

Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas

The role of antioxidants in the in vitro culture of ovarian cells

G.M. Silva¹, V.R. Araújo, A.B.G. Duarte, C.A.P. Lopes, J.R. Figueiredo

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), 60740-000, Fortaleza, Ceará.

¹Correspondência: gerlanems@hotmail.com

Resumo

Radicais livres são moléculas que contêm elétrons desemparelhados na camada de valência atuando na defesa do organismo contra agentes estranhos, podendo ser importantes marcadores da remodelação dos tecidos. Entretanto, um desequilíbrio entre sua produção e neutralização pode levar a danos celulares, denominados estresse oxidativo. Os agentes neutralizantes dessas moléculas são conhecidos como antioxidantes e podem ser de natureza enzimática ou não. Tendo em vista que o metabolismo oxidativo é essencial para a produção de energia em gametas e embriões, a produção de radicais livres é inevitável. Alguns agentes antioxidantes têm sido adicionados aos meios de cultivo de células ovarianas a fim de reduzir o estresse oxidativo. Sendo assim, a presente revisão objetiva descrever os principais antioxidantes e suas funções em compartimentos celulares com ênfase nas células ovarianas.

Palavras-chave: foliculo, ovário, radicais livres.

Abstract

Free radical is any molecule containing unpaired electrons in the valence shell, which protects the body against foreign agents and can act as important markers in tissue remodeling. Nevertheless, an imbalance between production and neutralization of these factors can damage cells in a process named oxidative stress. Neutralizing agents for these molecules are known as antioxidants, which can be enzymatic in nature or not. Since oxidative metabolism is essential for energy production in gametes and embryos, free radicals generation is unavoidable. Some antioxidant agents have been employed in culture media for ovarian cells. In this context, the aim of present review is to describe the main antioxidants and their functions within cellular compartments, with focus on ovarian cells.

Keywords: follicle, free radical, ovary.

Introdução

Os radicais livres são espécies químicas (átomo, molécula ou fragmento de molécula) que apresentam pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência. Podem ser formados a partir do oxigênio, sendo chamados de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, de carbono ou de enxofre. Todavia, as que possuem maior relevância são as espécies reativas de oxigênio, pois sua formação ocorre durante o processo normal ou ainda exacerbado da redução de oxigênio no interior da mitocôndria (Dormandy, 1980). Considerando-se que todos os organismos aeróbios requerem oxigênio para a sua sobrevivência, os metabólitos dessa molécula, como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, são capazes de modificar o funcionamento celular de forma adversa, comprometendo alguns mecanismos intracelulares e, consequentemente, a sobrevivência da célula.

Sendo assim, entende-se por estresse oxidativo o desequilíbrio entre a produção e a neutralização das espécies reativas de oxigênio, podendo ocorrer pelo excesso de produção dessas moléculas e/ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes no interior da célula (Diplock et al., 1994). O estresse oxidativo por meio desses mecanismos ainda não está bem elucidado e pode provocar apoptose e morte em vários tipos celulares (Liu et al., 2003), além de anomalias na fertilização e no desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação (Navarro et al., 2006). Por outro lado, essas espécies reativas de oxigênio podem ser importantes marcadores da remodelação dos tecidos, da sinalização hormonal, da esteroidogênese e da função das células germinativas (Attaran et al., 2000). Nestas últimas, essas moléculas têm afetado a viabilidade de espermatozoides (Gibson e Huang, 2004). Numerosos estudos em animais e humanos têm demonstrado a presença de espécies reativas de oxigênio no trato reprodutivo de fêmeas em locais como ovários (Jozwik et al., 1999; Behrman et al., 2001) e tubas uterinas, bem como em embriões (Guerin et al., 2001). Elas estão envolvidas, ainda, em uma série de funções fisiológicas reprodutivas, como a maturação oocitária, a esteroidogênese ovariana, a ovulação, a implantação, a formação de blastocisto, a manutenção do corpo lúteo na gestação e a luteólise (Ishikawa, 1993; Sabatini et al., 1999;

Behrman et al., 2001).

Desta forma, visando balancear a formação das espécies reativas de oxigênio e manter suas funções fisiológicas, em condições normais as células contêm em seu citoplasma substâncias antioxidantes, as quais podem ser de natureza enzimática ou não enzimática. Entretanto, no cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido ovariano ou ainda de estruturas isoladas como folículos ovarianos, existe maior formação de radicais livres, sendo, portanto, necessária a utilização de substâncias antioxidantes que possam contrapor esse aumento indiscriminado de espécies reativas de oxigênio. Tendo em vista a atuação dos radicais livres e a importância dos antioxidantes no cultivo celular, a presente revisão objetiva abordar o papel intracelular dos antioxidantes no ovário mamífero e no cultivo de células ovarianas.

Espécies reativas de oxigênio

O elemento oxigênio, por definição, pode ser considerado um radical livre, uma vez que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, na camada de valência (Halliwell e Gutteridge, 1999). Segundo Ferreira e Matsubara (1997), este desemparelhamento de elétrons confere alta reatividade aos átomos e às moléculas.

As espécies reativas de oxigênio incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), sendo este último extremamente reativo. Todavia, o radical superóxido, gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron, é um radical livre pouco reativo, pois ele tem pouca habilidade para penetrar nas membranas celulares e, por isso, fica preso no compartimento onde foi produzido. Radicais superóxido são rapidamente dismutados pela ação das enzimas superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), citoplasmática (Cu, Zn-SOD) ou extracelular (EC-SOD), produzindo peróxido de hidrogênio, que possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arner, 2001). O radical hidroxila ($OH\cdot$) é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metálicos (ferroso- Fe^{++} ou cúprico- Cu^{++}) conhecida como reação de Fenton. Este radical reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares a partir da separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados ali presentes. Esse processo leva à formação de radicais lipídicos, os peróxidos de lipídios, que, na sequência, combinam-se com o oxigênio molecular, propagando, assim, a cadeia de reações da peroxidação lipídica. A maioria dos fosfolipídios presentes na membrana celular é rica em ácidos graxos poli-insaturados; por esta razão, esses lipídios são susceptíveis ao ataque do radical hidroxila (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arner, 2001).

