

Universidade Federal de Jataí
Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

**UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL ASSOCIADO A
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA A VITRIFICAÇÃO DE TECIDO
OVARIANO BOVINO**

Discente: Priscila Taciani Bomtempo Aguiar

Orientador: Prof. Dr. Benner Geraldo Alves

JATAÍ - GO

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor: PRISCILA TACIANI BOMTEMPO AGUIAR

3. Título do trabalho: UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA A VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Benner Geraldo Alves, Usuário Externo, em 01/12/2020, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

file:///C:/Users/priso/Downloads/Termo_de_Ciencia_e_de_Autorizacao_TECA_1717341.html

1/2



Documento assinado eletronicamente por PRISCILA TACIANI BOMTEMPO AGUIAR, Discente, em 01/12/2020, às 21:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0
informando o código verificador 1717341 e o código CRC 6E38E8A4.

PRISCILA TACIANI BOMTEMPO AGUIAR

**UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE
SÍLICA PARA A VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal de Jataí, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração:

Saúde e Produção Animal

Linha de Pesquisa:

Nutrição, Produção e Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Benner Geraldo Alves

JATAÍ - GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Bomtempo Aguiar, Priscila Taciani
UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL ASSOCIADO A
NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA A VITRIFICAÇÃO DE TECIDO
OVARIANO BOVINO [manuscrito] / Priscila Taciani Bomtempo
Aguiar. - 2020.
XLIV, 44 f.

Orientador: Prof. Dr. Benner Geraldo Alves.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2020.

1. Vitrificação. 2. Folículos pré-antrais. 3. Tecido ovariano. 4.
Nanopartículas. I. Alves, Benner Geraldo, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 022/2020-PPGBA da sessão de Defesa de Dissertação de **PRISCILA TACIANI BOMTEMPO AGUIAR**, que confere o título de Mestra em **BIOCIÊNCIA ANIMAL**.

Ao vigésimo sétimo dia do mês de novembro do ano de dois mil e vinte, a partir das 13 horas, realizou-se por meio de videoconferência a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "UTILIZAÇÃO DO RESVERATROL ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA A VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Benner Geraldo Alves (docente credenciado ao Programa de Pós-Graduação em BIOCÊNCIA ANIMAL/UFV) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Cecília Nunes Moreira (UACIAGRA/UFV - Jataí/GO) - membro titular interno e Professor Doutor Gustavo Desire Antunes Gastal (Investigador Principal em Reprodução Animal Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - INIA, La Estanzuela, Colônia, Uruguai) - membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Benner Geraldo Alves, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao vigésimo sétimo dia do mês de novembro do ano de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Não houve alteração



Documento assinado eletronicamente por Benner Geraldo Alves, Usuário Externo, em 27/11/2020, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Gustavo Desire Antunes Gastal, Usuário Externo, em 27/11/2020, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Cecília Nunes Moreira, Professora do Magistério Superior, em 27/11/2020, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539 de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufv.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0



informando o código verificador 1710323 e o código CRC 48849B1E.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde e oportunidades que tem me dado, sem dúvidas a figura com quem eu mais me apeguei para que conseguisse terminar esse projeto.

Meus agradecimentos aos laboratórios de: Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU); Reprodução Animal da Universidade Federal de Goiás (UFG); Química, Patologia e Morfofisiologia da Universidade Federal de Jataí (UFJ); e Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) da UFU. Minha profunda gratidão a todos os técnicos, pós-doutorandos e professores envolvidos no desenvolvimento desse projeto.

Agradeço aos meus colegas de graduação que ainda fazem parte do meu convívio e aos de mestrado que contribuíram direta e indiretamente, auxiliando a superar os desafios. Sem dúvida a companhia de vocês foi de suma importância. Estendo também meus agradecimentos aos colegas de trabalho, que fizeram parte desta caminhada, me ajudando mesmo que indiretamente.

Palavras não definem o quanto de gratidão tenho pelo meu orientador Prof. Benner, que com toda calma e paciência guiou da melhor forma possível nosso projeto até aqui. Sem dúvidas eu tive a melhor pessoa como orientador, mais uma vez Deus prepara as pessoas certas pra colocar em nossas vidas, e eu só tenho a agradecer a ele pela oportunidade de tê-lo conhecido e ter sido sua orientada.

Agradeço a minha família (Pai, Mãe, Irmã, Cunhado, Esposo e Sobrinha) pelo apoio de sempre. Aos meus Pais especialmente pela luta de sempre pra nos dar o melhor, dedico mais essa conquista a eles. A minha sobrinha que foi o presente mais lindo que já recebi e que no auge dos seus 4 meses já contribuiu tanto na minha vida e na realização deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que essa pesquisa se tornasse uma realidade.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Os folículos pré-antrais constituem a principal reserva reprodutiva em fêmeas e são classificados em primordiais, de transição, primários e secundários. A criopreservação tem sido uma ferramenta promissora para a preservação da fertilidade feminina, principalmente em mulheres submetidas a tratamentos contra o câncer ou com problemas reprodutivos. Nesse tipo de abordagem, é de extrema importância a preservação da reserva folicular assim como a funcionalidade tecidual, pois posteriormente a reserva folicular poderá ser submetida a técnicas de reprodução assistida como cultivo *in vitro* e transplante. Diversos protocolos e substâncias são rotineiramente avaliados para o desenvolvimento do processo de criopreservação para posterior transplante. Dentre eles, o resveratrol possui ação antioxidante minimizando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) durante a vitrificação e cultivo *in vitro*. Os recentes avanços em nanotecnologia expandiram suas possíveis aplicações na biomedicina, assim as nanopartículas vem sendo utilizadas em tratamentos oncológicos como um carreador de fármacos. Outros estudos reportaram o desenvolvimento de diversas formulações de nanopartículas com potencial antioxidante, anti-inflamatório e antibiótico. Dessa forma, as nanopartículas têm demonstrado resultados promissores na criopreservação de sêmen e cultivo de folículos pré-antrais.

Palavras chave: vitrificação; tecido ovariano; nanopartículas; folículos pré-antrais

ABSTRACT

The preantral follicles constitute the female reproductive reserve and are classified as primordial, transitional, primary, and secondary. Cryopreservation has been a promising tool for the preservation of female fertility, especially in women undergoing cancer treatment or with reproductive problems. In this type of approach, it is extremely important to preserve the follicular reserve, as well as the functionality of the tissue, since the follicular reserve will be subjected to assisted reproductive techniques such as *in vitro* culture and transplantation. Several protocols and substances are routinely evaluated for the development of the cryopreservation process. Among them, resveratrol has antioxidant action, minimizing the production of ROS during vitrification and *in vitro* culture. Recent advances in nanotechnology have expanded its possible applications in biomedicine, therefore nanoparticles have been used in cancer treatments as a drug carrier. Other studies have reported the development of several nanoparticle formulations with antioxidant, anti-inflammatory and antibiotic potential. Thus, nanoparticles have shown promising results in cryopreservation of semen and *in vitro* culture of preantral follicles.

Keywords: vitrification; ovarian tissue, nanoparticles; preantral follicles

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Folículos Pré-antrais	2
2.2 Criopreservação de Tecido Ovariano.....	2
2.3 Resveratrol.....	3
2.4 Nanopartículas de Sílica	4
2.5 Considerações finais.....	5
REFERÊNCIAS.....	5
CAPÍTULO 2 - VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO COM RESVERATROL E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA	7
1 INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1 Síntese das nanopartículas de sílica.....	10
2.2 Funcionalização das SiNPs.....	10
2.3 Encapsulamento do resveratrol com SiNPs	11
2.4 Ovários e desenho experimental.....	11
2.5 Vitrificação e aquecimento do tecido ovariano	12
2.6 Cultivo in vitro do tecido ovariano	13
2.7 Morfologia e densidade folicular.....	13
2.8 Densidade de células do estroma ovariano	14
2.9 Análise estatística	14
3. RESULTADOS	15
3.1 Folículos morfolologicamente normais.....	15
3.2 Ativação folicular	18
3.3 Densidade folicular.....	20
3.4 Densidade de células do estroma ovariano	21
4. DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho experimental realizado para investigar o efeito crioprotetor do resveratrol e das nanopartículas de sílica sobre o tecido ovariano bovino vitrificado seguido de cultivo *in vitro*. Fragmentos do córtex ovariano bovino foram distribuídos nos seguintes tratamentos: Controle, fragmentos frescos e fixados; VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; e RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica. Em seguida, os fragmentos foram aquecidos e cultivados *in vitro* por 7 dias.12
- Figura 2.** Percentual (média $\pm$ epm) de folículos pré-antrais morfologicamente normais avaliados em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.16
- Figura 3.** Percentual (média $\pm$ epm) de folículos primordiais e ativados (folículos de transição, primário e secundário) morfologicamente normais observados após 7 dias de cultivo *in vitro* em fragmentos de tecido ovariano bovino vitrificados/aquecidos com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica.17
- Figura 4.** Percentual (média $\pm$ epm) de ativação folicular (folículos de transição, primário e secundário) observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.19
- Figura 5.** Densidade (média $\pm$ epm) folicular observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.21
- Figura 6.** Densidade (média $\pm$ epm) de células do estroma observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*. ..22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise da associação entre os tratamentos (VIT, RES, SiNPs e RES/SiNPs) utilizados para a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano bovino e a presença de folículos morfolologicamente normais após 7 dias de cultivo in vitro....	18
Tabela 2. Análise da associação entre os tratamentos (VIT, RES, SiNPs e RES/SiNPs) utilizados para a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano bovino e a presença de folículos ativados (folículos de transição, primário e secundário) após 7 dias de cultivo in vitro.	20

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há uma demanda por soluções relacionados a preservação de folículos pré-antrais com aplicação na clínica reprodutiva para mulheres que apresentam comprometimento prematuro da atividade ovariana devido ao tratamento com quimioterápicos. Os folículos pré-antrais apresentam a vantagem de poderem ser coletados e preservados em qualquer idade da vida reprodutiva da fêmea sem que haja a necessidade de tratamento hormonal (DONFACK et al., 2017).

A criopreservação é um método de congelamento para a preservação de tecidos biológicos, podendo ser realizado de forma lenta ou rápida (vitrificação), sendo o último o método de preferência por causar menor injúria celular (LUNARDI, 2015). Para a criopreservação do tecido ovariano, diversos compostos e métodos vem sendo estudados com o objetivo de minimizar os danos celulares durante o processo de congelamento e aquecimento (LEAL et al., 2018; SILVA et al., 2018). Entre eles, podemos destacar o resveratrol (ROCHA et al., 2018), um polifenol sintetizado por diversas plantas que possui propriedades biológicas com aplicação terapêutica como: anticarcinogênico, antioxidante, anti-inflamatório, proteção do sistema cardiovascular e antiobesidade.

