.; ZHU, X. H.; DING, T.; HU, W. H.; GUO, H. Y.; LI, R.; YAN, L. Y.; QIAO, J. Human single follicle growth in vitro from cryopreserved ovarian tissue after slow freezing or vitrification. *Human Reproduction*, v. 31, n. 4, p. 763–773, 2016.

WEI, J.-H.; YUAN, X.-Y.; ZHANG, J.-M.; WEI, J.-Q. Caspase activity and oxidative stress of granulosa cells are associated with the viability and developmental potential of vitrified immature oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 198, p. 22–26, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301211515004546>>.

WICKENHEISSER, J. K.; NELSON-DEGRAVE, V. L.; MCALLISTER, J. M. Human ovarian theca cells in culture. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 17, n. 2, p. 65–71, 2006.

WINTERBOURN, C. C. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species, *Cell Metabolism*, v.13, p.361-366, 2011.

WILLIAMS, C. J.; Erickson, G.F. Morphology and Physiology of the Ovary. editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.

WU, G. Q.; QUAN, G. B.; SHAO, Q. Y.; LY, C. R.; JIANG, Y. T.; ZHAO, Z. Y.; HONG, Q. H. Cryotop vitrification of porcine parthenogenetic embryos at the early developmental stages. **Theriogenology**, v.85, p.434–440,2016.

YANG, P.; LUAN, X.; PENG, Y.; CHEN, T.; SU, S.; ZHANG, C.; WANG, Z.; CHENG, L.; ZHANG, X.; WANG, Y.; CHEN, Z. J.; ZHAO, H. Novel zona pellucida gene variants identified in patients with oocyte anomalies. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 6, p. 1364–1369, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.029>>.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification Solutions. **Theriogenology**, v. 67, p.81-89, 2007.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **J. Clin. Pathol**, v.54, p.176–186, 2001.

ZAVAREH, S.; TALEBI, A.; HASANZADEH, H. Amending in vitro culture condition to overcome oxidative stress in assisted reproduction techniques ( ART ). v. 6, n. 2, p. 135–148, 2015.

ZHANG, Y.; LI, W.; MA, Y.; WANG, D.; ZHAO, X.; ZENG, C.; ZHANG, M.; ZENG, X.; MENG, Q.; ZHOU, G. Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 335–342, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.171>>.

ZHAO, X. ming; DU, W. hua; WANG, D.; HAO, H. sheng; QIN, T.; LIU, Y.; ZHU, H. bin. Controlled Freezing and Open-Pulled Straw (OPS) Vitrification of In vitro Produced Bovine Blastocysts Following Analysis of ATP Content and Reactive Oxygen Species (ROS) Level. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 3, p. 446–455, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60030-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60030-6)>.

ZHOU, X.; SHU, Z.; LIANG, X. M.; JIANG, C.; SU, Y.; GAO, D. Investigation on the thermal performance of a novel microchannel-aided device for vitrification of cells/tissues. **Applied Thermal Engineering**, v. 119, p. 189–196, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2017.03.042>>.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 57–70, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725801001590>>.