Por outro lado, os radicais livres são importantes para a defesa do organismo contra agentes estranhos, pois auxiliam a atividade dos neutrófilos e macrófagos, desencadeando uma atividade bactericida pela degradação oxidativa dos lipídios, das proteínas e do DNA microbianos. O uso fisiológico de espécies reativas de oxigênio, como segundo mensageiro, também começa a ser demonstrado em áreas como a sinalização intracelular e a regulação redox. O radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e os hidroperóxidos de lipídios podem regular a atividade de várias quinases, citocininas, fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, fatores de transcrição, bem como o mecanismo de morte celular. No ovário, sabe-se que um grande nível de espécies reativas de oxigênio é produzido em tecidos esteroideogênicos, uma vez que a reação de conversão de colesterol em pregnenolona, catalisada pela enzima desmolase do complexo enzimático citocromo P450, produz um elevado número de elétrons (Rodgers, 1990; Strauss e Miller, 1991). Tais relações sugerem um complexo papel das espécies reativas de oxigênio no ambiente ovariano. Além disso, essas moléculas podem contribuir para o envelhecimento e para a ocorrência de muitas doenças humanas, como câncer, derrame cerebral, doenças neurodegenerativas e diabetes (Imai e Nakagawa, 2003).

Portanto, quaisquer distúrbios no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo. Este pode resultar em adaptação ou injúria celular. Em princípio, pode ser causado por dois fatores: (1) redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular (exemplos: mutações afetando enzimas de defesa antioxidantes como a Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD), MnSOD ou glutathione peroxidase) ou (2) produção elevada de espécies reativas de oxigênio/especies reativas de nitrogênio (exemplo: exposição a concentrações elevadas de O_2 , presença de toxinas que são metabolizadas produzindo estes radicais ou excessiva ativação dos sistemas naturais destas moléculas, como a ativação de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

As espécies reativas de oxigênio podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo o DNA, as proteínas e os lipídios (peroxidação dos lipídios). A peroxidação de lipídios é definida como “a deteriorização oxidativa de lipídios poli-insaturados”. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$) e, devido às suas múltiplas ligações, são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001). A membrana que rodeia as células e as organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, por isso,

ela é um dos componentes celulares mais atingidos por essas moléculas reativas em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, havendo perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999). É importante ressaltar ainda que o alvo celular primário pode variar, dependendo da célula, do tipo de estresse imposto e de quão severo é esse estresse. Desta forma, os danos podem conduzir às mais diversas situações, desde apoptose a carcinogênese (Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001).

Antioxidantes

Nos sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes oxidantes são gerados endogenamente, como consequência direta do metabolismo do O_2 . Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva desses radicais livres, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, que pode ser dividido em dois: os sistemas enzimático e não enzimático (Sies, 1993).

No sistema enzimático, as substâncias são conhecidas como antioxidantes naturais, podem agir neutralizando as espécies reativas de oxigênio e prevenindo danos na estrutura celular. Dentre estas substâncias destacam-se:

Superóxido dismutase (SOD)

A superóxido dismutase foi a primeira enzima metabolizante de espécies reativas de oxigênio descoberta. Em células de mamíferos, existem duas formas desta enzima: a Cu, Zn- superóxido dismutase (Cu-Zn- SOD) presente no citosol e a Mn- superóxido dismutase (Mn-SOD) presente na mitocôndria. Estas enzimas catalisam a reação de dismutação de duas moléculas do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (Fig.1), sendo, portanto, uma fonte de peróxido de hidrogênio celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001). Na mitocôndria, o superóxido é formado em concentrações relativamente altas, devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (Nordberg e Arnér, 2001).

Catalase

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular ($H_2O_2 = H_2O + O$; Fig. 1). É uma enzima encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, nos rins e no fígado. A catalase também tem função na detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada do H_2O_2 . Um papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

Peroxirredoxinas (Prx)

Peroxirredoxinas representam uma larga família de enzimas citoprotetoras que degradam o peróxido de hidrogênio (Fig. 1), além de peróxidos orgânicos de cadeias mais longas e hidrofóbicas, como o peróxido de cumeno, os peróxidos derivados de ácidos graxos ou de fosfolipídeos, além do peroxinitrito. Ao degradarem esses compostos, as peroxirredoxinas ficam em sua forma oxidada e, para terem a sua atividade enzimática restaurada, devem ser reduzidas por enzimas denominadas tiorredoxinas. As tiorredoxinas, por sua vez, só atuam na sua forma reduzida, e essa redução é feita pela enzima tiorredoxina redutase, formando, assim, um ciclo catalítico entre essas diferentes enzimas citadas (Almondes et al., 2010). Em mamíferos, essas enzimas também podem atuar em outras moléculas e processos metabólicos, como no sistema imune, na apoptose celular e na regulação da atividade de fatores de transcrição, regulando a função celular de vários tecidos (Nordberg et al., 2001).

Glutathione (GSH)

A glutathione está presente em todas as células vivas aeróbicas e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Ela é composta por duas subunidades as quais possuem a expressão de seus RNAm e proteínas regulados por hormônios gonadotróficos (Luderer et al., 2001; Tsai-Turton e Luderer, 2005). Segundo Ferreira e Matsubara (1997), a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a de lesões resultantes da exposição a agentes como: íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozônio, radiação e luz ultravioleta. Além disso, participa da detoxificação de agentes químicos em reações catalisadas pela glutathione S-transferase, bem como da eliminação de produtos da lipoperoxidação, como é o caso da reação catalisada pela glutathione peroxidase (GPx) com o peróxido de hidrogênio (Nordberg e Arnér,

2001). Atua também como cofator de enzimas, na estocagem de cisteína e na regulação da síntese de proteínas e de DNA por meio da alteração do *status* redox (Dalton et al., 2004).

No ovário mamífero, a glutatona está presente no oócito e no fluido folicular, exercendo papel na promoção do desenvolvimento do zigoto do estágio de mórula para blastocisto (Matos e Furnus, 2000). Também foi identificada como essencial para a maturação de oócitos, particularmente na maturação citoplasmática, necessária para o desenvolvimento pré-implantação e formação dos pró-núcleos (Yoshida et al., 1993; Eppig, 1996). Zuelke et al. (2003) verificaram que oócitos maduros de hamsters têm a concentração desta enzima duas vezes maior do que em oócitos em vesícula germinativa. Soma-se a isso o fato de que a sua depleção induz a apoptose em alguns tipos de células em cultivo (Anderson et al., 1999; Higuchi e Matsukawa, 1999; Schnelldorfer et al., 2000).