Recentes avanços em nanotecnologia, têm revolucionado a aplicação terapêutica de compostos em diversas áreas da medicina incluindo a reprodução (FEUGANG et al., 2015). Devido as propriedades físicas e químicas, as nanopartículas possibilitam maior estabilidade, solubilidade e efeito biológico aos compostos carregados (FALCHI et al., 2018). Portanto, a proposta deste projeto foi avaliar o uso do resveratrol, um potente agente antioxidante e anti-inflamatório, em associação ou não com nanopartículas de sílica. Devido a biocompatibilidade com diferentes fluidos biológicos, as nanopartículas podem ser utilizadas como dispositivos carreadores de substâncias para potente interações celulares. Portanto, o projeto tem como destaque a inovação, uma vez que ainda não foi testado a associação entre resveratrol e as nanopartículas de sílica para a vitrificação de tecido ovariano bovino. Além disso, o bovino pode ser considerado um modelo animal para realização de experimentos translacionais para posterior aplicação na clínica reprodutiva feminina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Folículos Pré-antrais

Os folículos ovarianos são classificados em pré-antrais (primordiais e ativados: primários, transição e secundários) e antrais caracterizados pela formação do antro (van den HURK and ZHAO, 2005). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90-95% da população folicular, ou seja, armazenam a maioria dos ovócitos presentes no ovário (KIM, 2012). Esses folículos são considerados a unidade básica do ovário dos mamíferos, sendo essa reserva estabelecida durante o desenvolvimento neonatal, e progressivamente utilizada após a puberdade, esgotando-se durante a vida reprodutiva (EDSON et al., 2009).

A composição dos folículos primordiais se dá pelas células da pré-granulosa e células adjacentes, sendo a sua participação na ativação folicular não totalmente compreendida. Sabe-se que a ativação depende de fatores específicos (REN et al., 2015) relacionados ao oócito e células da granulosa (UDA et al., 2004). A interação entre as células da granulosa e o oócito são essenciais para o crescimento folicular (MATZUK et al., 2002) e a ativação de alguns folículos, enquanto que a maioria permanecem em repouso, sugere que a inibição local é a causa mais provável (MONGET et al., 2012).

2.2 Criopreservação de Tecido Ovariano

A criopreservação consiste em um método de preservação de material biológico em temperaturas baixas por tempo indeterminado, esse processo pode ser realizado através do congelamento convencional (método lento) ou vitrificação (método rápido). No congelamento convencional ocorre a diminuição gradual da temperatura, sendo comum a formação de gelo intracelular levando a danos na célula. Ao contrário, na vitrificação a curva de resfriamento ocorre com uma redução brusca da temperatura, fazendo com que a água passe do seu estado líquido para um estado vítreo amorfo, reduzindo a formação de cristais de gelo (LUNARDI, 2015).

Os folículos pré-antrais podem ser armazenados ou criopreservados em qualquer estágio da vida reprodutiva, sem que se faça necessário a utilização de tratamento hormonal. Apesar de alguns estudos apontarem taxas de viabilidade ainda baixas após a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA), o número absoluto de FOPA remanescentes viáveis após o

congelamento/descongelamento representam uma importante população de células que podem ser cultivadas *in vitro* ou transplantadas, visando a restauração da função endócrina e da fertilidade feminina (DONFACK et al., 2017).

Durante o processo de vitrificação pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) por diferentes mecanismos tais como aumento do metabolismo oxidativo, o stress osmótico, ou mesmo por alterações nos mecanismos de defesa celular. O aumento de EROS está mais relacionado a fase de descongelamento, uma vez que o oxigênio será reintroduzido na célula criopreservada e causará reações de oxidação e redução que levam a sua produção e a danos na células (ROCHA et al., 2018).

Os radicais livres como os EROS interagem com os oócitos e reduzem a taxa de desenvolvimento, sendo importante reduzir a formação desses compostos durante a criopreservação e descongelamento de ovários e folículos para aumentar a eficácia desse tipo de procedimento (RANJBAR et al. 2019).

2.3 Resveratrol

O resveratrol é uma fitoalexina produzida por diversas plantas (eucalipto, amora, uva). Na uva o resveratrol é sintetizado na casca como resposta ao stress causado por fungos, danos mecânicos ou por irradiação ultravioleta. O composto é sintetizado de duas formas: trans-resveratrol e cis-resveratrol sendo esta última a forma mais estável (SAUTTER et al., 2005) e utilizada. O resveratrol possui diversas propriedades biológicas com aplicações terapêuticas, a saber: anti-carcinogênico, antioxidante, antiobesidade, anti-inflamatório, protege o sistema cardiovascular, e tem ação contra distúrbios reprodutivos (infertilidade associada a idade e síndrome do ovário policístico). Dessa forma, diversos estudos têm sido conduzidos, dentre eles a utilização do resveratrol como alternativa para a criopreservação de folículos pré-antrais. Recente estudo, demonstrou o efeito positivo do resveratrol contra a degeneração folicular após o processo de vitrificação do tecido ovariano (ROCHA et al., 2018). Esse componente protege a função mitocondrial pela ativação do gene sirtuína-1 que está presente nas células da granulosa, oócitos e blastocistos (MORITA et al., 2012).

Rocha et al. (2018) demonstraram em seu estudo que folículos criopreservados com resveratrol apresentaram diâmetros foliculares menores comparados aos criopreservados sem a adição do antioxidante. A integridade da

membrana mitocondrial é essencial para que se mantenha a viabilidade celular, uma vez que alterações em sua permeabilidade pode levar ao aumento de água intracelular aumentando o volume da célula e levando a presença de vacúolos intracelulares e degeneração celular. A hipótese levantada pelos autores é que o resveratrol atua no equilíbrio osmótico durante a vitrificação, evitando a entrada de água e solutos na célula durante o processo de descongelamento, quando o metabolismo é reestabelecido, além de preservar proteínas transmembrana (aquaporinas) responsáveis por transportar os agentes crioprotetores.

2.4 Nanopartículas de Sílica

Diversas linhas de pesquisa podem ser beneficiadas com o uso da nanotecnologia, um campo emergente da biotecnologia. Na aplicação terapêutica, as nanopartículas constituem um promissor sistema carreador de drogas, pois propiciam estabilidade, absorção e transferência tissulares com excelente capacidade farmacodinâmica (FEUGANG et al., 2015). No tratamento do câncer, as nanopartículas podem estar associadas com diferentes combinações de drogas revestidas por polímeros que possibilitam o aumento da interação com as células alvo, direcionando a distribuição do agente terapêutico (ASLA et al., 2013).

A sílica é um composto eletricamente neutro cuja as unidades estruturais são tetraedros de SiO_4 . É o segundo elemento mais abundante na atmosfera, perdendo apenas para o oxigênio. Se encontra em vários tecidos (animais e vegetais) e pode se apresentar na forma de óxido cristalino ou não cristalino e em associação com outros elementos como sódio, potássio e magnésio (BELINI, 2012). A preparação de nanopartículas de sílica tem se mostrado interessante devido a propriedade de confinamento quântico e partículas esféricas monodispersas de sílica podem ser produzidas por hidrólise de tetraetilortossilicato (TEOS) em meio etanólico na presença de amônia (ARANTES et al., 2012). Na medicina reprodutiva, desenhos experimentais com diferentes aplicações de nanopartículas têm demonstrado resultados promissores na criopreservação de sêmen (ISAAC et al., 2017), marcação espermática (FEUGANG et al., 2017) e cultivo de in vitro de folículos pré-antrais (ANTONINO et al., 2018).

2.5 Considerações finais

Considerando os benefícios expostos, a criopreservação de tecido ovariano utilizando o resveratrol e as nanopartículas de sílica pode ser mais uma alternativa para a preservação da reserva de folículos pré-antrais inclusa em tecido ovariano.

REFERÊNCIAS

Antonino DC, Soares MM, Júnior, JM et al. 2018 Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. *RBMO*. **3** 300-311 (doi: [10.1016/j.rbmo.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013))

Arantes TM, Pintoa, HA, Leite, ER et al. 2012 Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. *Col. and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspec.* **415** 209–217. (doi: [10.1016/j.colsurfa.2012.09.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.041))

Asla B, Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G 2013 Nanotechnology in cancer therapy. *NIH Public Access*. **21** 904–913. (doi: [10.3109/1061186X.2013.837469](https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.837469))

Belini, T. C. Síntese e caracterizações de nanopartículas de sílica contendo íons de cobre (II) para aplicação agroquímica. 2012. 89 f. Dissertação (Mestre em Química orgânica) – Instituto de química, Universidade de Campinas, Campinas.

Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR et al. 2017 Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote* **4** 391–403. (doi: [10.1017/s0967199417000338](https://doi.org/10.1017/s0967199417000338))

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM 2009 The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* **30** 624-712. (doi: [10.1210/er.2009-0012](https://doi.org/10.1210/er.2009-0012))

Falchi L, Galleri G, Dore GM et al. 2018 Effect of exposure to CeO₂ nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4 °C for 96 hours. *Reprod Biol and Endoc* **16** 1-10 (doi: [10.1186/s12958-018-0339-9](https://doi.org/10.1186/s12958-018-0339-9))

Feugang JM 2017 Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Mol Reprod Dev.* **84** 832–841 (doi: [10.1002/mrd.22831](https://doi.org/10.1002/mrd.22831))

Feugang JM, Liao SF, Crenshaw MA et al. 2015 Lectin-Functionalized Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Reproductive Improvement. *JFIV Reprod Med Genet*. **3**. (doi: [10.4172/2375-4508.1000145](https://doi.org/10.4172/2375-4508.1000145)).

Isaac AV, Kumari S, Nair R et al. 2017 Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. / *Bioch. and Biophys. Resea. Commun.* **494** 656-662. (doi: [10.1016/j.bbrc.2017.10.112](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.112).)

Kim JY 2012 Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin. Exp. Reprod. Med.* **39**: 10–14. (doi: [10.5653/cerm.2012.39.1.10](https://doi.org/10.5653/cerm.2012.39.1.10).)

Leal ÉSS, Vieira LA, Sá NAR. et al. 2018 In vitro growth and development of isolated secondary follicles from vitrified caprine ovarian cortex. *Reprod Fertil Dev.* **30** 359-370. (doi: [10.1071/RD16487](https://doi.org/10.1071/RD16487).)

Lunardi, FO. Vitrificação e cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos: uma alternativa para a preservação da função reprodutiva de fêmeas. 2015. 165 f. Tese (Doutor em ciências veterinárias) - Programa de pós-graduação em ciências Veterinárias da faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará, fortaleza.

Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig, JJ 2002 Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Scien.* **296** 2178–2180. (doi: [10.1126/science.1071965](https://doi.org/10.1126/science.1071965))

Monget P, Bobe J, Gougeon A et al. 2012 The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Mol. Cell. Endoc.* **356** 2–12 (doi: [10.1016/j.mce.2011.07.046](https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.046).)

Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T et al. 2012 Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endoc.* **23** 10- 14. (doi: [10.1186/1477-7827-10-14](https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-14))

Ranjbar A, Eslampour MA, Moghadam MF 2019 Effect of Cysteamine and 13-Cis-Retinoic Acid on Bovine In Vitro Embryo Production. *Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi.* **2** 231-237 (doi: [10.9775/kvfd.2018.20778](https://doi.org/10.9775/kvfd.2018.20778))

Ren, Y, Suzuki H, Jagarlamudi K et al. 2015 Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol* **13** 624–712. (doi: [10.1186/s12915-015-0151-3](https://doi.org/10.1186/s12915-015-0151-3))

Rocha CD, Soares MM, Antonino DC et al. 2018 Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. *Theriog.* **114** 244-251. (doi: [10.1016/j.theriogenology.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.004).)

Sautter, CK Denardin S, Alves AO et al. 2005 Determinação de resveratrol em sucos de uva no brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **25** 437-442 (doi: [10.1590/S0101-20612005000300008](https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000300008))

Silva LM, Mbemba GT, Guerreiro DD et al. 2018 Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine Ovarian Tissue. *Biop. Biob.* **16** 258-269. (doi: [10.1089/bio.2017.0122](https://doi.org/10.1089/bio.2017.0122))

Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, et al. 2004 Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* **13** 1171–1181 (doi: [10.1093/hmg/ddh124](https://doi.org/10.1093/hmg/ddh124))

Van Den Hurk R, Zhao J 2005 Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriog.* **63** 1717-51. (doi: [10.1016/j.theriogenology.2004.08.005](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005))

CAPÍTULO 2 - VITRIFICAÇÃO DE TECIDO OVARIANO COM RESVERATROL E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

*(Artigo formatado de acordo com as normas
do periódico Reproduction; Fator de impacto = 3,206)*

P T B Aguiar¹, T M Arantes², M M Soares³, R M Santos³, M R F MACHADO⁴, K Saturnino⁴, M L Gambarini⁵, K A Alves⁶, B G Alves¹

¹Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade Federal de Jataí, Jataí, Brasil, ²Laboratório de Química da Universidade Federal de Jataí, Jataí, Brasil, ³Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil, ⁴Laboratório de Morfofisiologia da Universidade Federal de Jataí, Jataí, Brasil, ⁵Núcleo de Estudos e Pesquisa em Reprodução Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, ⁶Centro Universitário do Triângulo, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, Brasil

RESUMO

A vitrificação do tecido ovariano pode induzir danos teciduais e comprometer a funcionalidade celular. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do resveratrol e das nanopartículas de sílica sobre a vitrificação de tecido ovariano seguida de cultivo *in vitro* em modelo animal bovino. Ovários (n = 10) foram coletados em abatedouro local e fragmentos do córtex ovariano foram distribuídos nos seguintes tratamentos: (1) Controle fresco, fixado imediatamente após a fragmentação; (2) VIT, fragmentos ovarianos vitrificados; (3) RES, fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol; (4) SiNPs, fragmentos ovarianos vitrificados com SiNPs e; (5) RES/SiNPs, fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol associado à SiNPs. Após a vitrificação/aquecimento e cultivo *in vitro* as amostras foram avaliadas quanto a morfologia, ativação folicular, densidade folicular e celular. Os principais achados foram: (1) fragmentos ovarianos vitrificados com RES/SiNPs possuem mais chances (5,9 vezes; $P < 0,05$) de conter folículos normais ao final do cultivo em comparação com o tratamento VIT; (2) a probabilidade de ativação folicular foi maior (12,8 vezes; $P < 0.05$) no tratamento SiNPs em relação ao VIT e; (3) os tratamentos RES e RES/SiNPs apresentaram superior ($P < 0.05$) densidade folicular e celular em comparação ao tratamento VIT. Em síntese, o efeito

crioprotetor do resveratrol combinado com as SiNPs foi observado *in vitro* pela manutenção da viabilidade folicular e densidade das células do estroma ovariano. Além disso, a ativação folicular gradual de folículos primordiais observada possibilita o desenvolvimento de outros estudos com longos períodos de cultivo *in vitro*, suprimindo a depleção folicular que ocorre naturalmente quando fragmentos de tecido ovariano são submetidos à vitrificação.

Palavras chave: vitrificação; tecido ovariano; nanopartículas; folículos pré-antrais

ABSTRACT

The vitrification process can induce tissue ovarian damage and impair the cell functionality. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of resveratrol and silica nanoparticles on vitrification followed *in vitro* culture of bovine ovarian tissue. Ovaries (n = 10) were collected at slaughterhouse, divided into fragments, and randomly distributed to the following treatments: (1) Control, fresh ovarian fragments immediately fixed; (2) VIT, ovarian fragments vitrified, (3) RES, ovarian fragments vitrified with resveratrol; (4) SiNPs, ovarian fragments vitrified with silica nanoparticles; (5) RES/SiNPs, ovarian fragments vitrified with resveratrol and silica nanoparticles. After vitrification/thawing and *in vitro* culture, the samples were evaluated for viability, follicular activation, and follicular and stromal cell densities. The main findings were: (1) ovarian fragments vitrified with RES/SiNPs are more likely (5.9 times; $P < 0.05$) to contain normal follicles after 7 days of culture than the VIT treatment; (2) the probability of follicular activation was higher (12.8 times; $P < 0.05$) in the SiNPs treatment in relation to VIT and; (3) the RES and RES/SiNPs treatments showed higher ($P < 0.05$) follicular and cell density compared to the VIT treatment. In summary, the cryoprotective effect of resveratrol combined with SiNPs was observed *in vitro* by maintenance of follicular viability and density of ovarian stromal cells. In addition, the moderate follicular activation observed can allow the development of other studies with long-term *in vitro* culture, overcome the follicular depletion that occurs naturally when fragments of ovarian tissue are subjected to vitrification process.

Keywords: vitrification; ovarian tissue, nanoparticles; preantral follicles

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência ovariana prematura em adolescentes e mulheres em idade reprodutiva é um dos efeitos colaterais mais comuns após o tratamento de neoplasias malignas com quimioterapia e/ou radioterapia. Atualmente, a criopreservação de ovócitos maduros e embriões são as únicas estratégias reconhecidas pela Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (DONNEZ e DOLMANS, 2017) para a preservação da fertilidade feminina. No entanto, em algumas situações (linfoma de Hodgkin's, neoplasias mamárias e leucemia) nas quais a terapia não pode ser adiada, a única abordagem disponível para a preservação da fertilidade é a criopreservação de tecido ovariano (CHITI et al., 2018). Embora experimental, a criopreservação de tecido seguida de transplante ortotópico têm sido utilizada com sucesso na clínica prática e mais de 130 crianças nasceram por meio da aplicação destes procedimentos em todo mundo (KLIJN et al., 2019).

Apesar dos avanços, a criopreservação e o cultivo *in vitro* ainda causam danos funcionais e estruturais relevantes no tecido ovariano como: (i) redução na expressão de proteínas de membrana (aquaporinas) (SALES et al., 2016), comprometimento das comunicações intercelulares e danos peroxidativos que causam perda da função celular em razão da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BUCAK et al., 2015). Durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano e/ou folículos pré-antrais os desafios são ainda maiores e estão direcionados para o desenvolvimento de sistemas de cultivo (bidimensional - 2D vs. tridimensional - 3D), composição de meios, uso de hormônios, antioxidantes e nanomateriais que mimetizam as condições *in vivo*, e portanto, permitam o crescimento de folículos imaturos, e consequente produção de ovócitos competentes aptos à fertilização *in vitro* (ARAÚJO et al., 2014).

Em função dos desafios reportados, agentes antioxidantes (catalase, SILVA et al., 2018; anetol, SÁ et al., 2019; resveratrol, ROCHA et al., 2018) têm sido utilizados na composição de meios para criopreservação e cultivo *in vitro*. Na medicina reprodutiva, o resveratrol tem sido adicionado em meios para: (i) cultivo *in vitro* de ovócitos (caprinos, GADANI et al., 2017); (ii) produção de embriões (bubalinos, LONGOBARDI et al., 2017) e; (iii) criopreservação de tecido ovariano (bovinos, ROCHA et al., 2018), ovócitos (suínos, GIARETTA et al., 2013) e sêmen (humanos, GARCEZ et al., 2010; bovinos, BUCAK et al., 2015). A função

antioxidante do resveratrol pode ser explicada pela sua capacidade de minimizar a produção de EROs, remover radicais superóxidos, inibir a peroxidação lipídica e regular a expressão de enzimas e cofatores antioxidantes (GIARETTA et al., 2013).

Os recentes avanços em nanotecnologia expandiram suas possíveis aplicações em tecnologias de reprodução assistida (FEUGANG, 2017). Na aplicação terapêutica, as nanopartículas constituem um sistema carreador de drogas, pois propiciam estabilidade e transferência tissulares com excelente capacidade farmacodinâmica (FALCHI et al., 2018). Neste sentido, as nanopartículas têm demonstrado resultados promissores na criopreservação de sêmen (ISAAC et al., 2017), marcação espermática (FEUGANG et al., 2015) e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (ANTONINO et al., 2019). Portanto, em função da necessidade de aprimoramento das biotécnicas de criopreservação e cultivo *in vitro*, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do resveratrol e das nanopartículas de sílica sobre a vitrificação de tecido ovariano seguida de cultivo *in vitro* em modelo animal bovino. Neste sentido, os seguintes parâmetros foram avaliados: (i) viabilidade folicular, (ii) ativação folicular, (iii) densidade folicular e (iv) densidade de células do estroma.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese das nanopartículas de sílica

As nanopartículas de SiO₂ (SiNPs) foram sintetizadas pelo método da hidrólise e condensação controlada do tetraetilortosilicato (TEOS) em meio alcoólico (ARANTES et al., 2012). Para tanto, 2,5 mL de TEOS foi dissolvido em etanol anidro (50 mL), e em seguida, numa solução contendo 2 mL de hidróxido de amônia e 1 mL de água. As soluções permaneceram sob agitação por 24 hs em temperatura ambiente. Posteriormente, a dispersão coloidal foi centrifugada (6000 rpm por 30 min), lavada em etanol para remoção dos reagentes iniciais e seca em placa de petri a 50°C.

2.2 Funcionalização das SiNPs

A superfície das nanopartículas foram modificadas com silano 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato (TMSPM) para o encapsulamento do resveratrol. Portanto, 1 g de SiNPs foi dispersa em etanol anidro (99 mL) com posterior adição de TMSPM,

seguindo a razão de 20 mmol/g SiO₂. A solução permaneceu sob agitação durante 24 hs a temperatura ambiente. Após este período, as nanopartículas foram centrifugadas (6000 rpm por 30 min), lavadas com etanol e dispostas em placa de petri para secagem em estufa a 50°C.

2.3 Encapsulamento do resveratrol com SiNPs

O encapsulamento do resveratrol com nanopartículas de sílica foi realizado pela simples mistura dos componentes. Para tanto, a solução aquosa de resveratrol (20 µM) foi misturada com as dispersões aquosas coloidais das nanopartículas, permanecendo sob agitação constante por 24 hs. Após este período, as nanopartículas foram centrifugadas (6000 rpm por 30 min) e lavadas com etanol para remoção do fármaco não encapsulado e, posteriormente, dispostas em placa de petri e secas em estufa a 50°C.