Após a exposição da glutatona ao agente oxidante, ocorre sua oxidação à glutatona oxidada ou glutatona dissulfeto. A recuperação desta enzima é feita pela glutatona redutase (GR), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

A glutatona peroxidase (GPx) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (Fig. 1) e de outros peróxidos orgânicos, como os peróxidos de lipídios, na membrana celular para seus álcoois correspondentes, convertendo a glutatona a sua forma oxidada (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001). Existem quatro tipos diferentes de glutatona peroxidase em mamíferos (GPx1, 2, 3 e 4). Esta última foi descoberta recentemente e tem dupla função na célula espermática, pois é enzimaticamente ativa na espermátide e insolúvel, funcionando como uma proteína estrutural, no espermatozoide maduro. Uma variante da GPx4 diferindo na porção N terminal da molécula é também específica do núcleo do espermatozoide, onde participa na condensação da cromatina espermática (Nordberg e Arnér, 2001). Segundo Imai e Nakagawa (2003), a GPx4 pode reagir com o H_2O_2 e com uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios, sendo, portanto, considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidativos.

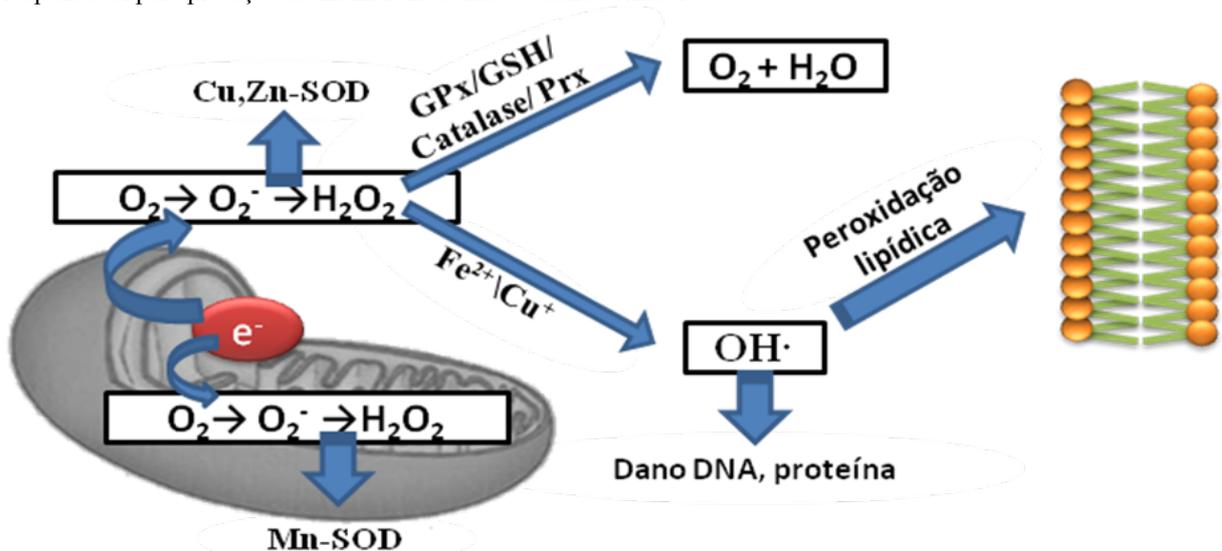


Figura 1. Representação simplificada do sistema antioxidante em que se enfatiza a ação de algumas enzimas. Radical superóxido é produzido intracelularmente, tanto no citosol quanto na mitocôndria. A superóxido dismutase dá origem ao oxigênio molecular e ao peróxido de hidrogênio a partir de duas moléculas de superóxido. O peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado para oxigênio molecular e água por diferentes sistemas enzimáticos ou convertido para o radical hidroxila, por meio de reação química metabolizada por metais de transição (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

Com relação ao sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular é considerado antioxidante de importância biológica, incluindo as vitaminas C e E, além de diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipoico (Nordberg e Arnér, 2001).

Ácido ascórbico (Vitamina C)

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. O ácido ascórbico reduz o α -tocoferol, os peróxidos e as espécies reativas de oxigênio, como superóxido. Esta vitamina serve, principalmente, para prevenir a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas e de membrana. O ascorbato atua juntamente com a glutatona para proteger a célula dos danos oxidativos (Nordberg e Arnér, 2001). Essa vitamina tem sido associada à manutenção da viabilidade celular no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (Thomas et al., 2001; Rossetto et al., 2009). No entanto, quando em doses elevadas ou na presença de metais como o ferro ou o cobre, a vitamina C pode agir como um pró-oxidante,

levando à lipoperoxidação. *In vitro*, tanto a mistura Cu-ascorbato como Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos causados por radicais livres ao DNA, aos lipídios e às proteínas (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1999).

α-Tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E é o componente vital para a defesa celular contra compostos que causam oxidação das moléculas celulares em mamíferos, agindo como antioxidante (Bregelius e Traber, 1999). Pode prevenir a oxidação de várias formas: a) destruindo os agentes oxidantes, b) diminuindo a conversão de agentes oxidantes menos reativos a mais reativos, c) facilitando o reparo de danos causados pelos agentes oxidantes, d) providenciando um ambiente favorável para a atividade de outros antioxidantes (Zhang e Omaye, 2001). *In vitro*, essa substância não foi capaz de manter a viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais, porém promoveu ativação folicular (Lima-Verde et al., 2009).

Coenzima Q

A coenzima Q exerce sua principal função natural na mitocôndria, como parte da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória). Entretanto, está presente também em baixas concentrações no plasma e nas membranas celulares, onde funciona como um antioxidante prevenindo a peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 1999; Nordberg e Arnér, 2001).

Ácido lipoico

O ácido lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico) é um cofator essencial em complexos multi-enzimáticos que catalisam a descarboxilação dos α -cetoácidos, como o piruvato (α -acetil coenzima-A - CoA) e o α -cetoglutarato (α -succinil CoA) no ciclo de Krebs. Ambas as formas, oxidadas e reduzidas, do ácido lipoico mostram propriedades antioxidativas *in vitro*. Estas substâncias reduzem peróxido, ácido hipocloroso, radical hidroxila e ácido peroxinitroso. As concentrações de ácido lipoico livre nos tecidos e fluidos corporais são muito baixas, o que torna quase impossível que ele exerça efeitos antioxidativos *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Antioxidantes e o ovário

Sabe-se que o metabolismo oxidativo é essencial para produção da energia celular que regula os processos fisiológicos, entretanto está inevitavelmente associado à geração de espécies reativas de oxigênio e ocorrência do estresse oxidativo. Segundo Arechiga et al. (1998), a produção em excesso de radicais livres pode resultar em infertilidade, em razão de o tecido ovariano, o espermatozoide e o embrião pré-implantacional serem sensíveis a danos provocados por esses agentes oxidantes. Além disso, tem sido sugerido que a produção de radicais livres no meio de cultivo de embriões bloqueia o seu desenvolvimento (Legge e Sellens, 1991).

Há relatos do envolvimento das espécies reativas de oxigênio em concentrações fisiológicas na proliferação celular (Rahimi et al., 2003), maturação oocitária (Hammadeh et al., 2008), luteólise (Riley e Behrman, 1991; Sugino et al., 2000), esteroidogênese folicular e luteal, ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário inicial (Agarwal e Allamaneni, 2004; Fujii et al., 2005; Morado et al., 2009). A primeira retomada da meiose é induzida por um aumento de espécies reativas de oxigênio e inibida por agentes antioxidantes (Takami et al., 2000; Kodaman e Behrman, 2001), indicando que a geração desses radicais livres pelo folículo é um importante promotor da sequência ovulatória. No entanto, sugere-se que a produção cíclica dessas moléculas reativas pode, ao longo do tempo, contribuir para uma insuficiência ovariana prematura autoimune (Behrman et al., 2001). Estudos anteriores têm mostrado que essas moléculas afetam negativamente a progressão da metáfase II na segunda parada da meiose, pois estão associadas à diminuição de gonadotrofinas, a danos no DNA e à inibição na produção de ATP (Behrman et al., 2001). Além disso, Margolin et al. (1990) observaram que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na perda da sensibilidade de células da granulosa a hormônios gonadotróficos e na perda da função esteroidogênica, as quais são características de atresia folicular.

Sabe-se que os cultivos *in vitro* de tecido ovariano (Hovatta et al., 1997) ou de folículos isolados (Tilly e Tilly, 1995) são geralmente submetidos a maiores concentrações de oxigênio em relação às condições *in vivo*, podendo o estresse oxidativo contribuir para as altas taxas de atresia observadas nos cultivos. Além disso, o excesso de espécies reativas de oxigênio vem sendo correlacionado com apoptose celular. Embora a indução de apoptose causada por estas moléculas ainda seja pouco investigada em folículos ovarianos, observou-se que o tratamento com peróxido de hidrogênio é tóxico para células da granulosa, uma vez que inibe o acúmulo do AMPc estimulado pelo hormônio foliculo estimulante (FSH) e a produção de progesterona (Margolin et al., 1990). Há evidências de que as espécies reativas de oxigênio induzem vias de apoptose mitocondrial por meio da ativação de receptores de morte celular na membrana (Chandra et al., 2000), havendo, então, indução da

proteína quinase ativadora de mitógenos e da via das caspases (Schulze-Osthoff et al., 1998). Além disso, o estresse oxidativo induz a fragmentação do DNA nas células (Halliwell e Aruoma, 1991; Henle e Linn, 1997). Essa quebra pode ocorrer devido à ação direta da $\text{OH}\cdot$ ou ainda pela ativação de endonucleases, devido ao acúmulo de cálcio intracelular livre estimulado pelos radicais livres. A existência de quebras unilaterais no momento da replicação do DNA induz quebras irreversíveis da cadeia dupla (Cox et al., 2000), prejudicando a polimerização do DNA. Essas alterações são características de apoptose, culminando com a degeneração e a morte celular.

Evidências indiretas do papel pró-apoptótico das espécies reativas de oxigênio em folículos ovarianos foram observadas por Jozwik et al. (1999), em que o tratamento com antioxidantes preveniu a apoptose de folículos cultivados *in vitro*. Foi recentemente demonstrado que a supressão da síntese de glutatona aumenta a atresia de folículos antrais em ratas (Lopez e Luderer, 2004). Outros estudos têm demonstrado que tratamentos que aumentam as concentrações celulares dessa enzima protegem vários tipos celulares contra estímulos apoptóticos (Ekshyyan e Aw, 2005; Xia et al., 2005). Tsai-Turton e Opposing (2006) mostraram que tratamentos com FSH aumentaram as concentrações celulares de glutatona em cultivo de folículos pré-antrais de ratas por 2-48 horas e suprimiram as espécies reativas de oxigênio foliculares. Usando-se um inibidor específico da síntese dessa enzima, foi demonstrado que a depleção da glutatona reverte parcialmente a supressão dos radicais livres e a inibição de apoptose nas células da granulosa pelo FSH. Evidencia-se, dessa forma, uma regulação entre antioxidantes e esse hormônio, bem como a importância do balanço entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio no ovário. Vários métodos têm sido utilizados para contornar problemas inerentes aos radicais livres. Um deles é a redução da concentração de oxigênio no ambiente de cultivo (Umaoka et al., 1992), ou, ainda, a adição de antioxidantes aos meios de cultivo, tais como a glutatona (Yoshihara et al., 2009), o EDTA (Nasr-Esfahani et al., 1992), a catalase (Nasr-Esfahani e Johnson, 1992) e as vitaminas C e E (Lima-Verde et al., 2009; Rossetto et al., 2009).

A proteção contra as espécies reativas de oxigênio é fornecida por degradação enzimática (catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase), remoção pelos antioxidantes e reparação molecular. Essas enzimas citadas podem reduzir as proteínas e o DNA oxidados e destruir os lipídios oxidados, impedindo, dessa forma, a propagação da peroxidação lipídica. Tanto a catalase quanto a superóxido dismutase estão presentes no ovário e podem ser reguladas hormonalmente (Agrawal e Lalorava, 1977; Lalorava et al., 1988). Estudos têm demonstrado que o cultivo *in vitro* de células da granulosa foliculares em meio suplementado com FSH estimula a atividade da catalase (Behl e Pandey, 2002). Estas enzimas aumentam o desenvolvimento de embriões murinos por meio da regulação positiva com a glutatona, controlando o balanço entre oxidação e redução intracelular (Goto et al., 1992; Orsi e Leese, 2001). De acordo com Eppig (1996) e Krisher e Bavister (1998), a glutatona peroxidase tem se revelado importante no processo de maturação de oócitos envolvendo a síntese de componentes bioquímicos, a fosforilação de proteínas e a ativação de caminhos metabólicos específicos. Também age diretamente no metabolismo da progesterona. No útero, sua função antioxidante é fundamental para manter o ambiente mais sadio possível, tanto para o transporte espermático na época do estro quanto para a implantação do embrião. Essa enzima é estratégica na eliminação dos radicais livres (peróxido de hidrogênio) originados dos processos metabólicos e vital para a proteção da membrana lipídica dos oócitos, para que esta não sofra peroxidação pelos radicais livres. Essa peroxidação causaria a ruptura da membrana e ainda danos graves irreversíveis.