2.4 Ovários e desenho experimental

Ovários (n = 10) de fêmeas bovinas em idade reprodutiva (24 a 48 meses) foram coletados em abatedouro local. Após a coleta, foram lavados com álcool 70% (10 seg) e, posteriormente transportados para o laboratório em solução fosfatada tamponada (4°C). No laboratório, fragmentos do córtex ovariano (3 × 3 × 1 mm) foram obtidos com auxílio de bisturi e aleatoriamente distribuídos nos seguintes tratamentos (Figura 1): (1) Controle fresco, fixado imediatamente após a fragmentação; (2) VIT, fragmentos ovarianos vitrificados; (3) RES, fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol; (4) SiNPs, fragmentos ovarianos vitrificados com nanopartículas de sílica; (5) RES/SiNPs, fragmentos ovarianos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica. Cinco réplicas foram realizadas para cada tratamento (par ovariano = réplica). Todos os fragmentos foram avaliados logo após o aquecimento e nos dias D1 e D7 do cultivo in vitro.

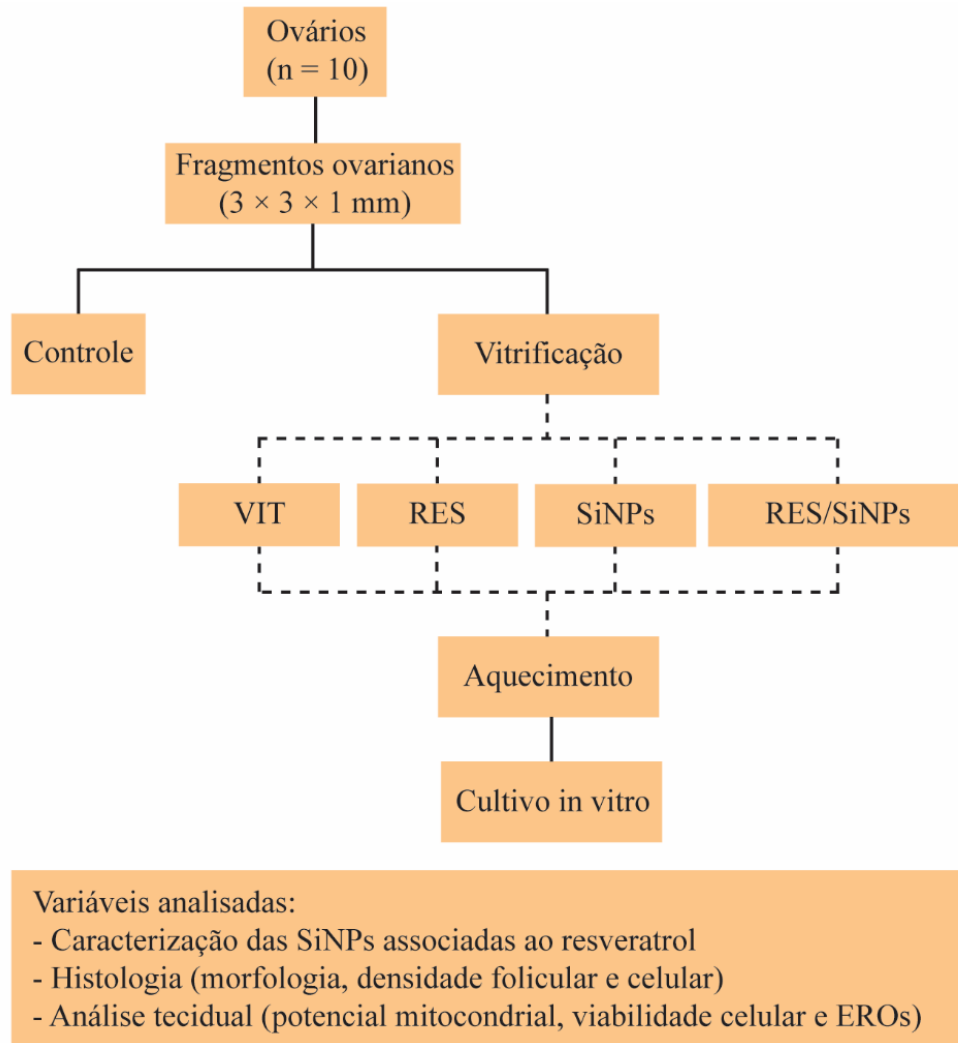


Figura 1. Desenho experimental realizado para investigar o efeito crioprotetor do resveratrol e das nanopartículas de sílica sobre o tecido ovariano bovino vitrificado seguido de cultivo in vitro. Fragmentos do córtex ovariano bovino foram distribuídos nos seguintes tratamentos: Controle, fragmentos frescos e fixados; VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; e RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica. Em seguida, os fragmentos foram aquecidos e cultivados in vitro por 7 dias.

2.5 Vitrificação e aquecimento do tecido ovariano

O procedimento de vitrificação e aquecimento foi realizado de acordo com ROCHA et al., (2018). Resumidamente, a vitrificação dos fragmentos ovarianos envolveu a exposição das amostras a duas soluções de vitrificação (SV) com diferentes concentrações de crioprotetores. A SV1, consistiu de TCM199

suplementado com 10 mg/mL de soro albumina bovina (BSA), 0,25M sucrose, 10% etilenoglicol (EG), e 10% dimetilsulfóxido (DMSO). A SV2 foi composta de TCM199 suplementado com 10 mg/mL BSA, 0,25 M sucrose, 20% EG, e 20% DMSO. Para os tratamentos RESV, SiNPs e SiNPs+RESV, as soluções SV1 e SV2 foram acrescidas com 20 μ M de resveratrol e/ou nanopartículas. As soluções de vitrificação adicionadas de nanopartículas foram submetidas à sonicação durante 10 minutos para melhor homogeneização do meio. Durante a vitrificação, os fragmentos ovarianos foram expostos a solução SV1 por 4 min e, em seguida, a solução SV2 por 1 min. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, os fragmentos foram envasados em palhetas com a solução SV2, expostos ao vapor de nitrogênio por 5 min (-120°C) e armazenados em nitrogênio líquido (-196°C).

Os fragmentos ovarianos foram expostos à temperatura ambiente (30 seg) e, em seguida, colocados em banho-maria a 37°C (1 min). Posteriormente, os fragmentos foram submetidos a três soluções de lavagem (SL) para remoção dos crioprotetores: SL1, TCM199 + 3 mg/mL BSA + 0,5 M sacarose; SL2, TCM199 + 3 mg/mL de BSA + 0,25 M sacarose; e SL3, TCM199 + 3 mg/mL BSA. As amostras foram mantidas em cada SL por 5 min.

2.6 Cultivo *in vitro* do tecido ovariano

Fragmentos ovarianos vitrificados e aquecidos foram cultivados *in vitro* por 7 dias em incubadora com umidade saturada à 38,5°C e 5% de CO₂. Os fragmentos foram cultivados em placas de 24 poços contendo 1000 μ L de meio TCM199 suplementado com 1% de ITS (10 μ g/mL de insulina; 5,5 μ g/mL de transferrina e 4 ng/mL selênio), 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 3 mg/mL BSA, 100 μ g/mL estreptomicina e 100 μ g/mL amicacina. O meio de cultivo foi parcialmente substituído a cada 48 horas.

2.7 Morfologia e densidade folicular

Os fragmentos ovarianos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 2 horas e mantidos em álcool 70% até a preparação histológica. Em seguida, foram embebidos em parafina e cortados em secções seriais (5 μ m). Cada secção foi montada e corada com ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina. As

secções foram avaliadas em microscópio óptico na objetiva 40× e somente folículos com núcleo dos ovócitos visualizados foram considerados.

Os folículos foram classificados quanto a morfologia em: normais, quando apresentavam um ovócito intacto circundado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas e, degenerados, quando apresentavam folículos com retração citoplasmática, camadas de células da granulosa desorganizadas e destacadas da membrana basal (GASTAL et al., 2017). Em adição, os folículos foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento em: primordial, ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso; transição, ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso e cubóide; primário, ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato cubóide; e secundário, ovócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide (DONFACK et al., 2018).

A densidade folicular foi determinada conforme descrito por ALVES et al., (2015). Todas as lâminas foram digitalizadas e o perímetro das secções histológicas delimitado por meio de um programa de edição de imagens (Adobe Photoshop CS4, São José, CA, EUA). Em seguida, a densidade folicular foi calculada pela seguinte fórmula: densidade folicular = número de folículos pré-antrais/área da secção ovariana em cm^2 .

2.8 Densidade de células do estroma ovariano

A densidade celular foi determinada a partir da avaliação de 10% do total das secções histológicas produzidas para cada fragmento ovariano (ALVES et al., 2016). Imagens aleatórias do córtex ovariano (3 campos de $50 \times 50 \mu\text{m} = 2500 \mu\text{m}^2$) foram obtidas com auxílio de microscópio óptico na objetiva de 40×. Em seguida, os núcleos das células estromais foram considerados para calcular a média da densidade celular por fragmento ovariano. A contagem foi realizada no software Image J (National Institute of Health, EUA) e todas as avaliações foram realizadas por um único operador.

2.9 Análise estatística

As análises foram realizadas por meio do software estatístico Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software, Inc., EUA). Os dados foram submetidos aos testes de

normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Levene). A comparação de médias entre os tratamentos foi avaliada pelo ANOVA seguida do teste de Kruskal-Wallis. Comparações em relação ao tratamento controle foram realizadas pelo teste de Dunnett. A análise de odds ratio verificou a associação entre os tratamentos utilizados para a vitrificação e a porcentagem de folículos normais e ativados. Os resultados estão apresentados na forma de média ($\pm$ erro padrão da média) e porcentagem e considerados significativos quando $P < 0,05$ (bilateral).

3. RESULTADOS

3.1 Folículos morfologicamente normais

O total de 2317 folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano foram avaliados em 1189 secções histológicas. A porcentagem de folículos normais foi inferior ($P < 0,05$) após a vitrificação/aquecimento no tratamento SiNPs em relação aos demais (Figura 2). No D1 do cultivo *in vitro*, o tratamento SiNPs apresentou menor proporção ($P < 0,05$) de folículos normais quando comparado aos tratamentos controle, VIT e RES/SiNPs. No D7 do cultivo *in vitro*, a proporção de folículos normais foi superior ($P < 0,05$) no tratamento RES/SiNPs em relação aos tratamentos VIT e RES. Além disso, ao final do cultivo *in vitro*, a proporção de folículos normais foi similar ($P > 0,05$) entre os tratamentos controle, SiNPs e RES/SiNPs. Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo, a porcentagem de folículos normais não diferiu ($P > 0,05$). No entanto, para os tratamentos VIT e RES, a porcentagem de folículos normais decresceu ($P < 0,05$) após 7 dias de cultivo, em comparação com o momento vitrificação/aquecimento.