As vitaminas antioxidantes têm sido há muito tempo correlacionadas com o ovário. Machlin e Gabriel (1980), em estudos com ratos deficientes de vitamina E, verificaram a sua importância na manutenção da função dos gametas. Essa vitamina tem sido correlacionada com a supressão de injúrias causadas nas membranas celulares e com efeitos benéficos ao desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos (Olson e Seidel Jr., 2000). Outros antioxidantes, como a luteína e outros carotenoides, como, por exemplo, a vitamina A, também são conhecidos por serem constituintes do ovário (Chew et al., 1984). O ácido ascórbico é um antioxidante largamente distribuído no ovário mamífero, onde pode ser encontrado nas células da granulosa, da teca interna e luteínicas, bem como no oócito (Deane, 1952). A presença de altas concentrações deste antioxidante em tecidos endócrinos tem se mostrado importante para produção de hormônios esteroides (Tsuji et al., 1989) e inibição da apoptose em células da granulosa em bovinos (Tilly e Tilly, 1995) e em complexos cumulus-oócito de camundongas (Eppig et al., 2000; Murray et al., 2001). Além disso, Tatemoto et al. (2001) verificaram que o tratamento com ácido ascórbico na concentração de $250\mu\text{M}$ no meio de maturação protegeu os oócitos suínos do estresse oxidativo e ainda aumentou a formação de pró-núcleos com subseqüentes clivagens e desenvolvimento de blastocistos.

Principais antioxidantes usados no cultivo *in vitro* de células ovarianas

Sob condições de cultivo *in vitro*, as estruturas estão expostas a maiores concentrações de oxigênio do que o encontrado *in vivo* (Goto et al., 1992). A concentração de oxigênio geralmente utilizada nas estufas é de 20%, que é a mesma presente no ar atmosférico. Entretanto, é consideravelmente superior à encontrada na tuba uterina e no útero da maioria dos mamíferos (Fischer e Bavister, 1993). Além da tensão de oxigênio, outros

fatores podem contribuir para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como o contato com a luz e o excesso de manipulação (Guerin et al., 2001). Em camundongos, Goto et al. (1993) observaram um aumento na produção de H_2O_2 em embriões expostos à luz por mais de cinco minutos, caracterizando, desta forma, a importância da utilização de substâncias antioxidantes nos meios de cultivo *in vitro*. Tendo em vista que o ambiente natural de oócitos e embriões é rico em agentes antioxidantes, quando estes são cultivados *in vitro*, são privados do sistema de defesa existente no fluido folicular e na tuba uterina. (Gardiner e Reed, 1995; Lapointe et al., 1998). Em geral, as substâncias antioxidantes permitem maior proteção às membranas plasmáticas por agirem removendo os radicais livres. A presença de concentrações apropriadas de antioxidantes no meio de cultivo confere uma redução dos danos nas membranas celulares (Alvarez e Moraes, 2006). Desta forma, é crucial protegê-las contra o estresse oxidativo mediante a adição de antioxidantes ao meio de cultivo. Dentre as substâncias comumente adicionadas, podem-se citar o selênio, o α -tocoferol e o ácido ascórbico.

Selênio

Na fêmea, Hurley e Doane (1989) afirmaram que o selênio pode estar associado à produção de prostaglandinas e que existe acúmulo desse mineral nos placentomas, nos ovários, na pituitária e na glândula adrenal, sugerindo que haja exigências específicas nesses tecidos. Salientaram também que o selênio pode reduzir a retenção de placenta e incrementar o desempenho reprodutivo, pois é um componente essencial do grupo prostético de várias enzimas, particularmente a glutatona peroxidase, apresentando uma relação de 0,74 a 0,97 com a atividade desta enzima (Wittwer et al., 2002). A glutatona está relacionada à proteção das membranas dos oócitos contra danos oxidativos, o que coincide, em parte, com as observações de Lubberda (2005). Em seu trabalho, foram observadas evidências de que a concentração de glutatona reduzida (GSH) no interior do oócito pode ser um bom sinal bioquímico que contribui para o desenvolvimento das maturações nuclear e citoplasmática, em mamíferos. O entendimento da dinâmica da concentração de GSH durante a maturação do oócito e do desenvolvimento embrionário pode diminuir a infertilidade e aumentar a eficiência da produção de embriões (Lubberda, 2005). Além disso, a atividade dessa enzima está intimamente relacionada à disponibilidade de selênio.

Estudos *in vitro* de Basini e Tamanini (2000) demonstraram que o selênio estimulou a proliferação das células da granulosa e a secreção de estradiol em vacas. Uhm et al. (2007) mostraram que a adição desta substância no meio de cultivo aumentou a taxa de formação de blastocistos e a expressão da glutatona peroxidase, diminuindo, conseqüentemente, o índice de apoptose em embriões suínos. Várias investigações evidenciaram que o selênio age de maneira concentração-dependente estimulando ou inibindo o crescimento celular (Menter et al., 2000; Zeng, 2002; Asfour et al., 2009).

Em outros tipos celulares, Ebert et al. (2006) comprovaram que a suplementação de selênio aos meios de cultivo de células do estroma da medula óssea foi eficaz em restaurar a capacidade antioxidante reduzindo os danos celulares. O selênio também desempenha papel na sinalização intracelular incluindo a proteína quinase C, fator nuclear-kappa B e inibidores de proteínas relacionadas à apoptose (Gopalakrishna et al., 1997). Entretanto, há evidências de que esta substância contribui para a apoptose via MAPK e caspase e parada do ciclo celular em células cancerígenas (Rayman, 2005; Ranawat e Bansal, 2009; Zhao et al., 2009).

Muitas ações biológicas do selênio têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes poderosas, que incluem a extinção direta de espécies reativas de oxigênio, a quelatação de íons metálicos e a regeneração de glutatona peroxidase. Yeo e Kang (2007) demonstraram que a adição de selênio no meio de cultivo de células progenitoras neurais preveniu a morte celular e inibiu a apoptose provocada pelo H_2O_2 . Estas observações estão de acordo com o verificado por Saito et al. (2003), em que a remoção de selênio do meio de cultivo de linfócitos T induziu a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como a morte celular.

Alfatocoferol

Tem sido observado que o α -tocoferol, a mais ativa forma da vitamina E, está presente em membranas celulares, sendo encontrado em grande quantidade nos ovários e no fluido folicular (Attaran et al., 2000). O α -tocoferol atua como agente lipossolúvel protetor da lipoperoxidação pela remoção de radicais peróxidos e alcóxil, gerando a forma pouco reativa do tocoferol (Miller e Brzezinska-Slebodzinska, 1993). Segundo Das e Chowdhury (1999), dietas com deficiência de vitamina E afetam a fisiologia uterina de ratas em crescimento, levando à significativa diminuição do peso uterino. Esse fato pode estar relacionado à interrupção da comunicação entre o hipotálamo-hipófise-gônadas. Martin e Moore (1936), citados por Das e Chowdhury (1999), demonstraram que, depois de prolongado período de deficiência de vitamina E, o ciclo estral de ratas tornou-se anormal e impossibilitou uma possível prenhez. Estes efeitos deletérios na reprodução podem ser explicados pela diminuição da concentração de estrógenos em animais com deficiência de vitamina E (Das e Chowdhury, 1999), visto que essa vitamina está concentrada em tecidos produtores de hormônios esteroides, agindo na proteção da atividade esteroidogênica do citocromo P-450 contra a peroxidação de lipídios (Staats et al., 1988). A suplementação do meio de cultivo com vitamina E melhorou as taxas de maturação oocitária (Tao

et al., 2004) bem como o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Olson e Seidel 2000; Wang et al., 2002; Tao et al., 2004). Kitagawa et al. (2004) verificaram que esta vitamina melhorou a formação de blastocisto em embriões suínos e reduziu as concentrações de H₂O₂. Resultados semelhantes foram encontrados por Shimpuku et al. (2000) em cultivo de células somáticas em que houve uma redução nas concentrações deste radical livre e ainda aumento nas concentrações de glutatona. Este fato culminou com a proteção do DNA celular prevenindo a fragmentação do DNA pelo estresse oxidativo. No cultivo *in vitro* de fragmentos do tecido ovariano, o meio de base e a suplementação deste com 5µM de α-tocoferol resultaram em altos percentuais de folículos normais (Lima-Verde et al., 2009) quando comparado aos demais tratamentos usando diferentes concentrações deste antioxidante (10 ou 15µM). Nesse trabalho, a adição de antioxidantes não resultou em aumento da viabilidade folicular. As diferenças encontradas entre estes resultados e os de outros autores podem ter ocorrido devido ao tipo e às concentrações das substâncias utilizadas para fazer a diluição do α-tocoferol, bem como diferenças entre as espécies e as metodologias utilizadas.

Ácido ascórbico

O ácido ascórbico é predominantemente um antioxidante solúvel presente no ovário e pode ser encontrado no oócito, nas células da granulosa, da teca interna e luteínicas (Thomas et al., 2001). As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico são atribuídas a sua capacidade de reduzir os danos causados por espécies reativas de oxigênio pela formação do ascorbato, um radical livre estável (Buettner, 1993). Este mecanismo desempenha um grande número de funções citoprotetoras sob condições fisiológicas. Tais funções incluem a prevenção de mutações no DNA (Sweetman et al., 1997; Lutsenko et al., 2002), a proteção contra a peroxidação lipídica (Kimura et al., 1992; Barja et al., 1994) e a reparação de aminoácidos oxidados para manutenção da integridade de proteínas (Barja et al., 1994; Cadenas et al., 1998). Estes fenômenos contribuem para a redução da apoptose em diversos tipos celulares. Em folículos pré-antrais de camundongas cultivados por seis dias, Murray et al. (2001) observaram uma redução significativa da apoptose celular quando o meio foi suplementado com ácido ascórbico. Estes resultados assemelham-se aos observados para folículos antrais (Tilly e Tilly, 1995), células luteínicas (Kolodecik et al., 1998) e oócitos cocultivados com células da granulosa (Eppig et al., 2000). Em caprinos, a adição de 50µg/mL deste antioxidante em associação ou não ao FSH resultou em altas taxas de sobrevivência folicular após 14 dias de cultivo quando comparado aos fragmentos ovarianos cultivados no meio de base (Rossetto et al., 2009).

Além disso, o ácido ascórbico atua como cofator na síntese de colágeno e amidação peptídica e, ainda, facilita o desenvolvimento folicular (Christiane et al., 1988; Thomas et al., 2001). A suplementação do meio de cultivo com este antioxidante na concentração de 50µg/mL e FSH aumentou os diâmetros folicular e oocitário após sete dias de cultivo de fragmentos ovarianos (Rossetto et al., 2009). Rose et al. (1999) e Thomas et al. (2001), ao adicionarem ácido ascórbico ao meio, demonstraram a importância dessa vitamina na manutenção da sobrevivência de folículos secundários em camundongas e vacas, respectivamente. Esse estímulo ao crescimento e, ainda, a manutenção da sobrevivência folicular podem ser explicados pelo papel que o ácido ascórbico desempenha na produção de colágeno tipo IV. Esse colágeno é de extrema importância para a conservação da estabilidade folicular, além de prevenir a perda da integridade da membrana basal (Luck et al., 1995), visto que atua no processo de remodelação celular.

Considerações finais

A presente revisão evidenciou a importância bem como a participação direta das substâncias antioxidantes na modulação dos compartimentos celulares com ênfase nas células ovarianas. O papel de substâncias como α-tocoferol, selênio e ácido ascórbico já vem sendo estudado por diversas equipes e tem revelado a relevância da adição destas aos meios de cultivos celulares *in vitro*, tendo em vista sua atuação na proteção contra espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual essas e outras substâncias antioxidantes atuam no ovário ainda é desconhecido, requerendo maiores estudos nessa área.

Referências bibliográficas

- Agarwal A, Allamaneni SSR.** Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, v.9, p.338-347, 2004.
- Agrawal F, Lalorava MM.** Induction of peroxidase in corpora lutea of rat ovary by lutropin. *Biochem J*, v.166, p.205-208, 1977.
- Almondres KGS, Leal GVS, Cozzolino SMF, Philippi ST, Rondó PHC.** O papel das selenoproteínas no câncer. *Rev Assoc Med Bras*, v.56, p.484-488, 2010.
- Alvarez CA, Moraes GV.** Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *SaBios: Rev Saúde Biol*, v.1, p.42-51, 2006.
- Anderson CP, Tsai JM, Meek WE, Liu RM, Tang Y, Forman HJ, Reynolds CP.** Depletion of glutathione by