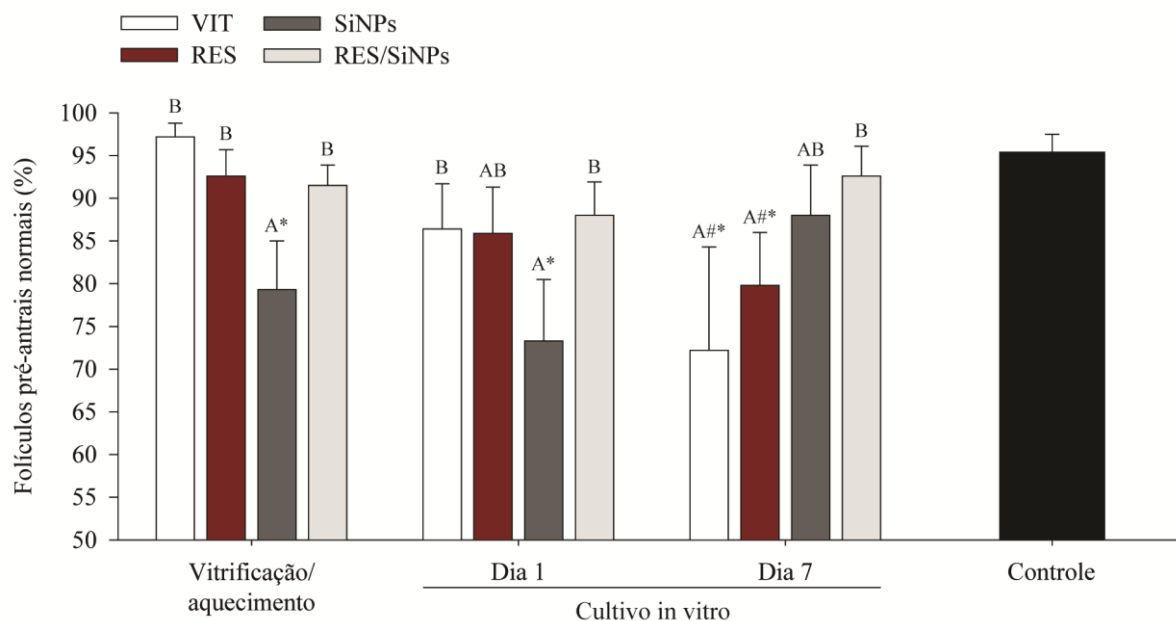


Figura 2. Percentual (média $\pm$ epm) de folículos pré-antrais morfologicamente normais avaliados em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.

^{AB} Dentro do mesmo parâmetro avaliado e entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo ($P > 0,05$).

[#] Dentro do mesmo tratamento difere do aquecimento ($P < 0,05$).

^{*} Difere do grupo controle ($P < 0,05$).

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

A porcentagem de folículos normais após o cultivo *in vitro* foi avaliada de acordo com a classe folicular (folículos primordiais ou ativados; **Figura 3**). A proporção de folículos primordiais normais foi similar ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Em contraste, o tratamento VIT apresentou menor proporção (tendência, $P = 0,06$) de folículos ativados normais (transição, primário e secundário) em relação ao tratamento RES/SiNPs. A análise de associação entre os tratamentos utilizados para vitrificação e a porcentagem de folículos normais após 7 dias de cultivo *in vitro* estão dispostas na **Tabela 1**. Fragmentos ovarianos vitrificado/aquecidos com RES/SiNPs apresentaram 5,9 vezes mais chances ($P < 0,01$) de conter folículos

morfologicamente normais ao final do cultivo *vitro* em comparação com o tratamento VIT.

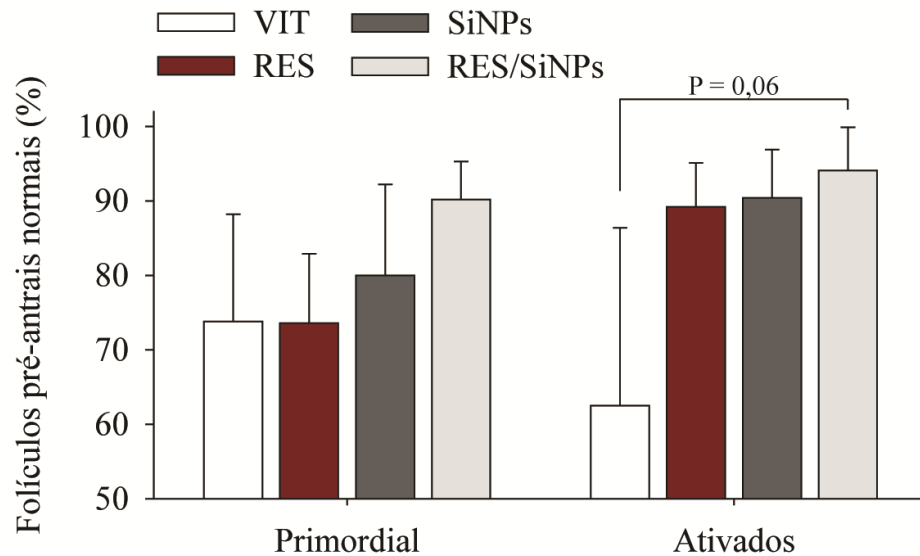


Figura 3. Percentual (média $\pm$ epm) de folículos primordiais e ativados (folículos de transição, primário e secundário) morfologicamente normais observados após 7 dias de cultivo in vitro em fragmentos de tecido ovariano bovino vitrificados/aquecidos com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica.

Dentro da mesma categoria folicular e entre os tratamentos ($P = 0,06$).

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

Tabela 1. Análise da associação entre os tratamentos (VIT, RES, SiNPs e RES/SiNPs) utilizados para a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano bovino e a presença de folículos morfologicamente normais após 7 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Folículos normais (%)		
VIT	68,7 (11/16)		
RES	87,2 (68/78)		
SiNPs	87,9 (29/33)		
RES/SiNPs	92,9 (79/85)		
Comparações	Odds ratio	IC 95%	Valor de P
RES vs. VIT	3,1	0,8 – 10,7	0,1446
SiNPs vs. VIT	3,2	0,7 – 14,5	0,2193
RES/SiNPs vs. VIT	5,9	1,5 – 22,9	0,0159
SiNPs vs. RES	1,0	0,3 – 3,6	0,8326
RES/SiNPs vs. RES	1,9	0,6 – 5,6	0,3313
RES/SiNPs vs. SiNPs	1,8	0,4 – 6,8	0,6044

IC, intervalo de confiança.

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

3.2 Ativação folicular

A porcentagem de ativação folicular foi avaliada nos fragmentos ovarianos após a vitrificação/aquecimento e cultivo *in vitro* (Figura 4). Após a vitrificação/aquecimento, o tratamento SiNPs apresentou maior ($P < 0,05$) taxa de folículos ativados quando comparado aos tratamentos RES e RES/SiNPs. Em adição, após a vitrificação/aquecimento, a ativação folicular foi maior ($P < 0,05$) nos tratamentos VIT e SiNPs em relação ao controle. No D1 do cultivo *in vitro*, a porcentagem de folículos ativados não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. No entanto, o tratamento SiNPs apresentou maior ($P < 0,05$) proporção de folículos ativados em comparação ao controle. No D7 do cultivo *in vitro*, a ativação folicular foi maior ($P < 0,05$) nos tratamentos RES e SiNPs em relação aos tratamentos VIT e RES/SiNPs. Além disso, ao final do cultivo, os tratamentos RES, SiNPs e RES/SiNPs apresentaram maior ($P < 0,05$) porcentagem de folículos ativados em comparação ao controle. Quando analisados em relação ao momento

vitrificação/aquecimento e entre os dias de cultivo (D1 vs. D7), a ativação folicular aumentou ($P < 0,05$) ao final do cultivo dentro dos tratamentos RES e SiNPs.

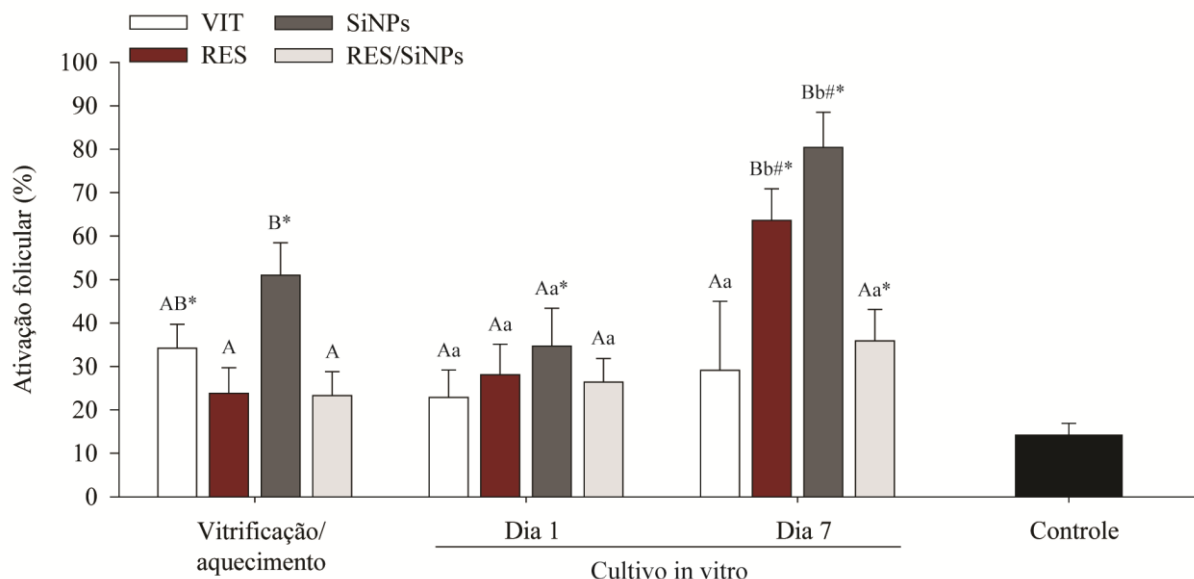


Figura 4. Percentual (média $\pm$ epm) de ativação folicular (folículos de transição, primário e secundário) observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.

^{AB} Dentro do mesmo parâmetro avaliado e entre os tratamentos ($P < 0,05$).

^{ab} Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

[#] Dentro do mesmo tratamento difere do aquecimento ($P < 0,05$).

^{*} Difere do grupo controle ($P < 0,05$).

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

A probabilidade de ativação folicular após a vitrificação/aquecimento seguido de cultivo *in vitro* foi determinada (Tabela 2). Fragmentos ovarianos vitrificados com SiNPs possuem 12,8 ($P < 0,01$) e 3,1 ($P < 0,05$) vezes mais chances de ativação folicular em relação aos tratamentos VIT e RES, respectivamente. Em adição, a probabilidade de ativação folicular foi superior nos tratamentos RES (3,2 vezes; $P < 0,001$) e SiNPs (10,3 vezes; $P < 0,0001$) em comparação ao tratamento RES/SiNPs.

Tabela 2. Análise da associação entre os tratamentos (VIT, RES, SiNPs e RES/SiNPs) utilizados para a vitrificação de fragmentos de tecido ovariano bovino e a presença de folículos ativados (folículos de transição, primário e secundário) após 7 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Folículos ativados (%)		
VIT	27,3 (3/11)		
RES	60,3 (41/68)		
SiNPs	82,7 (24/29)		
RES/SiNPs	31,6 (25/79)		
Comparações	Odds ratio	IC 95%	Valor de P
RES vs. VIT	4,0	0,9 – 16,6	0,0857
SiNPs vs. VIT	12,8	2,4 – 65,9	0,0030
RES/SiNPs vs. VIT	1,2	0,3 – 5,0	0,9569
SiNPs vs. RES	3,1	1,1 – 9,3	0,0551
RES vs. RES/SiNPs	3,2	1,6 – 6,4	0,0009
SiNPs vs. RES/SiNPs	10,3	3,5 – 30,3	0,0001

IC, intervalo de confiança.

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

3.3 Densidade folicular

Os resultados de densidade folicular estão dispostos na **Figura 5**. No geral, todos os tratamentos apresentaram uma redução ($P < 0,05$) da densidade folicular após a vitrificação/aquecimento e cultivo *in vitro* em comparação ao controle. Após a vitrificação/aquecimento, a densidade folicular foi maior ($P < 0,05$) no tratamento RES em relação aos demais. No D1 do cultivo, a densidade folicular foi maior no tratamento RES quando comparado ao tratamento SiNPs. No D7 do cultivo, os tratamentos RES e RES/SiNPs apresentaram maior ($P < 0,05$) densidade folicular em comparação ao tratamento VIT. Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo (D1 vs. D7), a porcentagem de folículos normais reduziu ($P < 0,05$) somente no tratamento VIT. Em relação ao momento vitrificação/aquecimento, os tratamentos VIT, RES e RES/SiNPs apresentaram menor densidade folicular ($P < 0,05$) no D7 do cultivo *in vitro*.

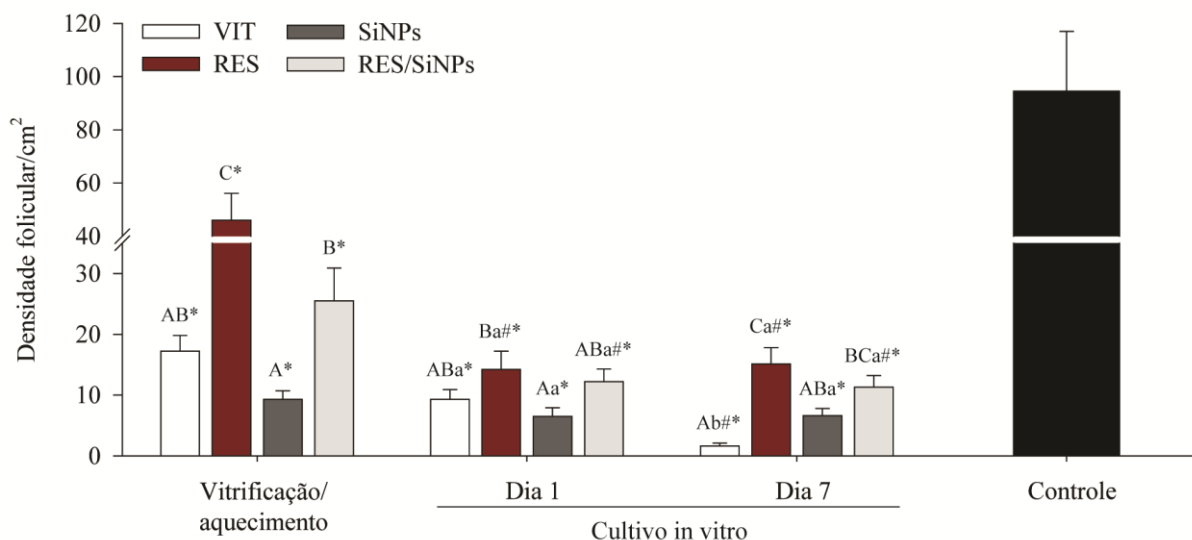


Figura 5. Densidade (média $\pm$ epm) folicular observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.

ABC Dentro do mesmo parâmetro avaliado e entre os tratamentos ($P < 0,05$).

ab Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

Dentro do mesmo tratamento difere do aquecimento ($P < 0,05$).

* Difere do grupo controle ($P < 0,05$).

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

3.4 Densidade de células do estroma ovariano

A densidade celular foi avaliada após a vitrificação/aquecimento e cultivo *in vitro* (Figura 6). Após a vitrificação/aquecimento, o tratamento SiNPs apresentou maior ($P < 0,05$) densidade celular quando comparado aos tratamentos controle, VIT e RES. No D1 do cultivo *in vitro*, o tratamento RES apresentou maior ($P < 0,05$) densidade celular quando comparado ao tratamento SiNPs. No D7 do cultivo *in vitro*, a densidade celular foi superior ($P < 0,05$) nos tratamentos RES e RES/SiNPs em comparação ao tratamento VIT. Em adição, ao final do cultivo, o tratamento RES/SiNPs apresentou densidade celular maior ($P < 0,05$) em relação ao controle. A densidade celular dentro do tratamento SiNPs foi inferior ($P < 0,05$) nos dias D1 e D7 do cultivo em comparação ao momento vitrificação/aquecimento. Dentro do mesmo

tratamento e entre os dias de cultivo (D1 vs. D7), a densidade celular decresceu ($P < 0,05$) somente no tratamento VIT.

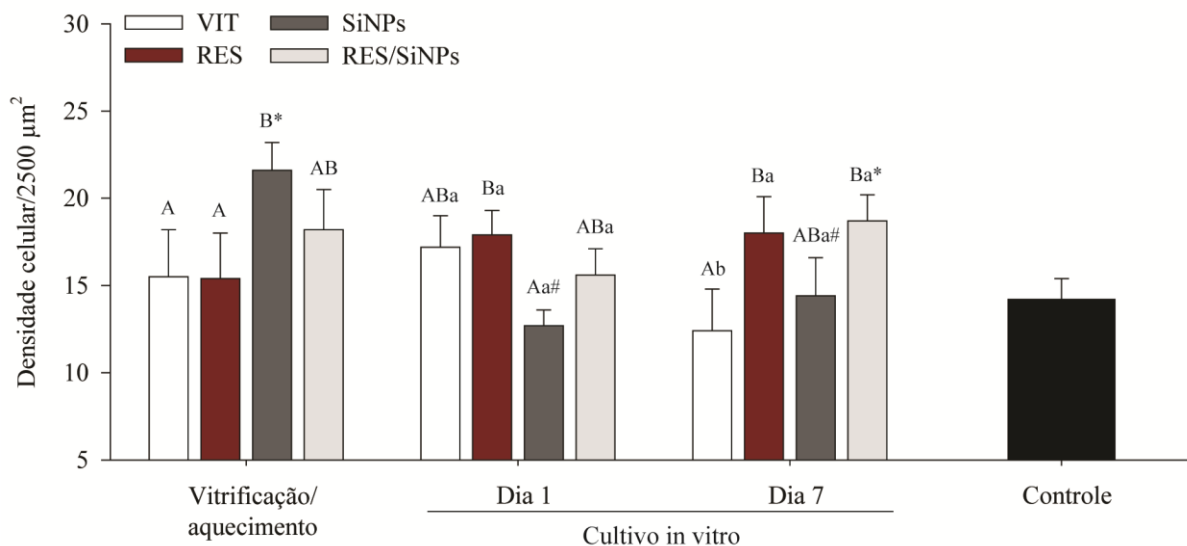


Figura 6. Densidade (média $\pm$ epm) de células do estroma observada em fragmentos de tecido ovariano bovino após a vitrificação/aquecimento com resveratrol associado ou não a nanopartículas de sílica seguido de cultivo *in vitro*.

^{AB} Dentro do mesmo parâmetro avaliado e entre os tratamentos ($P < 0,05$).

^{ab} Dentro do mesmo tratamento e entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

[#] Dentro do mesmo tratamento difere do aquecimento ($P < 0,05$).

^{*} Difere do grupo controle ($P < 0,05$).

VIT, fragmentos vitrificados; RES, fragmentos vitrificados com resveratrol; SiNPs, fragmentos vitrificados com nanopartículas de sílica; RES/SiNPs, fragmentos vitrificados com resveratrol associado à nanopartículas de sílica.

4. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou pela primeira vez o efeito crioprotetor do resveratrol associado à nanopartículas de sílica sobre o tecido ovariano bovino vitrificado seguido do cultivo *in vitro*. Os principais achados foram: (1) fragmentos ovarianos vitrificados com RES/SiNPs possuem mais chances (5,9 vezes) de conter folículos normais ao final do cultivo em comparação com o tratamento VIT; (2) a probabilidade de ativação folicular foi maior (12,8 vezes) no tratamento SiNPs em relação ao VIT e; (3) os tratamentos RES e RES/SiNPs apresentaram superior

densidade folicular e celular em comparação ao tratamento VIT após 7 dias de cultivo.

Fragmentos ovarianos do tratamento RES/SiNPs apresentaram superior porcentagem de folículos pré-antrais normais em comparação ao tratamentos RES e VIT após o D7 do cultivo *in vitro*. Além disso, maior proporção de folículos ativados normais (transição, primário e secundários) foi observada no tratamento RES/SiNP em relação ao VIT. O efeito antioxidante do resveratrol sobre os folículos pré-antrais foi reportado durante a vitrificação de tecido ovariano em fetos bovinos (ROCHA et al., 2018). Durante o cultivo *in vitro* de folículos antrais bovinos (SUGIYAMA et al., 2019), o resveratrol regulou positivamente a expressão gênica de sirtuina-1 (SIRT-1) em ovócitos e células da granulosa, assim como a reposição mitocondrial e indução da autofagia em ovócitos (HARA et al., 2018); mecanismo responsável pela renovação de organelas celulares. Em camundongos (LIU et al., 2013), o efeito idade sobre a fertilidade foi avaliado e fêmeas idosas tratadas com resveratrol exibiram maior proporção de folículos primordiais e primários em comparação ao controle. No entanto, o resveratrol possui dose-dependente efeito *in vitro* sobre: a fragmentação do DNA em folículos secundários cultivados (MACEDO et al., 2017) e desenvolvimento embrionário inicial (LIU et al., 2013). Nossos achados sugerem que a combinação resveratrol e SiNPs durante a vitrificação de tecido ovariano preservou a viabilidade folicular ao longo do cultivo *in vitro*. Possivelmente, a nanopartícula protegeu o resveratrol de uma rápida degradação preservando suas propriedades terapêuticas (anti-inflamatório, antioxidante) e permitindo sua atuação efetiva, durante o processo de vitrificação/aquecimento, e residual ao longo do cultivo *in vitro*.