- buthionine sulfoximine is cytotoxic for human neuroblastoma cell lines via apoptosis. *Exp Cell Res*, v.246,p.183-192, 1999.
- Arechiga CG, Flores SV, Ortiz O, Céron JH, Porras A, McDowell IR, Hansen PJ.** Effect of injection of β -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*,v.50, p.65-76, 1998.
- Asfour IA, El-Tehewi MM, Ahmed MH, Abdel-Sattar MA, Moustafa NN, Hegab HM, Fathey OM.** High-dose sodium selenite can induce apoptosis of lymphoma cells in adult patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Trace Elem Res* v. 127, p. 200–210, 2009.
- Attarone M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg J, Miller K, Agarwal A.** The effect of follicular fluid reactive oxygen species on outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil*, v.45, p.314-320, 2000.
- Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R.** Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med* ,v.17, p.105-15, 1994.
- Basini G, Tamanini C.** Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domest Anim Endocrinol*, v.18, p.1-17, 2000.
- Behl R, Pandey RS.** FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro. *Anim Reprod Sci*, v.70, p.215-221, 2002.
- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S.** Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*, v.8, p.40-42, 2001.
- Bregelius FR, Traber MG.** Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, v.13, p.1145-1155, 1999.
- Buettner GR.** The pecking order of free-radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*, v.300, p.535-43, 1993.
- Cadenas S, Rojas C, Barja G.** Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C. *Pharmacol Toxicol*, v.82, p.11-18, 1998.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S.** Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v.29, p.323-333, 2000.
- Chew BP, Holpuch DM, O'Fallon JV.** Vitamin A and 3-carotene in bovine and porcine plasma, liver, corpora lutea, and follicular fluid. *J Dairy Sci*, v.67, p.1316- 1322, 1984.
- Christiane Y, Demoulin A, Gillain D, Leroy F, Lambotte R, Lapiere CM, Nusgens B, Foidart JM.** Laminin and type III procollagen peptide in human preovulatory follicular fluid. *Fertil Steril*, v.50, p.48-51, 1988.
- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Marians KJ.** The importance of repairing stalled replication forks. *Nature*, v.404, p.37-41, 2000.
- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer, HG.** Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*, v.37, p.1511-1526, 2004.
- Das P, Chowdhury M.** Vitamin E-deficiency induced changes in ovary and uterus. *Mol Cell Biochem*, v.198, p.151-156, 1999.
- Deane HW.** Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat*, v. 91, p. 363-393, 1952.
- Diplock AT.** Antioxidants and free radicals scavengers. In: Rice-Evans CA, Burdon RH (Ed.). *Free radical damage and its control*. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.113-115.
- Dormandy DL.** Free radical reaction in biological systems. *Ann R Coll Surg Engl*, v.62, p.188-194, 1980.
- Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Stopper H, Schupp N, Kassem M, Jakob F.** Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells* v.24, p.1226-1235, 2006.
- Ekshyyan O, Aw TY.** Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox status and expression of apoptotic protease activating factor-1. *Cell Death Differ* v.12, p.1066-1077, 2005.
- Eppig JJ.** Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in uterian mammals. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.485-489, 1996.
- Eppig JJ, Hosoe M, O'Brien MJ, Pendola FM, Requena A, Watanabe S.** Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.109-116, 2000.
- Ferreira ALA, Matsubara LS.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Méd Bras*, v.43, p.1-16, 1997.
- Fischer B, Bavister BD.** Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, v.99, p.673-679, 1993.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F.** Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, v.3, p.43, 2005.
- Gardiner CS, Reed DJ.** Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. *Arch Biochem Biophys*, v.318, p.30-36, 1995.
- Gibson GE, Huang HM.** Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Bioenerg Biomembr*, v.36, p.335-340, 2004.

- Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U.** Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch Biochem Biophys*, v.348, p.37-48, 1997.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M.** Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med*, v.15, p.69-75, 1993.
- Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T.** Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. *Free Radic Biol Med*, v.13, p.47-53, 1992.
- Guerin P, El Moutassim S, Menezes Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- Halliwell B, Aruoma OI.** DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, v.281, p.9-19, 1991.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3.ed. Clarendon, UK: Oxford University Press, 1999. 936p.
- Hammadeh N, Coomarasamy A, Ola B, Papaioannou S, Afnan M, Sharif K.** Ultrasound-guided hydrosalpinx aspiration during oocyte collection improves outcome in IVF: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, v.23, p.1113-1117, 2008.
- Henle ES, Linn S.** Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, v.272, p.19095-19098, 1997.
- Higuchi Y, Matsukawa S.** Glutathione depletion induces giant DNA and high-molecular-weight DNA fragmentation associated with apoptosis through lipid peroxidation and protein kinase C activation in C6 glioma cells. *Arch Biochem Biophys*, v.363, p.33-42, 1999.
- Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RML.** Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod*, v.12, p.1032-1036, 1997.
- Hurley WL, Doane RM.** Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J Dairy Sci*, v.27, p.784-804, 1989.
- Imai H, Nakagawa Y.** Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, v.34, p.145-169, 2003.
- Ishikawa M.** Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, v.45, p.842-848, 1993.
- Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M.** Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*, v.5, p.409-413, 1999.
- Kimura H, Yamada Y, Morita Y, Ikeda H, Matsuo T.** Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. *J Nutr*, v.122, p.1904-1909, 1992.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T.** Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1186-1197, 2004.
- Kodaman PH, Behrman HR.** Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology*, v.142, p.687-693, 2001.
- Kolodecik TR, Aten RF, Behrman HR.** Ascorbic acid-dependent cytoprotection of ovarian cells by leukocyte and nonleukocyte peroxidases. *Biochem Pharmacol*, v.55, p.1497-1503, 1998.
- Krisher RL, Bavistar BD.** Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*, v.49, p.103-114, 1998.
- Lalorava M, Kumar GP, Lalorava MM.** Changes in the levels of superoxide anion radical and superoxide dismutase during the estrous cycle of *Rattus norvegicus* and induction of superoxide dismutase in rat ovary by lutropin. *Biochem Biophys Res Comm*, v.157, p.146-153, 1988.
- Lapointe S, Sullivan R, Sirard MA.** Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, v.58, p.747-753, 1998.
- Legge M, Sellens MH.** Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Hum Reprod*, v.6, p.867-871, 1991.
- Lima-Verde IB, Matos MHT, Bruno JB, Martins FS, Santos RR, Bão SN, Luque MCA, Vieira GAB, Silveira ER, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Oliveira MAL, Lima PF.** Effects of α -tocopherol and tertatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles in vitro cultured. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.57-65, 2009.
- Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL.** Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *J Biol Chem*, v.278, p.1998-2004, 2003.
- Lopez SG, Luderer U.** Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, v.36, p.1366-1377, 2004.
- Luberda Z.** The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*, v.5, p.5-17, 2005.
- Luck MR, Jeyaseelan I, Scholes RA.** Ascorbic acid and fertility. *Biol. Reprod*, v.52, p.262-266, 1995.
- Luderer U, Kavanagh TJ, White CC, Faustman EM.** Gonadotropin regulation of glutathione synthesis in the