No presente estudo, a porcentagem de folículos ativados ao final do cultivo *in vitro* foi superior nos tratamentos RES e SiNPs. No geral, estes tratamentos apresentaram maior probabilidade (RES, 3,2 vezes; SiNPs, 10,3 vezes) de ativação folicular em comparação ao tratamento RES/SiNPs. Ovócitos em desenvolvimento dependem do microambiente formado pelo folículo e da sinalização bidirecional com as células somáticas (granulosa e/ou teca) (PALMA et al., 2012). O resveratrol influencia a atividade fisiológica das células da granulosa pela ativação da SIRT-1 (JOZKOWIAK et al., 2020), que por sua vez tem sido associada com proliferação celular (PAVLOVÁ et al., 2013), atividade secretória (MORITA et al., 2012), redução da apoptose (HAN et al., 2017), manutenção da homeostase celular (BENAYOUN et

al., 2011) e aumento da atividade mitótica (SHUBE et al., 2014). Neste sentido, recentes estudos em humanos (HAO et al., 2018) e ovinos (BEZERRA et al., 2018) reportaram o efeito estimulatório do resveratrol sobre a ativação folicular *in vitro*, redução da fragmentação do DNA e estimulação da proliferação celular. Em relação às SiNPs, estudos reportaram seu efeito estimulatório sobre a proliferação de células HT-29 (adenocarcinoma humano) (GEHRKE et al., 2013). Além disso, a influência das SiNPs foi observada sobre receptores do fator de crescimento epidermal (EGFr) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), ambas envolvidas na regulação de processos celulares como progressão do ciclo celular, diferenciação ou proliferação (WITTIG et al., 2017). Na reprodução, o efeito tóxico das SiNPs foi associado com a produção excessiva de EROs e estresse oxidativo (YU et al., 2014) e danos ao DNA espermático (ZHANG et al., 2016). Em ratas, a administração via oral de SiNPs induziu o desbalanço de hormônios esteróides, produção de EROs e, conseqüente, apoptose e atresia folicular (LIU et al., 2018). Nossos achados demonstraram que a utilização do resveratrol em associação com a SiNPs (RES/SiNPs) induziu uma ativação folicular moderada durante o cultivo *in vitro*. Tal ativação gradual em associação com a manutenção da viabilidade são pontos favoráveis a serem considerados durante um cultivo *in vitro* por longo tempo, uma vez que a reserva folicular foi preservada e não ativada de forma rápida (*burnout*). Os mecanismos de ação do resveratrol e das SiNPs sobre o desenvolvimento folicular *in vitro* ainda são indefinidos, portanto seus impactos sobre a saúde reprodutiva são dignos de atenção e devem ser investigados.

A densidade folicular reduziu em todos os tratamentos após a vitrificação/aquecimento e cultivo *in vitro* quando comparados ao controle. No entanto, ao final do cultivo, os tratamentos RES e RES/SiNPs apresentaram densidade folicular ~9 e ~7 vezes maior, respectivamente em relação ao tratamento VIT. A densidade folicular é um importante parâmetro que deve ser considerado na avaliação de fragmentos ovarianos submetidos a diferentes abordagens reprodutivas (biópsia ovariana, BRANDÃO et al., 2018; cultivo *in vitro*, DONFACK et al., 2018; transplante de tecido ovariano, PINTO et al., 2020; criopreservação, DONFACK et al., 2019). Diversos fatores estão associados a depleção da densidade folicular e são inerentes às abordagens utilizadas: (1) cultivo *in vitro*, desbalanço entre fatores inibitórios e estimulatórios que controlam a ativação de folículos primordiais, induzindo a ativação folicular precoce (*burnout*) (SMITZ et al., 2010); (2)

criopreservação, estresse oxidativo devido a produção excessiva de EROs (SHAHSAVARI et al., 2020) e; (3) transplante de tecido ovariano, inadequado suprimento vascular que causa isquemia levando a degeneração folicular (PINTO et al., 2020). Em relação ao resveratrol, sua capacidade de penetrar na membrana plasmática durante a fase de gel (mais rígida) (BRITTES et al., 2010) permite sua interação com os radicais lipídicos aumentando a fluidez da membrana e controlando a peroxidação (FEI et al., 2018). Dessa forma, sua ação antioxidante pode minimizar danos ao DNA (BRANCO et al., 2010) e consequente depleção da densidade folicular durante a criopreservação/aquecimento e posterior cultivo *in vitro*. As nanopartículas têm sido utilizadas para a criopreservação de sêmen (BARKALINA et al., 2014), tecido testicular (POELS et al., 2016), ovócitos (LI et al., 2016), tecido ovariano (LEONEL et al., 2019) e células tronco pluripotentes induzidas (ITO et al., 2020). Portanto, quando adicionadas na solução de vitrificação, permitirá o aquecimento uniforme da amostra criopreservada (TAYLOR et al., 2019) reduzindo a formação de gelo intracelular durante o congelamento e consequente danos ao tecido (REMIÃO et al., 2018).

Neste estudo, após o cultivo *in vitro*, os tratamentos RES e RES/SiNPs apresentaram densidade celular superior em relação ao tratamento VIT. Neste mesmo momento, o tratamento RES/SiNPs foi o único que apresentou aumento da densidade celular em comparação ao controle. Entre os dias D1 e D7 do cultivo, a densidade celular decresceu somente no tratamento VIT. Nossos achados podem ser explicados pelas propriedades terapêuticas abordadas previamente para o resveratrol (proliferação celular, atividade mitótica e secretória) e as SiNPs (progressão do ciclo celular e diferenciação). A associação positiva da densidade celular com a porcentagem de folículos normais, fibras de colágeno do tipo I e densidade folicular foi demonstrada em fragmentos biópsia em equino (ALVES et al., 2016) e após o transplante de tecido ovariano em caprino (PINTO et al., 2020). A redução da densidade celular em fragmentos de tecido ovariano foi reportada após a criopreservação (DING et al., 2018), refrigeração e transporte (GASTAL et al., 2017), cultivo *in vitro* (OTALA et al., 2002), e transplante (WANG et al., 2013). As células do parênquima ovariano são essenciais para melhorar e eficiência no cultivo de folículos pré-antrais, uma vez que elas circundam e interagem com os folículos (AGUIAR et al., 2020). As células estromais são recrutadas para a formação das células da teca e produzem esteróides e fatores parácrinos essenciais para o

desenvolvimento ovocitário e folicular (PALMA et al., 2012). A associação do resveratrol com as SiNPs preservou a densidade celular ao longo do cultivo *in vitro* que por sua vez, pode ter contribuído para a manutenção da morfologia e viabilidade folicular.

Em síntese, o efeito crioprotetor do resveratrol combinado com as SiNPs foi observado *in vitro* pela manutenção da viabilidade folicular e densidade das células do estroma ovariano. Em adição, a ativação gradual de folículos primordiais observada pode permitir o desenvolvimento de estudos com longos períodos de cultivo *in vitro*, suprimindo a depleção folicular que naturalmente ocorre quando fragmentos de tecido ovariano são submetidos ao processo de criopreservação. Finalmente, o resveratrol e as SiNPs possuem efeitos tóxicos dose-dependente e propriedade terapêutica em comum (proliferação celular), portanto ambos devem ser exhaustivamente investigados quando utilizados em tecnologias de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

- Aguiar FLN, Gastal GDA, Alves KA, Alves BG, J.R. Figueiredo JR, Gastal EL** 2020 Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. *Theriogenology*. **156** 296-309 (doi: [10.1016/j.theriogenology.2020.06.043](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.043))
- Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RFF, Gasta MO et al.** 2015 Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology*. **83** 1048–1055. (doi: [10.1371/journal.pone.0198108](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198108))
- Alves KA, Alves BG, Gastal GDA, de Tarso SGS, Gastal MO, Figueiredo JR, et al.** 2016 The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. *PLoS One*. **11** (doi.org/10.1371/journal.pone.0149693)
- Antonino DC, Soares MM, Júnior JM, Alvarenga1 PB** 2019 Three-dimensional levitation culture improves in-vitro growth of secondary follicles in bovine model. *RBMO* **3** 300-311 (doi: [10.1016/j.rbmo.2018.11.013](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.013))
- Arantes TM, Pintoa, HA, Leite, ER et al.** 2012 Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. *Col. and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspec.* **415** 209–217. (doi: [10.1016/j.colsurfa.2012.09.041](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.041))

Araújo VR, Gastal, MO, Figueiredo JR, Gastal EL 2014 In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **12** 2-14 ([doi: 10.1186/1477-7827-12-78](https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78))

Barkalina N, Jones C, Kashir J, Coote S 2014 Effects of mesoporous silica nanoparticles upon the function of mammalian sperm in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **4** 859-870 (doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.011)

Benayoun BA, Georges AB, L'Hôte D, Andersson N et al. 2011 Transcription factor FOXL2 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Hum Mol Genet* **9** 1673-1686 ([doi: 10.1093/hmg/ddr042](https://doi.org/10.1093/hmg/ddr042).)

Bezerra MES, Gouveia BB, Barberino RS, Menezes VG et al. 2018 Resveratrol promotes in vitro activation of ovine primordial follicles by reducing DNA damage and enhancing granulosa cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Reprod Domest Anim* **6** 1298-1305 ([doi: 10.1111/rda.13274](https://doi.org/10.1111/rda.13274).)

Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M 2010 Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* **60** 235–237 ([doi:10.1016/j.cryobiol.2009.10.012](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012))

Brandão FAS, Alves BG, Alves KA, Souza SS, Silva YP, Freitas VJF, et al. 2018 Laparoscopic ovarian biopsy pick-up method for goats. *Theriogenology*. **107** 219-225. ([doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.042](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.042).)

Brittes J, Lúcio M, Nunes C, Lima JLFC, Reis S 2010 Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. *Chemistry and Physics of Lipids* **8** 747-754 (doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.07.004)

Bucak MN, Ataman MB, Baspınar N, Uysal O, et al . 2015 Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Blackwell Verlag GmbH* **47** 545–552 ([doi: 10.1111/and.12301](https://doi.org/10.1111/and.12301))

Chiti MC, Dolmans M, Lucie L, Zhuge F et al. 2018 A novel fibrin-based artificial ovary prototype resembling human ovarian tissue in terms of architecture and rigidity. *Fertility preservation*. **35** 41–48 ([doi: 10.1007/s10815-017-1091-3](https://doi.org/10.1007/s10815-017-1091-3).)