- rat ovary. *Reprod Toxicol*, v.15, p.495-504, 2001.
- Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW.** Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J Biol Chem*, v.277, p.16895-1689, 2002.
- Machlin LJ, Gabriel E.** Interactions of vitamin E with vitamin C, vitamin B12, and zinc. *Ann NY Acad Sci* v. 355, p. 98-108, 1980.
- Margolin Y, Aten RF, Behrman HR.** Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.127, p.245-250, 1990.
- Matos DG, Furnus CC.** The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*, v.53, p.761-771, 2000.
- Menter DG, Sabichi AL, Lippman SM.** Selenium effects on prostate cell growth. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v.9, p.1171-1182, 2000.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E.** Oxidative stress, antioxidants and animal function. *J Dairy Sci*, v.76, p.2812-2823, 1993.
- Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC.** Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.608-614, 2009.
- Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N.** Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction*, v.121, p.89-96, 2001.
- Nasr-Esfahani MH, Johnson MH.** Quantitative analysis of cellular glutathione in early preimplantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. *Hum Reprod*, v.7, p.1281-1290, 1992.
- Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH.** Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil*, v.96, p.219-231, 1992.
- Navarro PA, Liu L, Ferriani RA, Keefe DL.** Arsenite induces aberrations in meiosis that can be prevented by coadministration of N-acetylcysteine in mice. *Fertil Steril*, v.85, p.1187-1194, 2006.
- Nordberg J, Arnér ESJ.** Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.
- Olson SE, Seidel Júnior GE.** Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol Reprod*, v.62, p.248-252, 2000.
- Orsi NM, Leese HJ.** Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase, and pyruvate. *Mol Reprod Dev*, v.59, p.44-53, 2001.
- Rahimi G, Isachenko E, Sauer H, Isachenko V, Wartenberg M, Hescheler J, Mallmann P, Nawroth F.** Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev*, v.15, p.343-349, 2003.
- Ranawat P, Bansal MP.** Apoptosis induced by modulation in selenium status involves p38 MAPK and ROS: implications in spermatogenesis. *Mol Cell Biochem*, v.330, p.83-95, 2009.
- Rayman MP.** Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*, v.64, p.527-542, 2005.
- Riley JC, Behrman HR.** In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology*, v.128, p.1749-1753, 1991.
- Rodgers RJ.** Steroidogenic cytochrome P450 enzymes and ovarian steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev*, v.2, p. 153-163, 1990.
- Rose UM, Hanssen RGJM, Kloosterboer HJ.** Development and characterization of an in vitro ovulation model using mouse ovarian follicles. *Biol Reprod*, v.61, p.503-511, 1999.
- Rossetto R, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CMG, Name KPO, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H.** Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Domest Anim Endocrinol*, v.37, p.112-123, 2009.
- Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG.** Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, v.72, p.1027-1034, 1999.
- Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E.** Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *J Biol Chem*, v.278, p.39428-39434, 2003.
- Schnelldorfer T, Gansauge S, Gansauge F, Schlosser S, Beger HG, Nussler AK.** Glutathione depletion causes cell growth inhibition and enhanced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer*, v.89, p.1440-1447, 2000.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, v.254, p.439-459, 1998.
- Shimpuku H, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K.** Effect of vitamin E on the degradation of hydrogen peroxide

- in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci*, v.68, p.353-359, 2000.
- Sies H.** Strategies of antioxidant defence: review. *Eur J Biochem*, v.215, p.213-219, 1993.
- Staats DA, Lohr DP, Colby HD.** Effects of tocopherol depletion on the regional differences in adrenal microsomal lipid peroxidation and steroid metabolism. *Endocrinology*, v.123, p.975-980, 1988.
- Strauss JF e Miller WL.** Molecular basis of ovarian steroid synthesis. In: Hillier SG (Ed.). *Ovarian endocrinology*. Oxford: Blackwell, 1991. p. 25-72.
- Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y and Kato H.** Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod*, v.6, p.19-25, 2000.
- Sweetman SF, Strain JJ, McKelvey-Martin VJ.** Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. *Nutr Cancer*, v.27, p.122-130, 1997.
- Takami M, Preston SL, Behrman HR.** Eicosatetraenoic and eicosatrienoic acids, lipoxygenase inhibitors, block meiosis via antioxidant action. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.278, p.C646-C650, 2000.
- Tao Y, Zhou B, Xia G, Wang F, Wu Z, Fu M.** Exposure to Lascorbic acid or α -tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase i to metaphase ii and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reprod Domest Anim*, v.39, p.52-57, 2004.
- Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, Muto N.** Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside during in vitro maturation. *Biol Reprod*, v.65, p.1800-1806, 2001.
- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE.** Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *J Reprod Fertil*, v.122, p.487-495, 2001.
- Tilly JL, Tilly KI.** Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, v.136, p.242-252, 1995.
- Tsai-Turton M, Luderer U.** Gonadotropin regulation of glutamate cysteine ligase catalytic and modifier subunit expression in the rat ovary is subunit and follicle stage-specific. *Am J Physiol*, v.289, p.E391-E402, 2005.
- Tsai-Turton M, Opposing UL.** Effects of glutathione depletion and follicle- stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. *Endocrinology*, v.147, p.1224-1236, 2006.
- Tsuji M, Ito Y, Terad N, Mori H.** Ovarian aromatase action in scorbutic mutant rats unable to synthesize ascorbic acid. *Acta Endocrinol*, v.121, p.595-602, 1989.
- Uhm SJ, Gupta MK, Yang JH, Lee SH, Lee HT.** Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.1386-1394, 2007.
- Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T.** Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.28-33, 1992.
- Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK.** Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril*, v.78, p.1272-1277, 2002.
- Wittwer, F, Araneda, P, Ceballos, A, Contreras PA, Andaur M, Bohmwald H.** Actividad de glutatión peroxidase (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX región, Chile y su relación con la concentración de selênio en el forraje. *Arch Med Vet*, v.34, p.1-10, 2002.
- Yoshihara D, Fujiwara N, Ookawara T, Kato S, Sakiyama H, Yokoe S, Eguchi H, Suzuki K.** Protective role of glutathione S-transferase A4 induced in copper/zinc-superoxide dismutase knockout mice. *Free Radic Biol Med*, v.47, p.559-567, 2009.
- Yeo JE, Kang SK.** Selenium effectively inhibits ROS-mediated apoptotic neural precursor cell death in vitro and in vivo in traumatic brain injury. *Biochim Biophys Acta*, v.1772, p.1199-1210, 2007.
- Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel VG.** Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod*, v.49, p.89-94, 1993.
- Xia S, Rosen EM, Laterra J.** Sensitization of glioma cells to Fas-dependent apoptosis by chemotherapy-induced oxidative stress. *Cancer Res*, v.65, p.5248-5255, 2005.
- Zeng H.** Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression. *J Nutr*, v.132, p.674-679, 2002.
- Zhang P, Omaye ST.** β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *J Nutr Biochem*, v.12, p.38-45, 2001.
- Zhao R, Xiang N, Domann FE, Zhong W.** Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, v.61, p.397-407, 2009.
- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD.** Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev*, v.64, p.106-112, 2003.