Ding Y, Shao J, Li J, Zhang Y, Hong K 2018 Successful fertility following optimized perfusion and cryopreservation of whole ovary and allotransplantation in a premature ovarian insufficiency rat model. *Journal of Ovarian Research* **11** 35 ([doi:10.1186/s13048-018-0401-4](https://doi.org/10.1186/s13048-018-0401-4))

Donfack NJ, Alves KA, Alves BG, Pedrosa Rocha RMP et al. 2019 Xenotransplantation of goat ovary as an alternative to analyse follicles after vitrification. *Reprod Dom Anim.* **54** 216–224. (doi: [10.1111/rda.13340](https://doi.org/10.1111/rda.13340))

Donfack, NJ, Alves KA, Alves BG et al. 2018 In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. *Reprod, Fert and Develop.* **8** 1055-1065. (doi:[10.1071/RD17315](https://doi.org/10.1071/RD17315))

Donnez JMD, Dolmans, MMD 2017 Fertility Preservation in Women. *The new england Journal of medicine.* **17** 1657-1665. (doi: [10.1056/NEJMra1614676](https://doi.org/10.1056/NEJMra1614676))

Falchi L, Galleri G, Dore GM et al. 2018 Effect of exposure to CeO₂ nanoparticles on ram spermatozoa during storage at 4 °C for 96 hours. *Reprod Biol and Endoc* **16** 1-10(doi: [10.1186/s12958-018-0339-9](https://doi.org/10.1186/s12958-018-0339-9))

Fei Q, Kent D, Botello-Smith WM, Nur F, Nur S et al. 2018 Molecular Mechanism of Resveratrol's Lipid Membrane Protection. *Scientific RePortS* **8** 1587 (doi:[10.1038/s41598-017-18943-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18943-1))

Feugang JM 2017 Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Mol Reprod Dev.***84** 832–841 (doi: [10.1002/mrd.22831](https://doi.org/10.1002/mrd.22831))

Gadani B, Bucci D, Spinaci M, Tamanini , Galeati G 2017 Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. *Theriogenology* **90** 88-93 (doi.org/[10.1016/j.theriogenology.2016.11.020](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.020))

Garcez ME, Branco CS, Lara LV, Salvador M 2010 Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human sêmen. *Fertility and Sterility* **6** 2118-2121 (doi:[10.1016/j.fertnstert.2010.01.058](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058))

Gastal GDA, Alves BG, Alves KA, Paiva SO, de Tarso SGS, Ishak GM, et al. 2017 Effects of cryoprotectant agents on equine ovarian biopsy fragments in preparation for cryopreservation. *J Equine Vet Sci* **53** 86-93. (doi:[10.1016/j.jevs.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.014))

Gehrke H, Frühmesser A, Pelka J, Esselen M et al. 2013 In vitro toxicity of amorphous silica nanoparticles in human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* **3** 274-293 (doi: [10.3109/17435390.2011.652207](https://doi.org/10.3109/17435390.2011.652207).)

Giaretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G 2013 Effects of Resveratrol on Vitrified Porcine Oocytes. Hindawi Publishing Corporation. (doi:/10.1155/2013/920257)

Han Y, Luo H, Wang H, Cai J et al. 2017 SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF- κ B signaling with anti-inflammatory functions. *Apoptosis* **10** 1260-1272 (doi: 10.1007/s10495-017-1386-y.)

Hao j, Tuckb AR, Sjodinb MOD, Lindbergb J et al. 2018 Resveratrol supports and alpha-naphthoflavone disrupts growth of human ovarian follicles in an in vitro tissue culture model. *Toxicol Appl Pharmacol* **338** 73-82 (doi: 10.1016/j.taap.2017.11.009.)

Hara T, Kin A, Aoki S et al. 2018 Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrified-warmed bovine embryos. *Resveratrol and vitrified-warmed embryonic development* **10** 1–17 (doi: 10.1371/journal.pone.0204571)

Isaac AV, Kumari S, Nair R et al. 2017 Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation médium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa./ *Bioch. and Biophys. Resea. Commun.* **494** 656-662. (doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.112.)

Ito A, Yoshioka K, Masumoto S, Sato K 2020 Magnetic heating of nanoparticles as a scalable cryopreservation technology for human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* **10** 13605 (doi: 10.1038/s41598-020-70707-6)

Jozkowiak M, Hutchings G, Jankowski M, Kulcenty K et al. 2020 The Stemness of Human Ovarian Granulosa Cells and the Role of Resveratrol in the Differentiation of MSCs—A Review Based on Cellular and Molecular Knowledge. *Cells* **6** 1418 (doi:10.3390/cells9061418)

Klijn NF, Louwé LA, Pilgram GSK, van der Westerlaken LAJ 2019 Two live births following orthotopic ovarian tissue autotransplantation: A case report of cycle monitoring and (modified) natural-cycle IVF in one patient. *Case Reports in Women's Health* **24** 143 (doi: 10.1016/j.crwh.2019.e00143)

Leonel ECR, Luccic CM, Amorima CA 2019 Cryopreservation of Human Ovarian Tissue: A Review. *Transfus Med Hemother* **46** 173–181 (doi:10.1159/000499054)

Li W, Zhou X, Liu B, Jianjun Dai J et al. 2016 Effect of nanoparticles on the survival and development of vitrified porcine gv oocytes. *CryoLetters* **6** 401-405 (doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.05.010)

Liu J, Yang M, Jing L, Ren L et al. 2018 Silica nanoparticle exposure inducing granulosa cell apoptosis and follicular atresia in female Balb/c mice. *Environ Sci Pollut Res.* **25** 3423–3434 ([doi: /10.1007/s11356-017-0724-5](https://doi.org/10.1007/s11356-017-0724-5))

Liu M, Yin Y, Ye X et al. 2013 Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human Reproduction* **28** 707–717 ([doi: 10.1093/humrep/des437](https://doi.org/10.1093/humrep/des437))

Longobardi V, Zullo G, Salzano A, Canditiis C, Cammarano A et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology.* **88** 1-8 ([doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.046](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046))

Macedo TJS, Barros VRP, Monte APO et al. 2017 Resveratrol has dose-dependent effects on DNA fragmentation and mitochondrial activity of ovine secondary follicles cultured in vitro. *Zygote* **4** 434–442 ([doi:10.1017/S0967199417000193](https://doi.org/10.1017/S0967199417000193))

Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T et al. 2012 Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endoc.* **23** 10- 14. ([doi: 10.1186/1477-7827-10-14](https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-14))

Otala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjöberg J et al. 2002 Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction.* **3** 28–236

Palma GA, Arganaraz ME, Barrera DA, Rodler D, Mutto AA 2012 Sinowatz F Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal* **2012** 1-14 ([doi:10.1100/2012/938138](https://doi.org/10.1100/2012/938138))

Palma GA, Arganaraz ME, Barrera AD, Rodler D et al. 2012 Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal* **2012** 1–14 ([doi: 10.1100/2012/938138](https://doi.org/10.1100/2012/938138))

Pavlová S, Karolina Klucska K, Vasicek R, Ryban L et al. 2013 The involvement of SIRT1 and transcription factor NF- κ B (p50/p65) in regulation of porcine ovarian cell function. *Anim Reprod Sci* **3-4** 180-188 ([doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.06.013](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.013))

Pinto Y, Alves KA, Alves BG, Souza SS 2020 Heterotopic ovarian allotransplantation in goats: Preantral follicle viability and tissue remodeling. *Animal Reproduction Science* **215** ([doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106310](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106310))

Poels J, Abou-Ghannam G, Decamps A, Leyman M et al. 2016 Transplantation of testicular tissue in alginate hydrogel loaded with VEGF nanoparticles improves spermatogonial recovery. *Journal of Controlled Release.* **234** 79-89 (doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.037)

Remião MH , Segatto NV , Pohlmann A, Guterres SS et al. 2018 The Potential of Nanotechnology in Medically Assisted Reproduction *Frontiers in Pharmacology* **994** 17-50 (doi: [10.3389/fphar.2017.00994](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00994))

Rocha CD, Soares MM, Antonino DC et al. 2018 Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. *Theriog.* **14** 244-251. (doi: [10.1016/j.theriogenology.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.004).)

Sa NAR, Vieira LA, Ferreira ACA, Cadenas J, Bruno JB et al 2019 Anethole Supplementation During Oocyte Maturation Improves In Vitro Production of Bovine Embryos of Ovine Ovarian Tissue. *Reproductive Sciences* (doi: [10.1177/1933719119831783](https://doi.org/10.1177/1933719119831783))

Sales AD, Duarte ABG, Santos RR, Alves KA, Lima LF, et al. 2016 Modulation of aquaporins 3 and 9 after exposure of ovine ovarian tissue to cryoprotectants followed by in vitro culture. *Cell Tissue Res.* (doi: [10.1007/s00441-016-2384-z](https://doi.org/10.1007/s00441-016-2384-z))

Shahsavari MH, Alves KA, Alves BG, Lima LF et al. 2020 Impacts of different synthetic polymers on vitrification of ovarian tissue. *Cryobiology.* **94** 66-72 (doi: [10.1016/j.cryobiol.2020.04.007](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.04.007))

Silva LM, Mbemba GT, Guerreiro DD, Brito DCC 2018 Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution. *Biopreservation and biobanking.* **4** 258-269 (doi: [10.1089/bio.2017.0122](https://doi.org/10.1089/bio.2017.0122))

Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O et al. 2010 Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction Update.* **4** 395–414 (doi: [10.1093/humupd/dmp056](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp056))

Sugiyama M, Kawahara-Miki R, Kawana H et al. 2015 Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. *J. Reprod. Dev* **61** 251–259 (doi: [10.1262/jrd.2015-001](https://doi.org/10.1262/jrd.2015-001))

Taylor MJ, Weegmana BP, Baicua SC, Giwaa SE 2019 New Approaches to Cryopreservation of Cells, Tissues, and Organs. *Transfus Med Hemother* **46** 197–215 (doi: [10.1159/000499453](https://doi.org/10.1159/000499453))

Wang L, Ying Y, Ouyang Y, Wang J, Xu J 2013 VEGF and bFGF increase survival of xenografted human ovarian tissue in an experimental rabbit model. *J Assist Reprod Genet* **30** 1301–1311 (doi: [10.1007/s10815-013-0043-9](https://doi.org/10.1007/s10815-013-0043-9))

Wittig A, Gehrke H, Favero GD, Fritz EM et al. 2017 Amorphous Silica Particles Relevant in Food Industry Influence Cellular Growth and Associated Signaling

Pathways in Human Gastric Carcinoma Cells. *Nanomaterials (Basel)* **1** 18 (doi: [10.3390/nano7010018](https://doi.org/10.3390/nano7010018).)

Yu Y, Duana J, Yua Y, Li Y , Liuc X 2014 Silica nanoparticles induce autophagy and autophagic cell death in HepG2 cells triggered by reactive oxygen species. *Journal of Hazardous Materials*. **270** 176-186 (doi: [10.1016/j.jhazmat.2014.01.028](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.01.028))

Zhang J, Ren L, Zou Y, Zhang L et al. 2016 Silica nanoparticles induce start inhibition of meiosis and cell cycle arrest via down-regulating meiotic relevant factors. *Toxicol. Res.* **5** 1453-1464 (doi: [10.1039/c6tx00236f](https://doi.org/10.1039/c6tx00236f))